



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**AISLAMIENTO Y TIPIFICACIÓN DE
Streptococcus pyogenes A PARTIR DE
EXUDADOS FARÍNGEOS DE INFANTES DE
ENTRE LOS 5 Y 10 AÑOS EN TRES
ESCUELAS DE LA CIUDAD DE MÉXICO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A:
EMMA GUADALUPE TORRES MENDOZA





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A MI MADRE Bibiana Mendoza Ríos

Por que a pesar de mis defectos tu apoyo para este trabajo fue incondicional, porque gracias a ti este sueño es una realidad.

A MI PADRE Manuel Torres Ramírez

Por todas tus enseñanzas y donde quiera que estés te sigo recordando con mucho cariño.

A MIS HIJOS MANUEL Y ANDREA

Por ser la razón de mi vida y por su comprensión.

A MI FAMILIA

Por todo el apoyo incondicional que me brindaron.

A PEPE Y JUDITH

Por su confianza y apoyo durante la realización de este trabajo.

A MIS AMIGOS: CESAR, SILVIA, YATENEDIN, LAURIS

Por todos los momentos que pasamos juntos.

A DARIO

Por su apoyo, su amor y sus palabras que me ayudaron a seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor de tesis, M. en C. Luciano Hernández Gómez por el apoyo, la paciencia, la confianza y compartir sus conocimientos para la realización de esta de tesis.

Para mi supervisor técnico, Q.F.B. Ma. Antonieta Silva Chávez por su amistad y sus consejos para el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del jurado por sus observaciones y consejos para que este trabajo sea una realidad.

A Luis Manuel Perea Mejia por el apoyo brindado en la realización de la parte experimental de PCR en este trabajo, por sus consejos y su amistad.

A la Facultad de Química de la UNAM que me brindó la oportunidad de tener una formación profesional excelente.

A todas las personas que contribuyeron con este trabajo.



ÍNDICE

CAPITULO I	INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO II	GENERALIDADES	4
2.1	Enfermedades de vías respiratorias altas	4
2.2	Bacterias Patógenas de Vías Respiratorias altas	11
2.3	<i>Streptococcus pyogenes</i> (principal agente etiológico bacteriano de infecciones faríngeas)	15
2.3.1	Características Generales de <i>Streptococcus pyogenes</i>	16
2.3.2	Componentes de Pared Celular	21
2.3.3	Productos Extracelulares	28
2.3.4	Mecanismos de Patogenicidad	33
2.3.5	Enfermedades Causadas por <i>Streptococcus pyogenes</i>	35
2.4	Diagnóstico Bacteriológico	42
2.5	Métodos de Identificación	43
2.5.1	Pruebas Serológicas	45
2.5.2	Métodos Moleculares	51
CAPITULO III	OBJETIVOS	59





CAPITULO IV PARTE EXPERIMENTAL

A. Material	60
B. Material y equipo de laboratorio	60
C. Medios de cultivo	61
D.Reactivos	62
E. Kits	62
Metodología	63

CAPITULO V RESULTADOS 72

CAPITULO VI ANÁLISIS DE RESULTADOS 81

CAPITULO VII CONCLUSIONES 86

CAPITULO VIII BIBLIOGRAFÍA 87





1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones en vías respiratorias altas, ocupan entre el 80 y 90% de los diagnósticos clínicos en las comunidades urbanas. Dentro de las más frecuentes se encuentran la faringoamigdalitis, el catarro común y la bronquitis, que causan un gran problema de salud pública, afectando principalmente a la población infantil, debido a que existen factores que facilitan el desarrollo de las infecciones respiratorias en los infantes como son: la falta de madurez en respuesta inmune local y sistémica, presentan desventajas anatómicas como lo son vías aéreas más cortas, conducto auditivo más horizontal el cual se ocluye o infecta con mayor facilidad que en el adulto. Entre otros factores de contagio se encuentran, el estrecho contacto que existe entre los infantes, así como, con el personal que labora en guarderías, escuelas, además del alto hacinamiento en poblaciones de escasos recursos.

Las infecciones en vías respiratorias altas, generalmente es causada en un 80% por virus y 20% por bacterias, observándose una sintomatología de inflamación y enrojecimiento de la faringe, inflamación de las amígdalas, exudación serosa fluida y fiebre.





La faringoamigdalitis bacteriana generalmente es provocada por estreptococos Gram positivos beta hemolíticos, siendo *Streptococcus pyogenes* la principal causa de infecciones en vías respiratorias altas, así como de una variedad de enfermedades agudas y crónicas que pueden provocar secuelas postestreptocóccicas, tales como la fiebre reumática, glomerulonefritis aguda y endocarditis.

En la faringoamigdalitis bacteriana es importante que se haga la detección rápida del agente etiológico y así poder dar el tratamiento adecuado para este padecimiento, ya que estos son responsables de enfermedades altamente infecciosas como glomerulonefritis y fiebre reumática y se transmiten fácilmente por contacto directo. Dentro de los sitios potenciales de diseminación de los agentes infecciosos podemos reconocer centros de convivencia infantil, guarderías, escuelas y seno familiar; las formas de contagio más comunes pueden ser por gotitas de saliva al estornudar, al compartir alimentos o estar en contacto con un portador sano, lo que hace difícil evitar los contagios, y por lo tanto, es importante identificar a los portadores para prevenir la diseminación de microorganismos patógenos.

El presente trabajo tuvo como objetivo aislar e identificar a *Streptococcus pyogenes* a partir de exudados faríngeos obtenidos en niños de entre 5 y 10 años de edad en tres escuelas de la Ciudad de México, los exudados obtenidos, se transportaron al laboratorio donde se realizó el análisis microbiológico correspondiente. Así mismo una vez aislado e





identificado el cultivo (*Streptococcus pyogenes*) por medio de pruebas bioquímicas y serológicas, se realizó la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para determinar el serotipo, de acuerdo al gen *emm*.





2. GENERALIDADES

2.1 Enfermedades de vías respiratorias altas

Las infecciones del tracto respiratorio alto son de las principales causas de consulta médica a nivel mundial. Dicha situación se da por la diversidad de virus y bacterias que participan como agentes etiológicos en las vías respiratorias. Estudios epidemiológicos señalan que las infecciones respiratorias agudas se presentan cada año con mayor frecuencia en los países del tercer mundo (12). De las cuales se pueden señalar:

Resfriado común.

El resfriado común es una de las enfermedades más recurrentes en las vías respiratorias altas en niños y en adultos, también se le conoce como catarro, rinitis y rinofaringitis, su etiología es principalmente viral. (8, 12, 28)

Epidemiológicamente se ha observado que esta se presenta con mayor frecuencia en otoño e invierno, debido al hacinamiento familiar durante el invierno, los grandes conglomerados humanos en sitios cerrados y el contacto de los niños durante el periodo escolar, son





factores altamente predisponentes para el contagio. Se pueden presentar de 10 a 12 o más cuadros infecciosos por año. Los mecanismos de defensa se pueden alterar por las condiciones ambientales, tales como el smog, tolváneras, tabaquismo entre otros. (12, 28)

Los síntomas se presentan con sensaciones de prurito o ardor faríngeo, escalofrío, cefalea, ardor conjuntival, lagrimeo acompañado de malestar general con mioartralgias. Puede existir fiebre de grado bajo y el síndrome se caracteriza por grados variables de congestión nasal, rinorrea, dolor o prurito faríngeo y estornudos frecuentes. (17, 28)

Laringotraqueobronquitis (LTB).

La laringotraqueobronquitis es una enfermedad que constituye un proceso inflamatorio agudo que afecta las partes anatómicas que le dan el nombre, generalmente se inicia en laringe y puede descender rápidamente a tráquea y bronquios. (12, 28)

Resulta de suma importancia saber que este padecimiento tiene en la mayor parte de los casos una etiología viral. Los agentes de origen bacteriano que originan este padecimiento son: *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* serotipo b, *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. (28)

Esta enfermedad ocurre frecuentemente entre los seis meses y los tres años de edad, tiene





una distribución a nivel mundial y son desde luego los meses fríos del año la época en que ocurre con mayor frecuencia. (31)

A menudo las manifestaciones iniciales son las de una rinofaringitis inespecífica, con rinorrea hialina, fiebre de bajo grado, tos seca, poca o nula afectación del estado general y entre 24 a 48 horas aparece disfonía, tos traqueal, estridor laríngeo y signos de insuficiencia respiratoria de grado variable, lo cual depende de la obstrucción de la vía aérea, que se manifiesta por aleteo nasal y en ocasiones con franca disociación torácico-abdominal. En los casos severos aparecen signos de hipoxemia que incluye cianosis, taquicardia, inquietud y sudoración, en estadios avanzados, somnolencia que evoluciona a coma, bradicardia, hipotensión arterial y paro cardiorespiratorio. (28)

Faringitis Aguda.

La faringitis aguda es una enfermedad que se presenta particularmente en niños y en adultos con antecedentes de abuso en el empleo de la voz como son cantantes, oradores, etc. Frecuentemente este cuadro es sobrediagnosticado y el que con mayor frecuencia recibe un manejo inadecuado, donde el abuso y el mal uso de los antibióticos constituyen la regla. (28)

La etiología de la faringitis aguda es muy variada, ya que es originada generalmente en un 80% por virus y en un 20% por bacterias. *Streptococcus pyogenes* es el principal





CAPITULO II

responsable de la faringitis bacteriana con un 15-20% de las infecciones. (12, 17, 27, 28)

Epidemiológicamente se caracteriza por presentarse con mayor frecuencia durante el otoño y el invierno. En adultos tiene la misma prevalencia sobre todo en forma endémica en comunidades cerradas, como los campos militares en donde se observan faringitis y neumonías. (5, 11)

El cuadro clínico es variable y se caracteriza por disfonía o afonía, así como, hiperemia, edema, irritación de cuerdas bucales y en ocasiones ulceraciones superficiales, la epiglotis se observa eritematosa y tumefacta. (12, 28)

Faringoamigdalitis.

Es el resultado de la invasión de la mucosa de la faríngea y las amígdalas ya sea por virus o por bacterias, la primera cursa con un síndrome inflamatorio de la pared de la faringe y la segunda se refiere a un proceso inflamatorio e infeccioso de las amígdalas. Cuando estas dos estructuras anatómicas se afectan se utiliza el término faringoamigdalitis. (12, 28)

La faringoamigdalitis es una enfermedad que se presenta principalmente en niños de 5 y 15 años de edad, en adultos suele presentarse en forma endémica en comunidades cerradas, como en los campos militares, esta convivencia cerrada favorece la diseminación interpersonal, por medio del contacto directo, gotitas de saliva o alimentos contaminados.





(12, 22, 28)

La faringoamigdalitis al igual que la faringitis son infecciones de origen viral y bacteriano, desde el punto de vista bacteriano *Streptococcus pyogenes* y *Corynebacterium diphtheriae* son los únicos realmente responsables del cuadro, de manera que sólo el primero de ellos es buscado en los laboratorios de microbiología clínica, ya que *Corynebacterium diphtheriae* actualmente se considera erradicado, debido a la aplicación de la vacuna DTP (Difteria Tos ferina y Tétanos. (7, 28, 30, 31)

La sintomatología se caracteriza por cefalea, exudado faríngeo, adenitis cervical dolorosa, escalofríos, elevación de la temperatura, náuseas y dolor abdominal. La pared faríngea se presenta hiperémica con un exudado espeso que cubre tanto la faringe posterior como las amígdalas, la úvula puede estar edematizada. (12, 28)

Epiglotitis.

La epiglotitis se debe a un edema inflamatorio agudo en la zona supraglótica de la laringe y epiglotis que suele manifestarse en niños de 2 y 6 años, aunque también se puede presentar en adultos. El agente etiológico más frecuente es *Haemophilus influenzae* serotipo b, y con menor frecuencia *Streptococcus sp.* y *Staphylococcus sp.* (12)

La epiglotitis inicia con una sintomatología abrupta con estridor inspiratorio, tos traqueal,





odinofagia y temperatura de 39°C. El examen físico muestra aspecto grave, presentando sialorrea y profusión mandibular. El síntoma más común de la epiglottitis es la incapacidad de deglutir y de un aspecto de color rojo cereza de la epiglottis. (12)

Adenoiditis.

La adenoiditis se da cuando las adenoides sufren hipertrofia alcanzando un diámetro de 2-3cm, particularmente a expensas de la pared posterior del techo de la nasofaringe, que interfiere con el paso del aire a través de la nariz y pueden incluso obstruir la trompa de Eustaquio. Este efecto mecánico obstructor favorece la infección y es un padecimiento frecuente en edades pediátricas. (28)

Los síntomas más constantes son rinitis resistente, tono de voz nasal, y alteraciones de olfato y gusto además se puede acompañar de tos seca y respiración ruidosa, ésta puede presentarse exclusivamente durante el sueño, que se acompaña de ronquido, ptialismo y otitis media, la mayoría de estos cuadros suelen confundir esta enfermedad con la faringoamigdalitis de repetición o rinitis crónica. (28)

La patología infecciosa de la adenoiditis en su mayor frecuencia es viral. Los virus más frecuentemente involucrados son el adenovirus, el virus respiratorio sincicial, virus influenza y parainfluenza. Entre las infecciones bacterianas, los géneros y especies más frecuentes son: *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, y *Moraxella catarrhalis*. (28)





Otitis media aguda

La otitis media aguda es una infección del oído medio común en lactantes y preescolares, debido en parte a que la trompa de Eustaquio está más abierta en esta edad y generalmente se asocia a brotes de infecciones virales en la comunidad (28).

