



Universidad Nacional Autónoma de
México

FACULTAD DE QUÍMICA

IDENTIFICACIÓN DEL GENOTIPO M Y
TOXINAS ASOCIADAS A VIRULENCIA EN
CEPAS DE *Streptococcus pyogenes*
AISLADAS DE MUESTRAS CLÍNICAS.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA

ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

P R E S E N T A

Q.F.B. NELLY DÁVILA ESTRELLA

ASESOR: M. en C. Luis Manuel Perea Mejía



Ciudad Universitaria, Cd.Mx

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. José Molina López.

Vocal: Dra. María de los Ángeles Granados Silvestre.

Secretario: M. en C. María Guadalupe Ortiz López.

Vocal: M. en F. María del Consuelo Velázquez Acosta.

Vocal: Dra. Mónica Viveros Rogel.

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Salud Pública, 3er piso de la torre de investigación de la Facultad de Medicina. UNAM.

Asesor del Tema: M. en C. Luis Manuel Perea Mejía.

Sustentante: Q.F.B. Nelly Dávila Estrella

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme una vez más la oportunidad de seguir preparándome profesionalmente.

A mi tutor el M. en C. Luis Manuel Perea Mejía, por compartir sus conocimientos y brindarme su apoyo para la realización de este proyecto.

A la Dra. Alma Inzunza por su paciencia, enseñanzas y aportes que fueron necesarios durante todo el proyecto.

A los miembros del jurado, por sus aportaciones y por haber dedicado su tiempo en la revisión de este documento.

A los profesores que conforman el posgrado y fueron parte importante de nuestra formación como especialistas.

A la Facultad de Química y el laboratorio de Epidemiología Molecular de Salud Pública de la Facultad de Medicina, UNAM.

Dedicatoria

A mi hermano Rodrigo.

Gracias por creer en mí, eres y serás siempre

una motivación más para lograr mis metas.

A la distancia seguirás sintiéndote orgulloso de mi.

Te quiero, te extraño.

ÍNDICE

Contenido	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ABREVIATURAS.....	9
I. RESUMEN.....	11
II. MARCO TEÓRICO	12
1. Género <i>Streptococcus</i>	12
1.1. Clasificación	13
1.2. <i>Streptococcus pyogenes</i>	15
1.2.1. Factores de virulencia	16
1.2.2. Principales enfermedades asociadas a <i>S. pyogenes</i>	21
1.2.3. Incidencia.....	22
1.2.4. Proteína M y su tipificación.....	24
1.2.5. Exotoxinas	28
III. JUSTIFICACIÓN.....	30
IV. HIPÓTESIS.....	31
V. OBJETIVOS.....	32
1. General:	32
1.1. Particulares:	32
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	33
1. Diseño	33
2. Criterios.....	33
3. Metodología	34
4. Métodos.....	35
4.1. Cultivo de muestras.....	35
4.2. Extracción ADN	35
4.3. Amplificación de genes de virulencia (<i>emm, sic, sof, speA, speC</i>) por PCR	36
4.4. Electroforesis	38
4.5. Tipificación de la proteína M.....	38
4.6. Secuenciación	40

VII. RESULTADOS	41
1. Origen clínico de las cepas	41
2. Integridad y pureza de la extracción del ADN	42
3. Amplificación del gen <i>emm</i>	42
4. Amplificación de los genes <i>sic/sof</i>	43
5. Amplificación de los genes <i>speA/speC</i>	44
6. Corte de restricción con enzima <i>DdeI</i>	45
7. Secuenciación.....	47
8. Análisis de frecuencias de los resultados obtenidos.....	52
VIII. DISCUSIÓN.....	56
IX. CONCLUSIONES.....	61
X. ANEXOS.....	62
1. Material	62
5. Reactivos	62
6. Equipos.....	64
7. Método de extracción de ADN de acuerdo con el inserto	65
8. Tablas de registros de los resultados obtenidos	66
XI. REFERENCIAS	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enfermedades provocadas por EGA, clasificadas de acuerdo con su invasividad.	21
Tabla 2. Ejemplos de enfermedades asociadas a diferentes tipos de proteína M de <i>S. pyogenes</i> .	22
Tabla 3. Origen de los cultivos de <i>Streptococcus pyogenes</i> .	33
Tabla 4. Mezcla de reacción para amplificar el gen <i>emm</i> .	37
Tabla 5. Mezcla de reacción, PCR dual para amplificar los genes <i>sic/sof</i> .	37
Tabla 6. Mezcla de reacción, PCR dual para amplificar genes <i>speA/speC</i> .	38
Tabla 7. Mezcla de reacción para el corte de restricción del gen <i>emm</i> con la enzima <i>DdeI</i> .	39
Tabla 8. Cepas agrupadas de acuerdo con el patrón de corte observado.	46
Tabla 9. Concentración y tamaño del producto de PCR del gen <i>emm</i> de las cepas a secuenciar.	47
Tabla 10. Frecuencias de los tipos M tipificados de las cepas aisladas de <i>S. pyogenes</i> y los factores de virulencia asociados.	53
Tabla 11. Tipos M de las cepas de <i>S. pyogenes</i> identificados mediante secuenciación.	50
Tabla 12. Tipos M de <i>S