Por lo menos la mitad de los casos son de origen viral y los invasores bacterianos son residentes nasofaríngeos, sobre todo *Streptococcus pneumoniae* o *Haemophilus influenzae* serotipo b, y en ocasiones *Streptococcus pyogenes* o *Staphylococcus aureus*. (17, 27, 28)

Este padecimiento se manifiesta por presentar dolor, irritabilidad y fiebre, con la aparición posterior de otorrea. Por lo general la sintomatología del paciente mejora una vez que la membrana timpánica sufre ruptura. En algunos pacientes pueden ser mínimos o ausentes. (28)

Sinusitis aguda

La sinusitis aguda se define como la presencia de cambios inflamatorios de tipo agudo en la mucosa de los senos paranasales, como consecuencia de una infección de las vías respiratorias superiores. (28)

La etiología es principalmente de tipo bacteriano aunque también puede ser de origen viral





o de tipo alérgico. La mayoría de los casos de sinusitis purulenta se deben a infecciones bacterianas. Las bacterias que participan con mayor frecuencia en este padecimiento son: *Haemophilus influenzae* serotipo b, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*. (7, 12, 28)

La sintomatología se manifiesta como: rinorrea purulenta, dolor facial que se exagera al tomar la posición decúbito dorsal o al agacharse, dolor a la masticación, hiposmia, congestión e inflamación nasal, tos, fiebre e hipersensibilidad localizada. (17, 28)

2.2 Bacterias patógenas de vías respiratorias altas

➤ Uno de los microorganismos patógenos más comunes causante de faringoamigdalitis aislado en las vías respiratorias altas es el *Streptococcus pyogenes* el cual se caracteriza por ser un coco Grampositivo y formar colonias β -hemolíticas en agar sangre de carnero. Este microorganismo es de los más importantes en el diagnóstico de infecciones de vías respiratorias altas, se puede diseminar localmente para producir enfermedades supurativas como: escarlatina, erisipela, celulitis, síndrome del shock tóxico, fascitis necrosante o complicaciones no supurativas como son la fiebre reumática, glomerulonefritis aguda y endocarditis. Los pacientes que presentan faringitis estreptocócica manifiestan dolor repentino de garganta, fiebre, disfagia y sensibilidad en los ganglios linfáticos cervicales,





CAPITULO II

eritema faringoamigdalino, con frecuencia con exudado blanquecino, también puede haber petequias en el paladar blando y adenitis cervical anterior con su característica sensibilidad. Es la bacteria más frecuente en el diagnóstico de faringitis con un 10-25 % de aparición. (7, 10, 11, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27)

➤ *Corynebacterium diphtheriae* es un microorganismo de poca frecuencia o casi nula en su aislamiento en laboratorio clínico, éste se caracteriza por ser un bacilo Grampositivo pleomórfico, no esporulado con gránulos metacromáticos. Su manifestación clínica presenta inflamación de las amígdalas y las fauces las cuales se cubren con un exudado que forma una membrana adherente gris, esto puede producir una obstrucción respiratoria de peligro mortal especialmente si se encuentra afectada la laringe; la inflamación reactiva y el edema producen el aspecto de “cuello de toro”. Su poca incidencia se debe a la vacunación, lo que ha reducido la incidencia de la enfermedad a menos del 1 %. (7, 12, 17, 27)

Haemophilus influenzae serotipo b es un microorganismo que se encuentra como flora habitual de vías respiratorias altas y se caracteriza por ser un cocobacilo Gramnegativo. Se adquiere por contacto directo o por vía aérea, el tejido blanco primario de colonización es la mucosa faríngea, se considera el más virulento de su género, origina epiglotitis grave con obstrucción de la vía aérea, especialmente en niños, ocasiona otitis media, septicemia, pioartritis, piocarditis, pero sobre todo destaca como el agente causal más frecuente de meningitis infantil. (17)





CAPITULO II

Es un microorganismo que también puede infectar la nasofaringe de niños sanos menores de 5 años en un porcentaje entre 2-7%; este porcentaje está disminuyendo desde la introducción de las vacunas conjugadas anti-Hib en los calendarios de vacunaciones. (17)

➤ *Borrelia vincentii* es un microorganismo de poca frecuencia que se caracteriza por ser una espiroqueta, su observación se hace junto con bacterias anaerobias, espiroquetas y ciertos bacilos fusiformes. Pueden provocar la angina de Vincent, una amigdalitis ulcerosa aguda con formación de una pseudomembrana necrótica acompañada de adenopatía del cuello del lado afectado. *Borrelia vincentii* es una entidad poco frecuente ya que se presenta en menos del 1% de los aislamientos clínicos. (12, 17)

➤ *Neisseria gonorrhoeae* es un microorganismo de aislamiento poco frecuente en vías respiratorias altas, éste se caracteriza por ser diplococo Gramnegativo intracelular. Llega a causar faringitis aguda como resultado del contacto urogenital con las vías respiratorias altas, la que se presenta como una faringoamigdalitis exudativa ulcerada, que frecuentemente es asintomática. Su frecuencia se ha incrementado en los últimos años cerca del 1%. (12, 17, 27)

➤ *Mycoplasma pneumoniae* es un microorganismo de poca frecuencia el cual se caracteriza por carecer de la pared celular. Así que puede asumir múltiples formas incluyendo formas





CAPITULO II

redondas, en forma de pera e incluso la forma filamentosa, es extracelular. Generalmente produce un estado clínico de larga duración y es más frecuente que produzca bronquitis y neumonías atípicas. Puede causar dolor de garganta, aunque este es sólo una manifestación de una infección respiratoria más generalizada. La incidencia de este microorganismo es menor al 1%. (12)

➤ *Bordetella pertussi* es un microorganismo de poca frecuencia el cual se caracteriza por ser cocobacilo Gramnegativo, causante del síndrome pertussi o tosferina. Este padecimiento afecta frecuentemente a niños menores de 10 años, se adquiere por vía inhalatoria. Son características de la enfermedad los accesos de tos paroxística que terminan con un estridor inspiratorio. Durante el paroxismo puede presentarse cianosis, vómito, hemorragias por la nariz, ojos y aun cerebrales. En la actualidad no se busca en cultivos faríngeos ya que la vacuna DTP (Difteria, Tos ferina y Tétanos) que se aplica en la niñez previene la tosferina, lo que ha reducido la incidencia de esta enfermedad a menos del 1%. (9, 13)

2.3 *Streptococcus pyogenes* (principal agente etiológico bacteriano de infecciones faríngeas)

De acuerdo con la última revisión del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology segunda edición, Abril 2001; se considera que *Streptococcus pyogenes* pertenece al:





CAPITULO II

Phylum BXIII: Firmicutes

Clase III: Bacilli

Orden: Lactobacillales

Familia: *Streptococcaceae*

Género y especies: *Streptococcus pyogenes*

El género *Streptococcus* es un grupo muy amplio y heterogéneo de microorganismos, algunos son saprófitos, otros forman parte de la flora normal y se comportan como oportunistas y algunos son patógenos y pueden producir infecciones diversas en el hombre y los animales. (15, 16, 17)

Streptococcus pyogenes es un microorganismo β -hemolítico de acuerdo a la clasificación de Brown y perteneciente al grupo A de Lancefiel, es una entidad clínica de importancia en salud pública por ser la causa de distintas infecciones, tales como de faringitis aguda bacteriana, escarlatina, fiebre reumática, endocarditis y glomerulonefritis aguda. (15, 16, 17)

2.3.1 Características generales de *Streptococcus pyogenes*:

Se caracterizan por ser células esféricas u ovoides de 0.6 – 1 micras de diámetro que suelen aparecer en pares o formando cadenas largas, son Grampositivos, no móviles, no esporulados, catalasa-negativo, anaerobios facultativos, presentan susceptibilidad a la





CAPITULO II

bacitracina 0.04 U, para su desarrollo requieren de medios enriquecidos con suero o sangre de carnero. (9, 14, 16, 17)

En agar sangre de carnero, *Streptococcus pyogenes* produce colonias de blancas a grises de 1 a 2 mm de diámetro rodeadas por una zona de hemólisis completa o beta. Los cultivos con colonias mucoides que semejan una gota de agua en la placa, es debido a la producción de material capsular (hialuronato), lo que les da una apariencia lisa. Las cepas menos mucoides asumen un aspecto rugoso. (9, 16)

Clasificación de Brown

En 1903 Schötmuller recomendó una clasificación racional de los estreptococos dada la descripción de colonias en placa de la técnica de agar sangre de carnero para diferenciar los estreptococos que producen hemólisis de los que no la producen. (7, 10, 11, 15, 20, 23, 24)

Brown, hizo un estudio sistemático de los patrones de hemólisis e introdujo los términos α -hemólisis, β -hemólisis y γ -hemólisis. De acuerdo con este esquema, los estreptococos pueden subdividirse en tres clases, dependiendo del tipo de hemólisis que producen en agar sangre de carnero. La hemólisis se logra por las hemolisinas producidas por estos microorganismos denominadas estreptolisinas y existen 2 tipos:





CAPITULO II

- Estreptolisina **S** es una hemolisina adherida a la célula y estable frente al oxígeno, no es inmunogénica, es capaz de lisar eritrocitos, así como leucocitos y plaquetas tras un contacto directo, la cual es activa en presencia de O₂.
- Estreptolisina **O** es inactiva en presencia de O₂, causa una respuesta inmune, es cardiotóxica y la detección de anticuerpos de la antiestreptolisina O (ASLO) puede usarse clínicamente para confirmar una reciente infección.

De acuerdo a la producción de estreptolisinas, la mayoría de las cepas estreptocócicas presentan alguno de los siguientes comportamientos:

- a) Producción de ambas estreptolisinas.
- b) Producción de estreptolisina S.
- c) Incapacidad de producir cualquiera de las estreptolisinas.

Con lo anterior se pueden explicar los tres comportamientos hemolíticos de los estreptococos ya que las cepas cuyo comportamiento es producir las dos hemolisinas, presentan hemólisis total o β , porque destruyen los eritrocitos que circundan sus colonias desde la superficie del agar por acción de la estreptolisina S, hasta la parte profunda de la placa donde actúa la estreptolisina O. (7, 10, 11, 15, 20, 23, 24, 25)

Los estreptococos que presentan el comportamiento de sólo producir una hemolisina lo cual





CAPITULO II

es citado en el inciso b producen hemólisis parcial o α , debido a que sólo destruyen los glóbulos rojos que se localizan en la parte superficial del agar. La hemólisis parcial suele presentar una coloración verdosa, porque la hemoglobina es transformada a biliverdina y no hasta bilirrubina como ocurre en presencia de cepas β -hemolíticas. Por esta razón, también puede referirse a ellos como estreptococos del grupo *Viridans* (del latín *viride*, que significa “verde”), exceptuando a *Streptococcus pneumoniae*, el cual no pertenece a ningún grupo de Lancefield ya que esta especie pertenece al grupo de los neumococos. (7, 21, 25)

Por lo que respecta a las cepas que no producen hemólisis alguna citado en el inciso c se denominan simplemente no hemolíticas, aunque un pequeño número de autores aún emplea la designación de gama-hemolíticas. (7, 21, 25)

Por último, es conveniente señalar que la sangre de carnero es la más apropiada para el estudio del tipo de hemólisis que producen los estreptococos, puesto que los ovinos no son susceptibles de infección por estos microorganismos y en consecuencia no es posible que la sangre de estos animales contenga anticuerpos en contra de la estreptolisina O, los cuales neutralizarían su acción. (11)

Esquema de clasificación de Lancefield

La pared celular de los estreptococos se encuentra constituida por tres capas, la más interna de las cuales corresponde a un mucopéptido bacteriano clásico y la más externa a una





CAPITULO II

mezcla de proteínas denominadas M, T y R, cuyas estructuras determinan el serotipo de cada cepa; la intermedia se conoce como carbohidrato C y representó la base para que Rebeca Lancefield diseñara una metodología relativamente sencilla para clasificar a los estreptococos en diversos serogrupos. La técnica consistía en preparar cultivos líquidos puros de 24 horas de los estreptococos aislados, con el fin de someterlos a la acción de HCl 0.2 N en caliente y poder extraer el carbohidrato C y posteriormente éste se inoculaba en conejos y, previa sangría del animal, se obtenía el suero que contenía los anticuerpos anti-carbohidrato C. (9, 17, 18)

Lógicamente, el primer suero que preparó recibió el nombre de suero anti-A, motivo que condujo a la designación de grupo “A”, a todos aquellos aislamientos estreptocócicos cuyo carbohidrato C reaccionaba positivamente con dicho suero. El hecho de que algunas cepas no reaccionaban con el suero anti-A, generó la necesidad de obtener los sueros anti-B, anti-C, anti-D y anti-E, mismos que originaron el establecimiento de los grupos correspondientes. Finalmente, los grupos restantes (del F al V) fueron definidos en etapas posteriores, por otros investigadores quienes continuaron aplicando la misma metodología de Rebeca Lancefield. (9, 17, 18)

De acuerdo a los estudios realizados por Rebeca Lancefield y a la clasificación de Brown el *Streptococcus pyogenes* se clasificó como un estreptococo del grupo A y β -hemolítico.





Además, Rebeca Lancefield estableció el papel crítico de la proteína M en la virulencia estreptocócica y la naturaleza específica de tipo inmunidad protectora contra la infección por estreptococos del grupo A. (9, 17, 18)

2.3.2 Componentes de pared celular.

La proteína M es el principal antígeno de virulencia de *Streptococcus pyogenes*, es termo-resistente, está asociada con el ácido lipoteicoico en estructuras semejantes a fimbrias y se relaciona con la adherencia, además de que constituye uno de los factores de virulencia antifagocitarios. Así mismo, impide la interacción de la célula estreptocócica con los componentes del complemento, por lo que, el efecto se ve aumentado por la capacidad de la proteína M para precipitar el fibrinógeno directamente en la superficie bacteriana. Por lo tanto, los cultivos ricos en esta proteína son resistentes a la fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares, permitiendo así que los estreptococos se multipliquen, por otro lado, las cepas que carecen de proteína M son avirulentas. (16, 17)

La inmunidad adquirida contra la infección estreptocócica se basa sobre el desarrollo de anticuerpos opsonizantes dirigidos contra la región antifagocitaria de la proteína M, además la molécula de proteína M contiene también antígenos comunes no específicos, y antígenos proteicos asociados con la proteína M compartidos por una amplia variedad de serotipos M





CAPITULO II

diferentes. Cada estreptococo expresa un solo tipo de proteína M, el cual puede ser anulado por la presencia de concentraciones adecuadas de anticuerpos específicos para cada serotipo. Además la parte amino terminal de la proteína M parece proporcionar la base para dividir este grupo en más de 70 serotipos, los cuales no presentan inmunidad cruzada, de tal manera que la infección por uno de estos produce una inmunidad específica que no protege frente a los demás. (16, 17)

La región amino terminal de todas las moléculas de la proteína M tienen un exceso de aminoácidos con carga negativa, lo que confiere una carga negativa neta a esta región, lo cual podría estar involucrado en la protección que la proteína M confiere a la bacteria contra la fagocitosis, ya que en los mamíferos las células tienen también carga negativa neta, y las repulsiones electrostáticas impiden el contacto entre el estreptococo y el fagocito. Además, es en esta parte de la molécula donde se presenta la región hipervariable de la proteína M, lo que hace a esta región distintiva para cada serotipo. Esta región consiste en una secuencia no helicoidal de 11 aminoácidos, la cual juega un papel muy importante en la actividad biológica de la proteína M, donde sólo anticuerpos dirigidos específicamente contra esta área permiten a los fagocitos endocitar al estreptococo. (22)

La proteína M es una molécula dimérica con una periodicidad de siete residuos que le permite formar un enroscamiento de hélice alfa. La proteína M se rompe cerca de su parte media frente a la pepsina, para dar un extremo amínico hipervariable que se extiende hacia





CAPITULO II

el medio y un extremo carboxílico muy conservado que se encuentra anclado en la membrana citoplasmática. El extremo amino derivado de la pepsina (*pepM5*) contiene un enroscamiento aleatorio que comprende la mayor parte del segmento que da lugar a la formación de anticuerpos que opsonizan los estreptococos. La región *pepM* de por lo menos algunas proteínas M también tiene epítomos, que simulan los antígenos que se encuentran en el tejido de las válvulas cardiacas y producen autoanticuerpos en los pacientes. No obstante, la función más importante de la proteína M es permitir que los estreptococos resistan la fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares. Los epítomos del segmento *pepM* evitan la opsonización no inmunitaria al enlazar el fibrinógeno y el factor H de control del complemento. El fibrinógeno enlazado enmascara los sitios de enlace C3b sobre el estreptococo y que el enlace del factor H inhibe tanto la vía alterna del complemento de convertasa C3, como la vía clásica de convertasa C5. (32)

El genoma de los estreptococos no corresponde a una estructura rígida con información genética estable sino, más bien, a una base muy dinámica que refleja complejos procesos evolutivos. Sus elementos genéticos móviles incluyen plásmidos, elementos de inserción (IS), transposones y sobre todo fagos, lo cual les permite modificar características en las cepas de los estreptococos. (32)

En los estreptococos del grupo A, diversos factores de virulencia son controlados de manera coordinada por el denominado regulón *vir*, el cual responde a las condiciones





CAPITULO II

cambiantes a las que el microorganismo enfrenta durante su proceso infectivo; en su mayoría, la expresión de los genes implicados es regulada positivamente a nivel transcripcional por la proteína Mga (también conocida como VirR o Mry). (22, 32)

Los genes de virulencia controlados por Mga participan trascendentalmente en la adhesión bacteriana, en la invasión y en la evasión del sistema inmune del hospedero. El regulón *vir* incluye a los genes: a) *emm*, que codifica para la proteína M; b) *mrp* (de *M-related protein*, también conocida como *fcr*) y *enn*, que contribuyen a la resistencia fagocitaria, dado que sus productos se unen a la inmunoglobulina IgA; c) *sof* (de *serum opacity factor*), que expresa una proteína que se une a fibronectina; d) *sic*, que sintetiza un inhibidor del complemento; y e) *scpA*, cuyo producto: peptidasa de C5a, inactiva al complemento. (22,32)

Las proteínas de tipo M están codificadas por un complejo de más de 20 genes que componen la superfamilia de genes *emm*. Estos genes son los responsables de codificar la proteína M y otras proteínas que se unen a las inmunoglobulinas (Ig). (22, 32)

El tamaño de las proteínas M varía entre diferentes serotipos y es dependiente del número, tamaño de las unidades o bloques de repetición, provocados por una delección de las secuencias de DNA dentro del gen *emm* y que tiene como consecuencia cambios en la secuencia de aminoácidos, por lo tanto diferentes tamaños de proteína M. Estos cambios en





CAPITULO II

el tamaño de la proteína pueden proveer a la bacteria de alguna ventaja selectiva ya que al cambiar de tamaño, también cambia el carácter antigénico de las moléculas de proteína M, evitando que algunos anticuerpos puedan unirse a ellas y evadiendo su destrucción por el sistema inmune del hospedero. (22)

Algunos estudios revelan que el incremento de las infecciones debidas a esta bacteria está relacionado con la aparición de serotipos tales como, el M1, M3 y M18 que tienen un mayor potencial invasivo y factores de virulencia adicionales como las proteasas y exotoxinas pirogénicas. Los serotipos 1, 5, 6, 12, 19 y 24 se localizan en el área faríngea, mientras que el 31, 49 y 52 son cutáneos. (9, 22, 24)

Muchas cepas de *Streptococcus pyogenes* no son tipificados debido a la falta de expresión o de reactividad de la proteína M con el suero disponible, lo cual puede deberse indudablemente a la manifestación de una nueva proteína M; lo que hace necesario utilizar otra alternativa para la detección del serotipo. (22)

En la actualidad, los avances en la biología molecular y la ingeniería genética han permitido el desarrollo de técnicas para la caracterización de diferentes serotipos de *Streptococcus pyogenes* con base en su gen *emm*. (22)





Las proteínas T y R no están relacionadas con la virulencia, pero también se han empleado para la clasificación en tipos, en especial la proteína T que es sensible al calor. (22, 32)

Un antígeno proteico muy íntimamente asociado con la molécula de proteína M es el denominado factor de opacidad del suero (OF). Este factor es una alfa-lipoproteínasa que se detecta por su capacidad para opacar el suero de caballo. El propio OF es antigénico y específico de cada serotipo es decir, su capacidad para opacar el suero puede inhibirse específicamente por antisuero contra los serotipos M homólogos. Esta sustancia es de importancia por dos razones: en primer lugar, es un marcador epidemiológico útil que ayuda a clasificar a los estreptococos en dos grupos. Los del grupo I tienen un conjunto específico de secuencias de repetición vinculadas con los estreptococos que ocasionan fiebre reumática aguda (células reumatógenas). Los del grupo II producen factor de opacidad que no tienen el mismo conjunto de secuencias de repetición y no causan fiebre reumática. Las respuestas inmunes específicas y no específicas de tipo contra proteína M estreptocócica son generalmente más débiles, en seguida de infección faríngea con los serotipos OF-positivos que con los serotipos OF-negativos. (16)

Otro constituyente de la pared celular, es el ácido lipoteicoico (ALT), un factor importante de virulencia de *Streptococcus pyogenes*; el cual recubre las fimbrias en la superficie del estreptococo. Esta sustancia, tiene una afinidad pronunciada por la unión con las





CAPITULO II

membranas biológicas, que son responsables del primer paso de la colonización y la adherencia de *Streptococcus pyogenes* a la fibronectina en la superficie de una célula epitelial humana, proceso que incluye un enlace débil con ALT seguido por enlaces más fuertes con la proteína M o alguna de diversas proteínas de enlace de fibronectina que se encuentran de manera aleatoria en la superficie del estreptococo. (16, 17)

Streptococcus pyogenes presenta una cápsula de ácido hialurónico, que no es antigénica, pero está dotada de propiedades antifagocitarias. La cápsula trabaja en forma concertada con la proteína M para bloquear la fagocitosis. Este fenómeno se evidencia de manera indirecta, en donde las cepas de estreptococos altamente virulentas forman colonias mucoides. (17, 22)

Cabe señalar que la proteína M y la cápsula estreptocócica son las dos estructuras antifagocitarias clave en los estreptococos; ya que la proteína M permite que los estreptococos resistan la fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares y la cápsula evita la fagocitosis de los estreptococos al proporcionar una barrera física entre las proteínas opsonizantes del complemento que se unen a la superficie de los estreptococos y las células fagocíticas. (14, 17, 18)

Los antígenos T son proteínas de la pared celular de *Streptococcus pyogenes*, resistente a





enzimas proteolíticas, aunque se desconoce su función, los laboratorios de referencia emplean anticuerpos dirigidos contra éstos, como método secundario para la tipificación.

(9,17)

La proteína **F** facilita la unión a las células del huésped predominante en faringe y amígdalas, al formar un complejo con la fibronectina que se encuentra presente en la superficie de las células del huésped. (19)

2.3.3 Productos extracelulares.

Durante el crecimiento *in vitro* o *in vivo*, *Streptococcus pyogenes* produce diversos productos extracelulares, de los cuales sólo se han caracterizado un número limitado de ellos, también libera diversas enzimas al medio, se cree que estas enzimas ayudan a los estreptococos a sobrevivir y diseminarse en diversos nichos del cuerpo. Varios productos extracelulares pueden servir para facilitar la licuefacción de pus y la diseminación de los estreptococos a través de los planos titulares, de los cuales podemos mencionar: (17)

- **Estreptolisina O** se trata de una proteína antigénica, es lábil frente al oxígeno. Es una citotoxina que lisa los leucocitos, eritrocitos y plaquetas, no parece tener actividad





enzimática sino que se inserta directamente en la membrana del huésped, formando poros circulares a través de la membrana de la superficie celular. Es la responsable de la hemólisis en las placas de agar - sangre en profundidad o en condiciones anaerobias. (16, 17, 22)

- **Estreptolisina S** es una hemolisina estable al oxígeno, no inmunogénica y ligada a la célula, que puede lisar eritrocitos, leucocitos y plaquetas; puede estimular también la liberación de los contenidos lisosómicos después de ser englobados, con la subsiguiente muerte de la célula fagocítica. También es la responsable de la hemólisis en placas de agar-sangre de carnero en la superficie de ésta. (16, 17, 22)

- **DNA asa estreptocócica o estreptodornasa** de ésta se han identificado cuatro desoxirribonucleasas distintas (DNAsa A - D). Estas enzimas no son citolíticas, pero pueden despolimerizar el DNA libre presente en pus, este proceso reduce la viscosidad del absceso y facilita la diseminación de los microorganismos. Los anticuerpos que se desarrollaron son los que actúan frente a la DNAsa B, estos son marcadores importantes de las infecciones cutáneas por *Streptococcus pyogenes*, ya que estas enfermedades no suelen acompañarse de elevación de los títulos antiestreptolisina O. (18)

- **Hialuronidasa** también llamada factor de diseminación, ya que favorece la diseminación estreptocócica hacia el interior de los tejidos cuando ocasiona pioderma, porque degrada enzimáticamente el ácido hialurónico que se encuentra en la sustancia





de sostén del tejido conectivo. (18)

- **Estreptocinasa** se trata de una enzima hidrolítica que promueve la disolución de los coágulos al catalizar la conversión de plasminógeno a plasmina, ésta puede ser producida por los estreptococos β -hemolíticos del grupo A y del grupo C. Además de la lisis de los coágulos de sangre, puede ser responsable de la rápida diseminación de *Streptococcus pyogenes* en los tejidos infectados y ocasiona glomerulonefritis en animales. (18)

- **Peptidasa C5a, IgA-asa** protege a los estreptococos al degradar C5a que se produce, ya sea por la vía clásica o alterna del complemento, inactiva a C5a y como consecuencia bloquea la quimiotaxis de los neutrófilos y de los fagocitos mononucleares. Es un mediador en la inflamación al reclutar y activar células fagocíticas, protege a los estreptococos de las propiedades de antiadherencia de las inmunoglobulinas IgA. (17, 18, 22)

- **Exotoxina pirogénica** *Streptococcus pyogenes* produce un grupo de exotoxinas que se conocen como toxinas eritrógenas o exotoxinas pirógenas estreptocócicas (SPE), son producidas por las cepas lisogénicas de los estreptococos y son parecidas a la toxina producida por *Corynebacterium diphtheriae*. Las citocinas median varios efectos





CAPITULO II

importantes, entre los que se incluyen el shock y el fallo multiorgánico que aparecen de manera característica en los pacientes con el síndrome del shock tóxico estreptocócico. Las toxinas son responsables también del exantema que se observa en los pacientes con escarlatina. (17, 18, 22)

Su mecanismo de acción implica su participación como superantígeno, en este sentido, ejerce su perjuicio formando un puente de unión entre el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase II de las células presentadoras de antígeno y los receptores especializados de las células T, que interactúan con dicha molécula. Es decir que, cuando existe una alta concentración de ella en el organismo del hospedero, sus moléculas se unen indiscriminadamente al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase II presente en numerosos macrófagos y linfocitos B así como a gran cantidad de células T cooperadoras. (17, 18, 22)

La reacción generada entre las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T, es similar a la que ocurre normalmente cuando se trata de presentar antígenos comunes, aunque se da de forma indiscriminada y en mucha mayor cantidad; de hecho, se produce un número excesivamente más elevado de parejas linfocito T-macrófago y linfocito T-linfocito B, por lo cual se estimula a 1 de cada 5 células T, en vez de a 1 de cada 10,000 y, consecuentemente, la concentración que se libera de Interleucina-2 (IL-2) es muy dañina y de esta forma presenta una sintomatología de fiebre elevada, náuseas, vómito y malestar





general, independientemente de que se liberan otras citocinas asociadas al estado de shock. (17, 18, 22)

Hasta ahora se han descrito 3 serotipos de la Spe: SpeA, SpeB y SpeC; empero, la mayor parte de los casos de TSLS (Toxic Shock-Like Syndrome) y de otras enfermedades estreptocócicas invasivas se asocian a aislamientos que sintetizan la SpeA, la cual a su vez no se detecta en las cepas causantes de padecimientos menos serios. (16, 17, 18)

Lo anterior sugiere que la SpeA podría ser la responsable de la TSLS (Toxic Shock-Like Syndrome); sin embargo, algunos estudios han establecido que dicha toxina no es producida por todos los aislamientos provenientes de las formas más graves de la enfermedad estreptocócica. (16, 17, 18)

Otros Productos extracelulares conocidos son la nicotinamida adenina dinucleotidasa (NADasa), la proteinasa, la amilasa y la estearasa. La mayoría de estos productos son antigénicos. (16, 17, 18)

2.3.4 Mecanismos de patogenicidad.

La virulencia de *Streptococcus pyogenes* está determinada por su capacidad de adherirse e invadir las células epiteliales, así como evitar la opsonización y la fagocitosis, además de





CAPITULO II

producir una variedad de toxinas y enzimas. (18)

El primer paso para la infección por *Streptococcus pyogenes* es la colonización de la faringe, por medio de sus factores de adherencia a las células epiteliales, donde están involucrados los pili, la proteína M, así como el ácido lipoteicoico (ALT). El segundo paso es la invasión de las células epiteliales, proceso que está mediado por la proteína M, el cual es importante tanto para el mantenimiento de las infecciones persistentes (faringitis estreptocócica recurrente) como para la invasión de tejidos profundos. Tras la unión y la multiplicación, se produce el daño epitelial, sin embargo la invasión ocurre a través de fisuras epiteliales. (18)

La proteína M desempeña un papel clave ya que permite el establecimiento de la infección estreptocócica. Las cepas que la contienen pueden resistir la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares. El mecanismo de resistencia a la fagocitosis se debe al fracaso de C3b

generado a través de la vía alterna del complemento, por lo que impide que sea reconocida la superficie de los estreptococos productores de la proteína M. En presencia de anticuerpos específicos de tipo anti-M, se produce la opsonofagocitosis y los estreptococos mueren con rapidez. (18)

Puesto que el epitelio de la faringe se encuentra protegido por la acción de la saliva, las bacterias que colonizan dicha región anatómica deben ser capaces de adherirse a las células





CAPITULO II

de la mucosa. (18)

Adicionalmente, otra proteína superficial de reciente descubrimiento, denominada F, aparenta mediar en la adherencia a células faríngeas, por lo que se considera que podría representar la principal adhesina estreptocócica: la proteína F se une a la fibronectina, una molécula proteica que forma parte de las células faríngeas y de muchos otros tejidos del organismo. De hecho, las mutantes a las que se eliminó el gen que codifica para la proteína F perdieron eficacia para adherirse a cultivos de células epiteliales. (19)

Los síntomas de la faringoamigdalitis estreptocócica se deben principalmente a la capacidad de *Streptococcus pyogenes* para inducir una intensa respuesta inflamatoria, la cual podría explicarse con base en la participación de dos tipos de productos bacterianos: el primero incluye a las enzimas hidrolíticas tales como: hemolisinas, proteasas, DNAsas y estreptoquinasas, que contribuyen al daño tisular y, por ende, provocan inflamación; el segundo, abarca a los fragmentos del peptidoglicano y del ácido lipoteicoico (ALT), ya que ambos disparan la activación del complemento y la liberación de citocinas. (16, 17, 18, 19)

La invasión intracelular por parte de este microorganismo depende de al menos dos moléculas bacterianas de superficie: las proteínas M y las proteínas afines a la fibronectina; las primeras desempeñan varios papeles en su patogenicidad, destacando la resistencia a la fagocitosis, la adherencia y la invasión intracelular, en tanto que, las segundas, también





podrían fungir como adhesinas e invaginas. (16, 17, 18, 19)

2.3.5 Enfermedades causadas por *Streptococcus pyogenes*

De acuerdo a la zona donde se localizan se pueden clasificar en cuatro:

1) Infección localizada en la piel: como la piodermitis y el impétigo, que afectan principalmente a niños en edad preescolar y escolar. Los estreptococos penetran a través de piquetes de insectos, abrasiones o áreas de infestación por ácaros y multiplicándose dentro de la epidermis.

2) Infecciones con localización visceral: como meningitis y endocarditis, que surgen cuando el estreptococo por vía linfática o sanguínea produce infecciones en diversos órganos.

3) Infecciones generalizadas: como las sepsis estreptocócicas que generalmente es a partir de heridas.

4) Infecciones en las mucosas: como faringitis, otitis, sinusitis y abscesos, que generalmente se producen cuando *Streptococcus pyogenes* coloniza e infecta los sitios que producen dichas enfermedades. (16, 17, 18)





Faringitis estreptocócica: se caracteriza por tener la faringe enrojecida y muchas veces recubierta por un exudado amarillento, en el que predominan polimorfonucleares. En la sintomatología se presenta dolor de garganta, malestar general, fiebre (38.9-40°C) y cefalea, donde se afectan los pilares amigdalinos, la úvula y el paladar blando, que aparecen enrojecidos, tumefactos y cubiertos por un exudado amarillo blanquecino. Los ganglios cervicales que drenan la zona también aparecen tumefactos y dolorosos. (16, 17, 18)

Erisipela: se caracteriza por una erupción de una placa eritematosa purpúrea de extensión variable, con dolor y prurito. La localización más frecuente es en la cara, pero puede aparecer en cualquier parte del cuerpo, suele acompañarse de linfadenopatía regional y signos de toxicidad sistémica. La enfermedad se inicia con fiebre, cefalea, escalofrío, vómito y confusión mental. La lesión se observa rojo brillante que hace su aparición en el segundo día y crece con rapidez y en forma irregular; conforme la lesión aumenta, tiende a aclararse en la parte media, aunque es posible que se formen bulas y vesículas. El margen de avance de la lesión está bien definido y se encuentra un poco elevado, esta afecta en especial a niños y a individuos de edad avanzada. (16, 17, 18)

Fasciitis necrosante: es una infección que ocurre en el tejido subcutáneo profundo la cual es caracterizada por una destrucción masiva del músculo y grasa a lo largo de los planos faciales, aunque en ocasiones no altera el tejido epitelial que se encuentra, además como los





CAPITULO II

nervios que pasan a través de la fascia superficial se destruyen, la herida se halla anestesiada. En algunos casos el traumatismo precipitante altera la integridad cutánea (como ocurre con piquetes de insecto, lesiones por varicela y laceraciones); en otros casos, se presenta tras un hematoma intenso o un tirón muscular sin alteración de la integridad de la piel. (16, 17, 18)

Fiebre escarlatina: se caracteriza por presentar una erupción o un eritema difuso con manchas rojas puntuales, se disemina al tronco, al abdomen y a las extremidades. Es más intensa en ingles y axilas. La cara se observa enrojecida excepto en torno a la boca (palidez circunmoral) y la lengua esta recubierta y tiene papilas de gran tamaño que le confieren la

apariencia de “lengua de fresa”. Esta erupción desaparece de dos a cinco días y deja una descamación fina. Aunque la erupción de la fiebre escarlatina es bastante característica, se observan erupciones semejantes en diversas enfermedades virales así como el síndrome de choque tóxico y el síndrome estreptocócico tóxico. Siendo un cultivo faríngeo la norma de oro para el diagnóstico de la faringitis estreptocócica y la fiebre escarlatina, ésta se produce cuando un paciente está infectado con una cepa de *Streptococcus pyogenes* que libera las exotoxinas pirogénicas A principalmente y C (codificadas en bacteriófagos), ésta se inicia como una erupción en el cuello, por lo general 24 a 48 horas tras el inicio de la faringitis estreptocócica. (16, 17, 18)

Fiebre reumática aguda: se caracteriza por fiebre e inflamación de las articulaciones, el





CAPITULO II

corazón, el tejido subcutáneo y el Sistema Nervioso Central. Las manifestaciones clínicas principales incluyen carditis, nódulos subcutáneos, corea y poliartritis migratoria. De forma típica, los ataques comienzan 3 semanas después de una faringitis por *Streptococcus pyogenes*, y en ausencia de tratamiento antiinflamatorio duran de 2 a 3 meses. A lo largo de ese periodo, las manifestaciones clínicas varían en cuanto a gravedad en los distintos momentos. La manifestación más grave de la fiebre reumática y la única que puede producir incapacidad a largo plazo, es la carditis, que afecta el tejido conectivo y el endocardio, sobre todo de las válvulas cardíacas. El examen clínico revela cardiomegalia, soplos valvulares y derrames, que reflejan la lesión endocárdica, miocárdica y epicárdica, que pueden provocar insuficiencia cardíaca aguda o lesiones crónicas. (16, 17, 18)

Se ha demostrado que algunos de los anticuerpos reaccionan tanto con tejidos cardíacos como con antígenos estreptocócicos. Los anticuerpos dirigidos contra componentes de la pared y de la membrana celular estreptocócicas dan reacción cruzada con las vainas del sarcoma cardíaco, el músculo liso de las paredes vasculares y las células del endocardio. Se ha demostrado que los fragmentos de la proteína M de un serotipo íntimamente asociado a la fiebre reumática poseen epítomos que dan reacción cruzada con las membranas del sarcolema del corazón humano. Los estudios de homología genética entre diferentes tipos M de estreptococos del grupo A sugieren que los dominios conservados de la molécula de proteína M pueden ser responsables de la reacción cruzada con antígenos cardíacos, mientras que los dominios variables le conferirían sus propiedades antifagocitarias





específicas. (31)

Endocarditis: se caracteriza por presentar lesiones inflamatorias no supuradas que afectan principalmente el corazón, las articulaciones, los tejidos subcutáneos y el Sistema Nervioso Central. En su forma clásica, el trastorno es agudo, febril y en su mayor parte autolimitado. Sin embargo, puede ocurrir daño de las válvulas cardíacas, y dicho daño puede ser crónico y progresivo y conducir a insuficiencia cardíaca severa. (31)

También se ha descrito una reacción cruzada entre el polisacárido del grupo A y una glucoproteína aislada de las válvulas cardíacas. Estas observaciones guardan relación con la intensa respuesta inmune humoral, de los pacientes con fiebre reumática frente a una variedad de productos estreptocócicos. Dichos individuos muestran también un aumento de la inmunidad mediada por células frente a los antígenos estreptocócicos. En los corazones humanos se encuentra un patrón de reacción celular, consistente en agregación de linfocitos y macrófagos alrededor de depósitos fibrinoides. Esta lesión, denominada nódulo de Aschoff, es característica de la carditis reumática. La endocarditis es la causa más frecuente de muerte cardiovascular en niños y adultos jóvenes en el mundo. (31)

Glomerulonefritis aguda: es caracterizada desde el punto de vista clínico por edema, hipertensión, hematuria y proteinuria, y desde el punto de vista patológico por lesiones proliferativas difusas de los glomérulos. (16)





La glomerulonefritis postestreptocócica puede seguir a infecciones respiratorias o cutáneas por *Streptococcus pyogenes*. Sólo guarda relación con ciertas cepas, conocidas por los epidemiólogos como *nefritogénicas*. En la patogenia de la glomerulonefritis aguda parecen participar mecanismos inmunológicos. En los glomérulos enfermos se han identificado inmunoglobulinas, componentes del complemento y antígenos que reaccionan con anticuerpos dirigidos contra *Streptococcus pyogenes*. (16)

La agresión renal puede estar causada por reacción cruzada entre el tejido del riñón y anticuerpos antiestreptocócicos, pero es más probable que se deba al simple depósito en el glomérulo de complejos antígeno-anticuerpo, con activación del complemento y reacción inflamatoria consiguiente. Tales complejos se han identificado en el suero durante la enfermedad aguda, así como en el glomérulo, formando depósitos discretos junto con componentes del sistema complemento. (16)

Los niveles de complementos en suero son bajos. Los títulos de anticuerpos a DNA-asa B, hialuronidasa y DNA-asa suelen ser altos, pero a menudo los títulos anti-estreptolisina O permanecen normales. (16)

Lógicamente, los inmunocomplejos, observados generalmente en los glomérulos, inducen una respuesta inflamatoria que ataca al tejido renal e interfiere la función de los riñones; por ello, es común detectar la reducción de C3 y de otros componentes del complemento en





los individuos afectados. (16)

Los pacientes con este diagnóstico presentan anticuerpos dirigidos contra laminina, colágena y otras moléculas localizadas en la membrana basal del glomérulo, las cuales también comparten determinantes antigénicas con la proteína estreptocócica M12. De este modo, la enfermedad inicia con una nefritis infecciosa y, en una segunda etapa, la reactividad cruzada entre los glomérulos y la proteína M promueve la producción de anticuerpos antiglomerulares. (16)

2.4 Diagnóstico bacteriológico

El diagnóstico bacteriológico, se basa en el aislamiento e identificación del (los) agente (s) etiológico (s), en los productos obtenidos de los pacientes con alguna sintomatología o lesión sugerente de alguna infección microbiana. Por lo que es importante que los patógenos aislados sean identificados correctamente en el laboratorio, ya que es necesario administrar un tratamiento eficiente al paciente infectado y no sólo para controlar la infección, sino también para prevenir complicaciones potencialmente serias. (22)

El diagnóstico definitivo de cualquier agente etiológico se da con el aislamiento o la detección de este, el cultivo sigue siendo el método de elección para lograr el aislamiento





del patógeno a partir del producto biológico. Para el diagnóstico bacteriológico de *Streptococcus pyogenes* en vías respiratorias altas, la toma de muestras debe ser selectiva y obtenerse en condiciones lo más asépticas posible, para evitar así la contaminación por estreptococos de la piel y mucosas, la obtención de la muestra se hace por medio de un frotis faríngeo con un hisopo estéril en faringe o amígdalas. El transporte y cultivo deben efectuarse lo más rápidamente posible, ya que la supervivencia del estreptococo fuera de las mucosas es de entre 1 y 3 horas. (22)

El cultivo sigue siendo el método de elección para lograr el aislamiento del producto patológico (exudado faríngeo), el cual se siembra por agotamiento en placas de agar sangre de carnero. Tras la incubación de 24 horas, se realiza la tinción de Gram a las colonias β -hemolíticas para observar morfología, agrupación y su afinidad por los colorantes de Gram, que en el caso de los estreptococos esto debe ser: cocos en cadenas, Gram positivos. Aunque la identificación de especie se realiza a través de pruebas bioquímicas y/o serológicas. (25)

2.5 Métodos de Identificación

En la actualidad existe una gran cantidad de métodos de identificación microbiana que van desde la observación de características morfológicas, microscópicas y bioquímicas hasta los





CAPITULO II

métodos moleculares. El diagnóstico presuntivo de género se efectúa por el aspecto macroscópico de las colonias, así como por la prueba de la catalasa. Esta prueba detecta la presencia de enzimas capaces de convertir el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, si se produce un burbujeo intenso cuando se agrega a la colonia una gota de peróxido de hidrógeno al 3%, se dice que el microorganismo en estudio es catalasa positivo. Los estreptococos no producen burbujas con este reactivo y por lo tanto son catalasa negativos, lo que nos permite diferenciarlos de otros cocos Gram positivos como los *Staphylococcus*. (9, 18, 22)

El *Streptococcus pyogenes* se identifica por producir β -hemólisis y susceptibilidad a la bacitracina de 0.04 U, resistencia a Trimetoprim Sulfametoxazol (SXT) 0.25 μ g. (9, 18, 22)

Se deben tener ciertas precauciones para realizar las pruebas de susceptibilidad, donde destaca la de asegurarse de no colocar discos que contengan una mayor concentración de bacitracina o de Trimetoprim Sulfametoxazol (SXT), no leer después del tiempo señalado y la de considerar que este método de identificación tiene una confiabilidad aproximada de 85%. (9, 18, 22)

La distinción entre *Streptococcus pyogenes* y otros estreptococos β -hemolíticos se puede llevar a cabo de manera rápida, mediante la demostración de la presencia de la enzima L-pirrolidonil arilamidasa (PYR). Esta enzima hidroliza la L-pirrolidonil β -naftilamida,





liberando β -naftilamina, que se detecta en presencia de p -dimetilaminocinamaldehído por la formación de un compuesto rojo. La ventaja de esta prueba específica es que lleva menos de 1 minuto determinar si la reacción es positiva (*Streptococcus pyogenes*) o negativa

(*Streptococcus anginosus*). (18)

2.5.1 Pruebas serológicas

En la actualidad se dispone de técnicas para detectar pequeñas cantidades de antígenos y anticuerpos en líquidos corporales con mayor rapidez, dentro de las cuales podemos citar:

(14, 17, 19, 23)

Técnicas de precipitación: Se basan en la propiedad de la unión antígeno-anticuerpo, la especificidad de esta unión puede manifestarse visiblemente por medio de la precipitación. Esta reacción puede ocurrir directamente en el estado líquido o puede tener lugar en una matriz de gel, en donde se combinan los dos reactivos. (3, 15, 20, 26)

Reacción de precipitación en tubo. Si en un tubo de ensayo se introduce un antígeno y el suero dirigido contra ese antígeno y se forma un precipitado en el plano, donde se encuentran estas dos soluciones en determinadas condiciones se lleva a cabo la reacción antígeno-anticuerpo, esto quiere decir que el complejo antígeno-anticuerpo se inestabiliza y





precipita. La intensidad de reacción se puede medir porque el precipitado formado es fácilmente detectable y cuantificable. (2, 20, 26)

Reacción de precipitación en geles. Una de las primeras condiciones sobre las reacciones antígeno-anticuerpo se refiere a su capacidad para precipitar cuando se combinan en proporciones de equivalencia o cercanas a ellas. Al efectuar estas reacciones en geles de agar, es posible distinguir distintas interacciones antígeno-anticuerpo producidas por las diferentes poblaciones de anticuerpos presentes en el antisuero. Cuando un antígeno y un anticuerpo se introducen en un medio gelatinoso en puntos diferentes, allí se difunden y pueden formarse precipitados en el punto en que se encuentran las dos soluciones, solamente cuando la proporción entre concentraciones de antígeno y anticuerpo se prestan para ello. Estos métodos se han extendido para examinar la relación entre diferentes antígenos. (2, 23, 26)

Contrainmunolectroforesis. En esta técnica se combinan los principios de electroforesis e inmunodifusión. En un medio con solución amortiguadora apropiada con concentraciones iónicas y pH, las proteínas (incluyendo antígenos y anticuerpos) adquieren cargas negativas y migran hacia el ánodo en el campo eléctrico. Los anticuerpos al poseer carga negativa mucho menor y un potencial eléctrico casi neutro son barridos hacia el cátodo, por el flujo contra-endosmótico de los iones del buffer. Cuando los antígenos y anticuerpos viajan a través del gel, en algún punto se encuentran, y si los antígenos son específicos para el anticuerpo conocido, se forma una banda de precipitación neta. Una de las principales





restricciones es que el antígeno y la inmunoglobulina deben tener cargas iónicas opuestas en el pH del sistema regulador que se utiliza. El movimiento de las gammaglobulinas se realiza a pH 8.6, por lo tanto la prueba está limitada a antígenos con un punto isoeléctrico ácido. Por fortuna los virus, las cápsulas polisacáridas de bacterias, las nucleoproteínas y varios antígenos llenan esta restricción. Esta técnica puede ser usada para el agrupamiento de estreptococos de Lancefield. (3, 14, 26)

Pruebas de aglutinación. Cuando el antígeno se encuentra unido o forma parte de células bacterias o partículas, la reacción antígeno-anticuerpo puede ser detectada por el aglutinado celular o bacteriano formado, que es fácilmente visible. Las bacterias fueron los primeros antígenos que se utilizaron en pruebas de aglutinación. (3, 20, 26)

Aglutinación bacteriana. La aglutinación de bacterias patógenas por anti-sueros, es una de las pruebas serológicas más antiguas de que se disponen en los laboratorios clínicos. Se puede obtener por dos vías: 1) identificación de bacterias desconocidas mediante anti-sueros conocidos, 2) los anticuerpos del suero de un paciente se pueden identificar mediante el uso de una bacteria conocida. (3, 20)

Aglutinación en látex. Las partículas de látex sirven como transporte para la unión de los anticuerpos bacterianos. Por ende, la suspensión látex-anticuerpo puede ser utilizada para detectar antígenos homólogos en los líquidos corporales, lo que brinda un medio rápido y





directo para el diagnóstico de ciertas enfermedades infecciosas. Las ventajas de la prueba de aglutinación en látex para esta aplicación son la rapidez del procedimiento, el bajo grado de aglutinación no específica y una reacción final sensible y claramente visible. (2, 14, 26)

Coaglutinación. Es una variante de la aglutinación inmunológica, la cual se basa en que las cepas de *Staphylococcus aureus* que poseen la proteína A de superficie se unen a las regiones Fc de las moléculas del anticuerpo, dejando sus regiones Fab libres para que se fijan a sus antígenos específicos. Mezclando una suspensión de las bacterias en estudio con las de *Staphylococcus aureus* que porte los anticuerpos adecuados, se producirá la aglutinación de las bacterias mezcladas (coaglutinación) para formar partículas visibles. Este es un procedimiento ampliamente utilizado para propósitos tales como la agrupación de Lancefield de los estreptococos y la identificación de gonococos y otros microorganismos. Esta es una prueba sencilla y rápida. (3, 14, 26)

Técnicas de fluorescencia. Para la realización de estas técnicas, el anticuerpo se marca con fluoresceína pudiéndose conocer la unión del complejo antígeno-anticuerpo a través del seguimiento de la fluorescencia emitida por el mismo. (20, 26)

Inmunofluorescencia. Es un método que utiliza la propiedad que tienen ciertas sustancias de emitir luz (fluorescencia) cuando son excitadas con energía radiante. Se emplea para la





CAPITULO II

identificación y localización de antígenos de superficie de células y tejidos, para esto se emplean anticuerpos marcados con moléculas fluorescentes y preparados frente a la proteína que se desea detectar. El examen de hisopados de garganta mediante la técnica de anticuerpos fluorescentes directos se utiliza en muchos laboratorios para la rápida identificación de estreptococos del grupo A. (14, 20, 23, 26)

Técnicas de radioinmunoensayo: En estas técnicas al anticuerpo se une un isótopo radiactivo, siendo posible la cuantificación del complejo antígeno-anticuerpo a través de la radiactividad emitida. (20, 26)

Radioinmunoanálisis. Es extremadamente sensible para detectar antígenos y anticuerpos, de ahí que se emplee esencialmente para la determinación de sustancias cuyas concentraciones son inferiores a 10 microgramos por mililitro (hormonas, enzimas, etc.); además de ser muy económica con respecto al uso de reactivos, permite realizar un gran número de pruebas en un tiempo relativamente corto. (20, 23, 26)

El radioinmunoanálisis se basa en la competencia establecida entre la sustancia a cuantificar y cantidades conocidas que se añaden de la misma sustancia marcada con un isótopo, para unirse a anticuerpos preparados frente a ella. Al establecerse esta competición resulta que a mayor cantidad de sustancia a cuantificar, menor será la cantidad de sustancia radiactiva que se une al anticuerpo, y a la inversa, a menor cantidad de sustancia a





cuantificar mayor será la cantidad de sustancia radiactiva que se une al anticuerpo. (20, 26)

Técnicas de inmunoensayo: En estas técnicas al anticuerpo se une una enzima, siendo posible la cuantificación del complejo antígeno-anticuerpo a través de la acción que dicha enzima ejerce sobre un sustrato, cuyos cambios son fácilmente cuantificables. (20, 26)

Inmunoensayo. Esta técnica también se conoce como prueba de ELISA (Enzyme-Linked Immunospecific Assay). En ella la identificación del complejo antígeno-anticuerpo se hace mediante el empleo de enzimas, unidas al antígeno o bien unidas al anticuerpo. La enzima se detecta al añadir el sustrato correspondiente y observar los cambios que en éste se producen. Generalmente se eligen enzimas que inducen en el sustrato cambios de coloración en el complejo antígeno-anticuerpo, detectándose fácilmente por colorimetría la presencia de la enzima. En el método de ELISA, la enzima cataliza un cambio en una molécula que le sirve de sustrato, pero la enzima por sí misma no es consumida en este procedimiento. (3, 20, 26)

Esta técnica se utiliza para la medición de hormonas, anticuerpos VIH, antígenos de hepatitis B y otras muchas sustancias que se encuentra en muy bajas concentraciones. (20, 26)

Modificaciones para microscopía electrónica. Una variación del anticuerpo marcado como reactivo histoquímico, en la microscopía visible y electrónica es la utilización de





inmunoglobulinas, marcadas con partículas de oro como reactivos histoquímicos. Los inmunoensayos enzima-ligados que generan productos electroopacos. (3, 20, 26)

La proteína A de *Staphylococcus aureus* se une a las inmunoglobulinas IgG e IgM humanas, en consecuencia, cualquier marca aplicada a la proteína A, ya sea un isótopo, enzima, fluor, oro coloidal u otra, crea un rastreo para las inmunoglobulinas IgG e IgM. Esto elimina la inmunización, purificación y prueba de antiglobulinas marcadas, debido a que la proteína A se purifica con facilidad a partir de la bacteria *Staphylococcus aureus*, donde se presenta como una proteína de superficie. (3, 20, 26)

2.5.2 Métodos moleculares.

Actualmente las técnicas moleculares se utilizan para muchas disciplinas de las ciencias biológicas y se usa como una herramienta en los métodos de identificación. Tienen como propósito el contribuir en la determinación del tratamiento óptimo de los padecimientos infecciosos, a fin de que los enfermos involucrados recuperen su salud a la brevedad posible y dejen de fungir como fuentes de contagio para otros individuos. (1, 2, 3, 5)

En este sentido, las técnicas de biología molecular representan la herramienta diagnóstica más confiable, ya que establecen con exactitud la presencia de los agentes etiológicos en los diversos especímenes clínicos, con base en la detección de segmentos de DNA





CAPITULO II

específicos de cada microorganismo. (1, 2, 3, 5, 22)

Dentro de las técnicas de biología molecular se encuentran algunas que son nuevas y otras que han sido adoptadas de otros campos de la ciencia, como la genética microbiana. Las más importantes son:

Endonucleasas de restricción. Una enzima de restricción (o endonucleasa de restricción) es una enzima que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y cortar el ADN en ese punto en concreto llamado sitio o diana de restricción o en un sitio no muy lejano a este, dependiendo de la enzima. Los sitios de restricción cuentan entre 4 y 12 pares de bases, con las que son reconocidos. (3, 5, 22)

El mecanismo de corte de DNA se realiza a través del rompimiento de 2 enlaces fosfodiéster en la doble hebra, dando lugar a dos extremos de DNA, que pueden ser romos (cuando los enlaces rotos coinciden) o cohesivos/escalonados. Estos últimos tienden a volver a unirse espontáneamente, ya que los extremos se pueden unir a otros extremos coincidentes que estén en la cercanía (Apareamiento de Watson & Crick). (1, 2, 3, 5, 22)

Los fragmentos de ADN obtenidos de este modo pueden unirse por otras enzimas llamadas ligasas. Conocemos así el ADN vector, que sería aquel que es capaz de replicarse independientemente del ADN de la célula anfitriona en la cual crece. Dentro de este grupo de *vectores* están los plásmidos, moléculas circulares de ADN halladas en las bacterias.





CAPITULO II

(1, 2, 3, 5, 22)

Las enzimas de restricción que a pesar de ser distintas y provenir de distintas especies, tienen la misma secuencia de reconocimiento y dejan el mismo extremo cohesivo, pero no cortan en el mismo sitio, son llamadas Isoesquizómeros. Muchas bacterias producen nucleasas de restricción, que las protegen, degradando las moléculas de DNA que han sido transportadas al interior de las bacterias por los virus, estas se encuentran en numerosas especies bacterianas y se denominan así porque restringen el crecimiento de virus parásitos de bacterias (bacteriófagos). El mecanismo se basa en cortar la molécula de ADN de bacteriófagos y de esta manera se elimina el bacteriófago. El tipo de corte es muy específico ya que corta solamente una secuencia de bases determinada para cada enzima de restricción, pero en la naturaleza esto ocurre exclusivamente en el ADN de los bacteriófagos y no ataca al ADN de la propia bacteria, porque simultáneamente los sitios o secuencias que reconoce la enzima han sido modificados (metilados) en el ADN de la bacteria. (2, 5, 26)

Esta técnica se utiliza para caracterizar la organización del ADN que rodea a una secuencia específica de ácidos nucleicos. Se han purificado muchas nucleasas de restricción de diferentes especies bacterianas y actualmente existen más de 100 de estas enzimas comercializadas, la mayoría de las cuales reconocen diferentes secuencias de nucleótidos.

(17, 22)





DNA homólogo o complementario. Es un proceso de unión de dos hebras complementarias de ácidos nucleicos pero cuyo origen es distinto. Una de ellas será el ácido nucleico diana y la otra será la sonda empleada para localizar ese ácido nucleico diana. Una sonda es un fragmento monocatenario de DNA o RNA marcado con una molécula presentadora, y que se emplea para el reconocimiento específico de una molécula determinada de ácido nucleico diana de cadena sencilla, en un proceso de hibridación. (3, 5, 22)

Hibridación en solución: La sonda y el ácido nucleico diana se encuentran en una solución líquida. Las condiciones de hibridación deben ser rigurosas. La velocidad de formación del duplex en estas condiciones es alta. El problema de este tipo de hibridación es la eliminación de la sonda que no ha reaccionado, empleándose entre otros métodos la precipitación con tricloroacético - nucleasa S1 o el ensayo de protección e hibridación. (3, 5, 22)

Hibridación en fase sólida: El ácido nucleico diana o bien la sonda se encuentran inmovilizados en filtros. Estos pueden ser de nitrocelulosa (fijación por calor) o de nylon (fijación por luz ultravioleta). Una vez realizada la fijación se añade la sonda marcada que buscará su secuencia complementaria en el ácido nucleico diana que queremos identificar. La sonda que no reacciona, híbridos inestables o uniones inespecíficas son eliminados mediante lavados. Su sensibilidad es menor que la hibridación en solución. (3, 5, 22)





Actualmente también se ha conseguido fijar los ácidos nucleicos al plástico de las placas de microtitulación. (3, 5, 22)

Existe un tipo de hibridaciones en fase sólida que son muy empleadas en Biología Molecular: Southern blot (DNA cortado con enzimas de restricción e hibridado con una sonda de DNA) y Northern Blot (RNA separado e hibridado con sondas de DNA o RNA). Estas técnicas consisten en una separación inicial de las moléculas con base en su peso molecular mediante electroforesis, transferencia capilar de estas moléculas a un filtro de papel o de nylon, fijación, hibridación con la sonda de interés y detección. (17, 22)

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Es un método rápido que da gran exactitud y precisión para copiar y amplificar secuencias específicas (entre 4 y 8 pares de bases en general). Otra gran ventaja es que la secuencia a copiar (ADN matriz o templado) puede

estar en muy pocas e incluso en una sola molécula, es decir, que se puede amplificar el ADN partiendo de una sola célula o de unas pocas células. También puede utilizarse esta técnica para detectar e incluso cuantificar en algunos casos, la presencia de determinadas secuencias de ADN en una muestra, por ejemplo la presencia de secuencias virales en una muestra clínica. (11, 26)

La técnica de PCR se basa en el mecanismo usual de replicación del ADN, en sus





CAPITULO II

propiedades de hibridación y en la presencia de enzimas de síntesis de ADN (polimerasas) en bacterias termofílicas, que son resistentes a altas temperaturas (70 °C – 90 °C). (11, 26)

Para utilizar este método es necesario conocer la secuencia de una proporción corta de ADN en cada extremo de la secuencia que se quiere copiar. Estas secuencias cortas se utilizan para especificar sondas. El método consiste en una reacción enzimática en cadena que durante varios ciclos duplica filamentos complementarios de ADN, para esta reacción es necesario utilizar iniciadores oligonucleótidos sintéticos complementarios a pequeñas secuencias en filamentos opuestos de ADN. Posteriormente es necesario detectar el producto amplificado, de manera que se determine en forma precisa su tamaño y pureza. (11, 26)

Puede hacerse por corrimiento electroforético en geles de agarosa o poliacrilamida o bien por medio de la técnica de Southern blot, metodología que permite establecer el origen del

ADN proveniente de una muestra clínica. (11, 23).

Los fragmentos de ADN son identificados por electroforesis en un gel de agarosa, por su tamaño o número de pares de base que presenta cada uno. (29)

TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN





CAPITULO II

El tratamiento de la faringitis estreptocócica con penicilina reduce el estímulo antigénico, y provoca una disminución en la tasa de ataques de fiebre reumática y glomerulonefritis aguda. El control de la infección reduce la diseminación a otras personas. (10, 20, 23, 25)

Cuando aparecen brotes epidémicos de faringitis estreptocócica, la terapia profiláctica ayuda a impedir la diseminación del microorganismo entre la población; sin embargo, esta medida no resulta exitosa en todos los casos, ya que las cepas pueden haber adquirido resistencia contra el fármaco más utilizado: la penicilina. (10)

Evidentemente, la lógica de emplear antibióticos indiscriminadamente también presenta amplias desventajas, ya que la mayor parte de las faringitis es causada por virus y éstos no son agentes etiológicos de fiebre reumática ni de glomerulonefritis. En consecuencia, la acción más recomendable consiste en realizar pruebas de laboratorio antes de establecer terapia con antibióticos aunque, desafortunadamente, numerosos médicos insisten en su muy cuestionable habilidad para distinguir las faringitis bacterianas con base en los síntomas del paciente. (10, 20, 23)

Comúnmente, la penicilina es el antibiótico seleccionado para instituir la terapéutica, no obstante, la eritromicina representa una opción adecuada, cuando el paciente es hipersensible o alérgico a ella o la cepa es productora de β -lactamasas se aconseja como alternativa el uso de una cefalosporina oral. Las dosis asociadas a individuos con fiebre





CAPITULO II

reumática deben ser mayores pero, sobre todo, mucho más prolongadas, a fin de evitar infecciones recurrentes que conduzcan a la aparición de lesiones cardíacas. Afortunadamente, la mayoría de las cepas de *Streptococcus pyogenes* continúa siendo susceptible a la penicilina. (10, 20, 23)

El caso de portadores sanos puede ser consecuencia de un mal cumplimiento del tratamiento prescrito, de la reinfección con una nueva cepa, de un estado de portador permanente, o a la persistencia de cepas que invaden las células epiteliales donde puede resistir el tratamiento. En estos casos las las penicilinas orales no son muy recomendables en el tratamiento de infecciones estreptocócicas debido a que el paciente deja de tomarlas en cuanto la sintomatología cede. (20, 23)





3. OBJETIVOS

- Aislar e identificar *Streptococcus pyogenes* a partir de exudados faríngeos en infantes de 3 escuelas (Escuela Reino de Jordania, Escuela Manuel Acosta plantel sur y Escuela Educación para Todos).
- Determinar la frecuencia de *Streptococcus pyogenes* en la población estudiada.
- Determinar el serotipo de las cepas de *Streptococcus pyogenes* presentes en la población estudiada.





4. PARTE EXPERIMENTAL

A. Material

a) Material biológico

- ❖ Exudados faríngeos de 117 infantes de 5 a 10 años de la población de las siguientes escuelas: Escuela Reino de Jordania (51), Escuela Maestro Manuel Acosta plantel sur (22) y Escuela educación para todos (44).

- ❖ *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

- ❖ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

B. Material y equipo de laboratorio

b.1) Material de uso común en el laboratorio

b.2) Equipo

- ❖ Agitador magnético (Thermolyne)
- ❖ Autoclave (HIRAYAMA modelo HA 300MII)





- ❖ Balanza granataria (OHAUS)
- ❖ Campana de flujo laminar (VECO)
- ❖ Horno (RIOSSA)
- ❖ Incubadora (RIOSSA modelo EC 37° C \pm 2° C)
- ❖ Microscopio óptico (ZEISS)
- ❖ Refrigerador (AMERICAN 4° C \pm 2° C)
- ❖ Ultracongelador (REVCO - 70° C)
- ❖ Potenciómetro (CONDUCTRONIC)
- ❖ Vórtex
- ❖ Transiluminador de luz ultravioleta MacroVue UVis-20 (Hoefer)
- ❖ Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- ❖ Cámara de electroforesis
- ❖ Software Kodak 1D 3.5v

C. Medios de cultivo

- ❖ Base de agar sangre (Bioxón)
- ❖ Caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón) (Bioxón)





D. Reactivos

- ❖ Sangre de carnero desfibrinada
- ❖ Colorantes de Gram
- ❖ H₂O₂ 3 %
- ❖ Discos de bacitracina 0.04 U TIPIBACT A (BIO-RAD)
- ❖ Gel de agarosa (Research Organics)
- ❖ Bromuro de etidio (Research Organics)
- ❖ Buffer 1X de Tris-Boratos-EDTA (TBE)
- ❖ Marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen)
- ❖ Enzimas de restricción *DdeI* (Invitrogen)
- ❖ Buffer 3 React (Invitrogen)

E. Kits

- ❖ Kit comercial Pastorex Strip (BIO-RAD)
- ❖ Kit comercial DNAeasy Tissue (QIAGEN)





METODOLOGÍA

Para el desarrollo de este trabajo se tomaron exudados faríngeos en infantes entre 5 y 10 años de edad en tres diferentes escuelas de la Ciudad de México: Escuela Reino de Jordania (51), Escuela Maestro Manuel Acosta plantel sur (22) y Escuela educación para todos (44).

Para la toma de la muestra en estas escuelas se solicitó el permiso correspondiente a las autoridades de cada una de ellas; después de tener una respuesta afirmativa, se envió una circular a los padres de familia, en la que se les daba a conocer el estudio que se iba a realizar a sus hijos así como las condiciones en que deberían asistir el día de la toma de muestra y en la que deberían indicar si autorizaban o no que se le realizara el exudado faríngeo a su hijo.

Toma y procesamiento de la muestra

Para la toma de muestras se prepararon los medios de cultivo necesarios como el caldo BHI y el agar sangre de carnero según las instrucciones del proveedor.

La toma de muestras se llevó a cabo por la mañana con los niños programados para ese día, para cada infante se utilizó de un hisopo estéril, el cual se introdujo en la garganta hasta





CAPITULO IV

tocar la pared de la faringe y las amígdalas las cuales se frotaron vigorosamente seleccionando, si era posible, las regiones que presentaron placas purulentas o una irritación, procurando no tocar la lengua, las mejillas y la cavidad oral.

El hisopo se descargó por rotación en la placa de agar sangre de carnero y después se depositó en el tubo con caldo BHI, procurando hacerlo en condiciones lo más asépticas posibles.

La placa de agar sangre de carnero se sembró por estría cruzada para la separación de colonias y se incubó con los tubos de BHI a 37°C durante 24 horas.

Al día siguiente se revisaron las placas de agar sangre de carnero para observar si se encontraban colonias pequeñas, grisáceas, translúcidas, semejantes a gotas de rocío con β -hemólisis. Las colonias que presentaron dichas características se resembraron en otra placa con agar sangre de carnero para obtener colonias puras. Las placas que no presentaron colonias características se incubaron a temperatura ambiente por 7 días y si en ese tiempo no se observaron colonias con β - hemólisis se desecharon.

A las colonias aisladas con características macroscópicas típicas de estreptococos se les realizó tinción de Gram, para verificar que fueran cocos Gram positivos.





A las colonias aisladas se les realizó la prueba de catalasa. La prueba se realizó en un portaobjetos en el que se colocó una asada del microorganismo en estudio y se vertieron sobre ésta una o dos gotas de solución de H₂O₂ al 3%. La reacción es rápida y en unos segundos se pueden observar burbujas, las que nos indican una reacción positiva. El género estreptococos da negativa esta reacción.

Identificación de *Streptococcus pyogenes*

Para la identificación de *Streptococcus pyogenes* se utilizó la prueba de sensibilidad a la bacitracina 0.04 U y sensibilidad a Trimetoprim Sulfametoxazol (SXT) de 25 µg, mismas que se realizaron tomando una asada de una colonia pura con β-hemólisis, se estrió masivamente en la mitad de la caja de agar sangre de carnero y se colocó por un lado un disco de bacitracina y por el otro uno de Trimetoprim Sulfametoxazol (SXT). En la otra mitad se realizó el factor de CAMP colocando en forma transversal u horizontal una estría de *Staphylococcus aureus* β-lisinas (ATCC 25923) y de manera vertical una estría con inoculo de una colonia β-hemolítica problema. Se incubó a 37°C durante 24 horas.

La prueba se consideró positiva para la sensibilidad a la bacitracina si se observó un halo de inhibición de por lo menos 10 mm de diámetro y para Trimetoprim Sulfametoxazol (SXT) de 15 mm de diámetro. La prueba para el factor CAMP se consideró positiva si en la zona en que convergen la beta hemolisis del microorganismo problema y la β-lisina





estafilocócica, se observa una hemólisis más evidente, en forma de punta de flecha, la cual apunta hacia la estría de *Staphylococcus aureus*.

Serotipificación y amplificación del gen *emm*

Para la serotipificación y la amplificación del gen *emm* se sembró cada una de las cepas aisladas en agar sangre de carnero y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

La serotipificación se determinó mediante pruebas de aglutinación utilizando un producto comercial para estreptococos (Pastorex, Bio Rad) siguiendo las indicaciones del proveedor que se describen a continuación:

- Adicionar 100 µL de solución de enzima de extracción a un tubo eppendorf de 0.2 µL.
- Tomar la colonia aislada en estudio de un cultivo fresco y disociarlas en la solución de la enzima, procurando obtener una turbidez evidente.
- Incubar de 15 a 45 minutos a temperatura ambiente.
- Homogenizar por agitación con vórtex cada uno de los antiseros (suspensiones de partículas de látex recubiertas de los anticuerpos específicos de cada grupo A, B, C, D, F y G).
- Depositar una gota de cada antisuero en cada uno de los círculos de la tarjeta de aglutinación.
- Con ayuda de una pipeta poner una gota de la suspensión que contiene la cepa problema en cada uno de los círculos de aglutinación, procurando no tocar la gota de antisuero ya





colocada.

- Utilizando un palillo para cada círculo, homogeneizar el contenido de cada uno de los círculos.
- Agitar la tarjeta con un movimiento orbital durante un minuto.

Una reacción positiva se manifiesta por la aparición de aglutinados rojos sobre un fondo verde en un plazo máximo de un minuto. Con esta prueba podemos confirmar el grupo A de Lancefield identificando el antígeno de superficie que caracteriza al estreptococo del grupo A, cuando se presenta una aglutinación evidente con el antisuero-A.

Para la amplificación del gen *emm* se extrajo el DNA con el Kit comercial DNAeasy/QIAGEN siguiendo las instrucciones del proveedor como se indica a continuación:

- Mezclar en un tubo eppendorf lizozima (20 mg/MI) en 180 μ L de buffer de lisis enzimática.
- Agregar a la mezcla anterior una asada de un cultivo de 24 horas de la muestra problema de *Streptococcus pyogenes*.
- Incubar a 37°C durante 30 minutos.
- Adicionar 25 μ L de proteinasa K y 200 μ L de buffer AL.
- Incubar a 70°C durante 30 minutos.
- Agregar 200 μ L de etanol absoluto frío.
- Agitar vigorosamente en vórtex.





- Adicionar todo a la columna de extracción colocada sobre un tubo de colecta.
- Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
- Eliminar el líquido del tubo de colecta.
- Transferir la columna de extracción a un tubo de colecta nuevo.
- Adicionar a la columna 500 µL de buffer AW1.
- Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
- Eliminar el líquido del tubo de colecta.
- Transferir la columna de extracción a otro tubo de colecta nuevo.
- Adicionar a la columna 500 µL de buffer AW2.
- Centrifugar a 14 000 rpm durante 3 minutos.
- Eliminar el líquido del tubo de colecta.
- Trasferir la columna de extracción a un tubo eppendorf nuevo.
- Adicionar a la columna 200 µL de buffer AE.
- Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
- Recolectar el DNA disuelto en tubos de 1.5 mL y 0.5 mL.

Evaluación de la calidad del DNA aislado

Se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer de Tris-Boratos-EDTA, utilizando bromuro de etidio como revelador para poder observar las bandas del DNA cromosomal por medio de un transiluminador con luz ultravioleta.





Amplificación del gen *emm*

Para amplificar el gen *emm* se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando la siguiente mezcla de reacción:

Agua	33.6 μ l
dNTP's (Applied Biosystems)	8.0 μ l
Buffer 10X para PCR con MgCl ₂ 15mM (Applied Biosystems)	5.0 μ l
Iniciador <i>emmA</i> (Biosynthesis)	1.0 μ l
Iniciador <i>emmB</i> (Biosynthesis)	1.0 μ l
Taq Polimerasa 5 U/ μ l (Applied Biosystems)	0.2 μ l
DNA de la muestra	1.0 μ l
Glicerol	0.2 μ l

El volumen final de la mezcla de reacción fue de 50 μ l. Se utilizó un control negativo, el cual se preparó utilizando todos los reactivos pero sin adicionar ninguna muestra problema y un control positivo (cepa 806 de *Streptococcus pyogenes*).

La secuencia de los iniciadores utilizados para amplificar el gen *emm* se muestra a continuación:





CAPITULO IV

emmA: 5'-GGG AAT TCT ATT SGC TTA GAA AAT TAA-3'

emmB: 5'-GCA AGT TCT TCA GCT TGT TT-3'

Las etapas de la reacción en cadena fueron:

- La reacción inició con una etapa de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos.
- La etapa de desnaturalización se realizó a 94 °C durante 1 minuto.
- La etapa de alineamiento se llevó a cabo a 45 °C durante 1 minuto.
- La etapa de extensión fue a 72 °C durante 2 minutos.
- La reacción se realizó durante 30 ciclos.
- Al final de los 30 ciclos la reacción continuó una etapa de extensión a 72 °C durante 7 minutos.
- Finalmente se disminuyó la temperatura a 4 °C para detener la reacción.

Clasificación de las cepas:

- Cada uno de los productos de PCR se mezcló con 5µL de buffer de corrida y se colocó en un gel de agarosa al 1.5%.
- En dos de los pozos del gel de agarosa (en el primero y en el último) se agregaron 3 µl de marcador molecular de 100 pb.
- Se colocó el gel en una cámara de electroforesis y se corrió a 90 volts por 20





minutos.

- Se observó el gel de agarosa en una cámara de luz UV.
- Los resultados se procesaron con el Software Kodak 1D 3.5v y de esta forma se determinó el tamaño molecular de cada uno de los productos de PCR.
- Al producto de PCR del gen *emm* se le realizó el siguiente tratamiento:
 - Agregar 0.2 µl de las enzimas de restricción *DdeI*
 - Agregar 0.4 µl de buffer 3
- Los tubos de reacción se incubaron a 37 °C por al menos 2 horas.
- Los productos del corte con enzimas de restricción se corrieron en un gel de agarosa al 1.5 % en una cámara de electroforesis.
- Se observó el gel de agarosa en una cámara de luz UV.
- Los resultados se analizaron mediante el Software Kodak 1D 3.5v y de esta forma se determinó el tamaño molecular de cada uno de los productos de restricción.





5. RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 117 exudados faríngeos en tres diferentes escuelas de la Ciudad de México, de los cuales 22 correspondieron a la Escuela Maestro Manuel Acosta con un promedio de edad de los infantes de entre 5 y 6 años; 44 a la Escuela Educación para Todos con un promedio de edad de entre 6 y 8 años; y 51 a la Escuela Reino de Jordania con un promedio de edad de entre 8 y 10 años (Tabla 1).

De los 117 exudados faríngeos se logró aislar a *Streptococcus pyogenes* en 12 muestras, lo que representa una frecuencia de aislamiento del 10.2%; de los cuales 5 (4.3%) fueron aislados en la Escuela Maestro Manuel Acosta y 7 (5.9%) en la Escuela Educación para Todos (Tabla 1). Cabe señalar que todos los aislados correspondieron a infantes de entre 5 y 6 años de edad.

Así mismo, podemos indicar que de los 117 exudados faríngeos 55 (47%) fueron obtenidos de infantes del sexo masculino y 62 (52.9 %) del sexo femenino. Dentro de los cuales se aisló a *Streptococcus pyogenes* en 4 (3.4 %) niños y 8 (6.8 %) en niñas (Tabla 2).





Tabla 1. Frecuencia de aislamiento de *Streptococcus pyogenes* en 117 exudados faríngeos obtenidos de 3 diferentes escuelas de la Ciudad de México.

Procedencia	Número de Exudados faríngeos	Detección de <i>Streptococcus pyogenes</i> No. (%)
Escuela Maestro Manuel Acosta	22	5 (4.3 %)
Escuela Educación para Todos	44	7 (5.9 %)
Escuela Reino de Jordania	51	0
Total	117	12 (10.2 %)





Tabla 2. Resultados de las muestras y aislamientos clasificados por género.

	No. de muestras (%)	<i>Streptococcus pyogenes</i> No. de aislamientos (%)
Niños	55 (47.0%)	4 (3.4%)
Niñas	62 (52.9%)	8 (6.8%)
Totales	117	12 (10.2%)

De acuerdo a la sintomatología presentada por los infantes se observó que 31 (26.5%) presentaron amígdalas inflamadas, rojas y/o ulceradas, secreción nasal, presencia de flemas,





CAPITULO V

ardor faríngeo y congestión nasal, y 86 (73.5%) no presentaron ninguno de los síntomas antes mencionados ya que en esos momentos se encontraban aparentemente sanos, se logró aislar a *Streptococcus pyogenes* en 5 (4.3 %) de los 31 infantes sintomáticos y en 7 (5.9%) de los 86 asintomáticos (Tabla 3).

Las pruebas de identificación de las 12 cepas aisladas, así como la interpretación de éstas se hicieron de acuerdo al Manual de Microbiología Clínica y al texto Diagnóstico Microbiológico (Tabla 4). (25, 32)

Las pruebas de aglutinación realizadas a las 12 cepas de *Streptococcus pyogenes* aisladas dieron como resultado que dichas cepas correspondieron al grupo A de Lancefield (Tabla 5).

Así mismo, con la amplificación del gen *emm* por PCR de las 12 cepas aisladas y el corte con enzimas de restricción de los 12 productos de PCR se lograron identificar 6 serotipos M12, 2 correspondieron al serotipo M75 y los cuatro restantes pertenecieron a los serotipos M89, M65, M22 y M6 (Tabla 5).

El perfil genético obtenido a partir de los cortes con las enzimas de restricción utilizadas en los productos de PCR de cada una de las 12 cepas *Streptococcus pyogenes* aisladas de los 117 exudados faríngeos se puede observar en la Figura 1, donde se puede apreciar que de





los 12 productos de PCR se obtuvieron 6 serotipos diferentes del gen *emm*.

Tabla 3. Frecuencia de *Streptococcus pyogenes* de acuerdo a la





sintomatología presentada por los infantes cuando se obtuvo la muestra.

	No. de muestras (%)	<i>Streptococcus pyogenes</i> No. de aislamientos (%)
Sintomáticos	31 (26.5%)	5 (3.4%)
Asintomáticos	86 (73.5%)	7 (5.9%)
Totales	117	12 (10.2%)

Tabla 4. Pruebas de identificación realizadas a 12 cepas aisladas de 117 exudados faríngeos.





CAPITULO V

No. de Cepa de <i>Streptococcus pyogenes</i>	Tipo de Hemólisis	Tinción de Gram	Prueba de Catalasa	Susceptibilidad a la bacitracina 0.04 U	Prueba de CAMP	Sensibilidad a Trimetoprim Sulfametoxasol (SXT 25µG)
1	beta	+	-	S	-	R
4	beta	+	-	S	-	R
6	beta	+	-	S	-	R
9	beta	+	-	S	-	R
17	beta	+	-	S	-	R
73	beta	+	-	S	-	R
80	beta	+	-	S	-	R
90	beta	+	-	S	-	R
94	beta	+	-	S	-	R
99	beta	+	-	S	-	R
104	beta	+	-	S	-	R
110	beta	+	-	S	-	R
Control positivo	beta	+	-	S	-	R

S (sensibilidad)

R (resistencia)

Tabla 5. Serogrupo A y serotipificación del gen *emm* de las 12 cepas aisladas de *Streptococcus pyogenes*.





CAPITULO V

No. de Cepa de <i>Streptococcus pyogenes</i>	Aglutinación sero-grupo A de Lancefield	Serotipo Gen <i>emm</i>
1	+	M12
4	+	M12
6	+	M12
9	+	M12
17	+	M12
73	+	M75
80	+	M89
90	+	M22
94	+	M65
99	+	M75
104	+	M6
110	+	M12

PM M12 M12 M12 M12 M12 M6 M75 M75 M65 M22 M89 M12 C+ PM

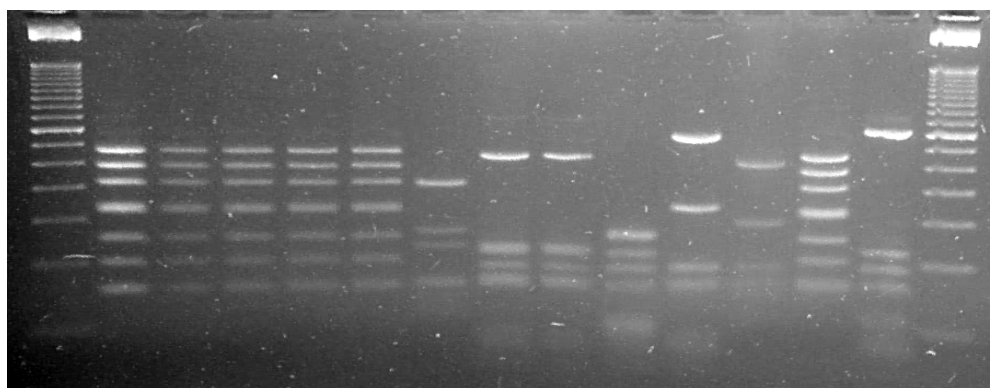




Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa del gen *emm* a partir del corte con enzimas de restricción de los productos de PCR de las 12 cepas de *Streptococcus pyogenes* aisladas de 117 exudados faríngeos.

De izquierda a derecha: PM= Marcador de Peso Molecular de 100bp (Invitrogen). cepa 1(M12), cepa 4 (M12), cepa 6 (M12), cepa 9 (M12), cepa 17 (M12), cepa 104 (M6), cepa 73 (M75), cepa 99 (M75), cepa 94 (M65), cepa 90 (M22), cepa 80 (M89), cepa 110 (M12), cepa control positivo, PM= Marcador de Peso Molecular de 100 bp (Invitrogen).





6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las infecciones de vías respiratorias altas son muy comunes, debido a que el contagio es de forma directa, frecuentemente asociado con portadores asintomáticos. Dentro de estas infecciones, la faringitis y la amigdalitis son más recurrentes, causadas principalmente por agentes virales sin embargo, cuando el origen es bacteriano, *Streptococcus pyogenes* es el agente causal más importante. González Pedraza-Avilé y cols (19), reconocen a los estreptococos beta hemolíticos del grupo A (*Streptococcus pyogenes*) como los principales agentes etiológicos de la faringitis aguda.

En estudios realizados anteriormente, López y cols (26) refieren una incidencia del 15.9% para *Streptococcus pyogenes* en infantes de 4 y 10 años de edad, lo cual coincide con Standford y cols. (30) quienes refieren que la edad escolar es donde se experimenta el más alto índice de infección por *Streptococcus pyogenes*, ya que la transmisión es principalmente por contacto directo con gotitas de saliva o secreciones respiratorias. De modo que la diseminación dentro del grupo familiar o en los salones de clase es frecuente.





CAPITULO VI

Edmon K. M. y cols (11) también ponen de manifiesto la importancia de la edad en la prevalencia por *Streptococcus pyogenes* ya que en infantes menores de 3 años la incidencia es de 1.5% y el grupo de 4-6 años que es la edad escolar presenta una incidencia del 13.6%, observándose una considerable baja en la incidencia en edades mayores de 7 años.

En este trabajo la población que se estudió fue entre los 5-10 años de edad en tres diferentes escuelas, donde se observó que los aislados se obtuvieron de los infantes de entre 5 y 6 años de edad con una incidencia del 10.2%, tal como lo refiere López A. (26) y cols y Edmon K.M. y cols. (11), que es muy cercana a lo reportado por estos autores. Cabe destacar que todos los aislados fueron obtenidos de infantes en edad preescolar y de primero de primaria. Por otro lado en nuestro estudio no se obtuvieron aislados de *Streptococcus pyogenes* en las edades de entre 7 y 10 años, lo cual coincide con los resultados reportados por Edmon K.M.(11)

Estos datos resaltan la importancia de la detección de los portadores asintomáticos ya que representan una fuente de contaminación muy significativa principalmente en lugares donde los individuos tienen un estrecho contacto, ya que por medio de gotitas de saliva, intercambio de alimentos, entre otras causas, puede diseminarse el microorganismo.

De ahí que algunos estudios como el de Arrayan y cols, en Perú realizaron un estudio





CAPITULO VI

faríngeo con 300 niñas escolares aparentemente sanas, donde encontraron una incidencia del 3.33 % para *Streptococcus pyogenes*. Romero S.F. y cols (42), también hicieron un estudio faríngeo con 331 pacientes asintomáticos, donde obtuvieron una prevalencia del 16.03 % de portadores asintomáticos de *Streptococcus pyogenes*. Mientras que en este estudio sólo se pudo contar con 86 infantes asintomáticos de los cuales en 7 de ellos se logró aislar e identificar *Streptococcus pyogenes* lo que nos da una frecuencia del 6.0%, esto puede ser debido a que la población que estudiaron Arrayan y cols, fue de entre 7 a 13 años de edad; edad en que en este estudio no se obtuvo ningún aislamiento de *Streptococcus pyogenes*.

Con respecto Romero S.F. y cols. (42) estudiaron la población escolar aparentemente sana comprendida entre 4 a 18 años de edad, encontrando en las edades de 4 a 6 años una prevalencia de portadores asintomáticos del 3.88 %, que fue menor que la que se está reportando en este estudio.

Los resultados anteriores, así como los obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto que las edades más susceptibles para adquirir la infección por *Streptococcus pyogenes* se presenta en infantes menores a 6 años de edad.

Con respecto a las pruebas de identificación que se realizaron, todas correspondieron en similitud al microorganismo control, así como a las tablas de comparación del Manual de





Microbiología Clínica. (32)

Las pruebas de aglutinación en látex para la detección de *Streptococcus pyogenes* en ocasiones no cuentan con buena sensibilidad pero sí con buena especificidad, tal es el caso del Kit Patho Dx Strip A (DPC) que en un estudio hecho por Fariña N. y cols. (12) para la evaluación de éste Kit reportó una sensibilidad del 66.7% y una especificidad del 96%.

Mientras que la sensibilidad y especificidad reportada para el Kit de aglutinación en látex de Pastorex, Bio Rad es del 100 %.

En las pruebas de aglutinación que se realizaron con el Kit Pastorex de Bio Rad las 12 cepas resultaron positivas para el grupo A.

Bernard y cols secuenciaron el gen específico del gen *emm* para determinar los diferentes serotipos del *Streptococcus pyogenes*, aislados de un brote hospitalario. Por su parte Brand E.R. y cols (5) realizaron la caracterización molecular del gen *emm* y genes asociados a este gen de las cepas de *Streptococcus pyogenes*, aislados de pacientes con tratamiento fallido para faringitis bacteriana. Perea L.M. y cols (38) realizaron la caracterización molecular de cepas de *Streptococcus pyogenes* aisladas durante un brote de fiebre escarlatina utilizando la metodología de PCR-RFLP, donde detectaron 5 serotipos diferentes en las 40 cepas obtenidas.





En este estudio, con la metodología empleada por Perea L.M. y cols (38) se pudieron obtener 6 serotipos diferentes de las 12 cepas aisladas de los infantes en edad escolar, donde predominó el serotipo M12 en un 50%, seguido del serotipo M75 (16.6%), los demás serotipos encontrados fueron el M89, M65, M22 y M6.

Inzunza A.E. y cols (23) quienes realizaron un estudio con 248 cepas de *Streptococcus pyogenes* obtenidas en diferentes entidades de salud de la Ciudad de México, a las que les extrajeron el DNA para realizar la amplificación del gen *emm*, obtuvieron que los serotipos M1, M12 y M75 fueron los más comunes dentro de la población estudiada. Estos resultados nos indican que los serotipos M12 y M75 son los que presentan mayor prevalencia en la Ciudad de México.





7. CONCLUSIONES

1. Se aislaron e identificaron 12 cepas de *Streptococcus pyogenes* de los 117 exudados faríngeos.
2. La frecuencia para *Streptococcus pyogenes* en la población infantil resultó de 10.2%.
3. La frecuencia de portadores asintomáticos para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes* fue de 5.9%.
4. El grupo de edad con mayor susceptibilidad a *Streptococcus pyogenes* fue de 5 a 6 años.
5. En los grupos de edad escolar de 8-10 años no se encontró *Streptococcus pyogenes*.
6. La frecuencia de aislamiento de *Streptococcus pyogenes* disminuye con la edad.
7. El 50% de los aislamientos de *Streptococcus pyogenes* pertenece al serotipo M12.





8. BIBLIOGRAFÍA

1. *Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.* Inmunología Celular y Molecular. 2ª Edición en español. Interamericana. Mc. Graw Hill. 1999. pp. 79-80, 119-120.
2. *Bach J.F.* Inmunología. 1ª Edición. Editorial Limusa. 1984. pp. 274-283.
3. *Barrett J.T., Ph. D.* Inmunología Médica. 1ª edición. Interamericana. Mc Graw Hill. 1993. pp. 277-295.
4. *Beall B., facklam R. y Thompson T.* Sequencing *emm* Specific PCR Products for Routine and Accurate Typing of Group A. Streptococci Journal of Clinical Microbiology. Abril 1996. Vol. 34 No.4. pp. 953-958.
5. *Brand E.R. Sriprakash K.S., Hobb R.I. Hayman W.A., Zeng W., Batzloff M.R., Jackson D.C. and Good M. F.* New Multi-determinant Strategy for a Group a Streptococcal Vaccine Designed for the Australian Aboriginal Population. Nat. Med. 6: 2000. pp. 645-459.
6. *Bruce A.* Biología Molecular de lo Celular. 3ª. Edición. Ediciones Omega S.A. 1996. pp. 313-316, 334-335.
7. *Cedric A.M.* Microbiología Médica. Mosby/Doyma Libros. 1993. pp. 20.1- 20.7
8. *Cunningham M.W.* Phatogenesis of group A Streptococcal Infections. Clinical Microbiology Review. Vol. 13: 2000. pp. 470-511.





CAPITULO VIII

9. *Dajani A., Taubert K., Ferrieri P., Georges P., Stanford Sh., and other committee members.* Treatment of acute streptococcal pharyngitis and prevention of rheumatic fever. American Academy of Pediatrics American Heart Association. Vol. 78. 1995. pp. 1082-1086.
10. *Duerden B.T.* Microbiología de Enfermedades Infecciosas. Ed. Limusa. 1993. pp. 42-53, 222, 235-236, 239-245.
11. *Edmond K.M., Grimwood K., Carlin J.B., Chondros P., Hogg G.G., Barnett P.* Streptococcal pharyngitis in a paediatric emergency deparment. Med J. Australia. URL: <http://www.library.usyd.edu.au/MJA>.
12. *Fariña N, Figueredo L, Sanabria R, Ocampos M, Laspina F, Balmaceda A, Samudio M.* Evaluación de un método de aglutinación del látex para la detección del estreptococo grupo A en faringe. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. Vol. 1 (1). 2005. pp. 28-30.
13. *Figuroa Martinez F.J.* Tipificación molecular del gen que codifica para la proteína M (*emm*) en cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico. Tesis, QFB, Fac. Química UNAM, 2004.
14. *Fischetti V. A.* Streptococcal M Protein. Sci. Am. 1991. pp. 264: 58-65.
15. *García Rodríguez J.A., Picazo J.J.* Microbiología Médica General. Editorial Mosby. pp. 1996.43-54, 189-206.
16. *Garza, V.R.* Bacteriología. Manual de Prácticas. Dpto. De Biología. Facultad de Química, UNAM. 2003. pp. 25-40.
17. *Garza V.R., López L.M. y Saavedra T.M.* La Reacción en Cadena de la Polimerasa y





CAPITULO VIII

su Aplicación al Diagnóstico de Laboratorio de las Enfermedades Bacterianas. Educación Química. 1998. pp. 94-102.

18. *Gladwin M., Trattler B.* Clinical Microbiology made ridiculously simple. International Editions. 2000. pp. 22-37.

19. *González Pedraza-Avilés A., Ortiz-Zaragoza C., Mota-Vázquez R., Dickinson-Bannack M.A., Dávila-Mendoza R., Fernández-Ortega M.A.* Sensibilidad antimicrobiana y caracterización de cepas de *Streptococcus pyogenes* aisladas de un brote de escarlatina. <http://www.insp.mx/salud/index.html>.

20. *Gutiérrez M., López R., Tay J., Manjares M.A.* Microbiología y Parasitología Médicas. 3ª Edición. México DF. 2003. pp. 75-85.

21. *Higuera Ramírez J.F.* Infectología. Editorial. Prado. 1996. pp. 107-116.

22. *Hu M.C., Walls M.A., Stroop S.D., Reddish M.A., Beall B., and Dale J.B.* Immunogenicity of A 26-Valent Group A Streptococcal Vaccine. Infect. Immun. Vol. 70: 2002. pp. 2171-2177.

23. *Inzunza-Montiel A.E., Figueroa-Martínez F.J., Pérez-romano L., Dávila-Mendoza R., Garza velazco R., Cravioto A., Perea-Mejía L.M.* Prevalencia de los genes (*emm*, *speA*, *speC*, *sof*, *prtF* y *sic*) asociados a la prevalencia de las cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico. Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, A.C. Marzo 2004. Vol. 29.

24. *Jawets E., Levinson W.* Microbiología e Inmunología. Autoevaluación y repaso. 2ª Edición. Editorial El Manual Moderno. 1998.





CAPITULO VIII

Novales X., Ochoa M., Rodríguez A., Rodríguez Tabeada, Rodríguez M., Serrano A., Sotelo N., Granados J. Identificación de agentes bacterianos en 654 exudados faríngeos de niños con faringoamigdalitis. *Revista Mexicana de Pediatría. Suplemento 1 Vol. 70 Núm 6 Dic. 2003. pp.7-11.*

34. *Ochoa sangrador C., Brezmes Valdivieso M.F., López-Urrutia Lorente L., Gutiérrez Zufiaurrez M.N., Barajas Sánchez M.V, Bajo Delgado A.F.* Epidemiología de la infección estreptocócica faríngea en un área de salud. *Bol Pediatr. vol 46. 2006. pp. 32-38.*

35. *Pelczar jr. M.J. y Reid R.D.* Microbiología. 5ª Edición .Mc Graw Hill. 1991.

36. *Peña Martínez J.* Inmunología. Bases Moleculares y Celulares. Ediciones Pirámide, S.A. Madrid. 1994. pp. 397-419.

37. *Perea-Mejía L.M.* Microbiología y Parasitología Médicas. 3ª Edición. Méndez Editores. 2003. pp. 75-85.

38. *Perea-Mejía L.M., Inzunza-Montiel E.A., and Cravioto A.* Molecular Characterization of Group A Streptococcus Strains Isolated during a Scarlet Fever Outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, Jan. 2002. pp. 278–280.

39. *Prats G., Auxina V., Mirelis B., Coll P., Rabella N., Muñoz C., Fernández F., Pericas R., Margall N.* Microbiología Médica. Cuaderno de Prácticas y Demostraciones. 1993.

Ediciones Doyma. pp. 88-91.

40. *Pumarola A., García Rodríguez J.A., Rodríguez-Torres A., Piedrola-Angulo G.,* Microbiología y Parasitología Médica. 2ª Edición. Ediciones Científicas y Técnicas S.A. Barcelona. 1994. pp. 333-352.





CAPITULO VIII

41. *Roitt I.M.* Inmunología. 3ª Edición. Ediciones Científicas y Técnicas S.A. 1993. pp. 25.1-25.8.
42. *Romero, S.; Ginestre, M.; Rincón, G y Harris, B.* Streptococcus betahemolíticos en la orofaringe de escolares asintomáticos de dos instituciones del estado Zulia. Rev. Soc. Ven. Microbiol. Vol. 22 No 1. 2002. pp. 6-11.
43. *Ruíz Castro A., Cisneros Bárcenas Y., Rangel Sánchez J.F.* Incidencia y tipificación de estreptococos beta hemolíticos. Lab-acta 1/3. 1989: pp. 18-22.
44. *Schwartz B., Fries S., Fitzgibbon A., and Lipman H.* Pediatricians diagnostic Approach to pharyngitis and impact of CLIA 1998 on office diagnostic test. JAMA. 1994 Vol. 271. pp. 234-238
45. *Solari A. J.* Genética Humana. Fundamentos y Aplicaciones en Medicina. Editorial Médica Panamericana. 1996. pp. 17-22, 29-31.
46. *Spellerberg B., Holland R., M Brandt C., Allerberger F., Lutticken R. and Haase G.* Characterization of Consecutive *Streptococcus pyogenes* Isolates from Patients with Pharyngitis and Bacteriological Treatment Failure. The Journal of Infectious Diseases. 2001. pp. 670–674.
47. *Stanford T. Shulman, M. D.* Infectología clínica. 4ª Edición. Nueva Editorial Interamericana. 1994. pp. 108-134.
48. *Torales A.N., Rodríguez Suárez J. y Mascareños de los Santos A.* Infectología Clínica Pediátrica. Editorial Trillas. 1993. pp. 69-93.
49. En línea: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/situa/1198_n11/portadores.htm

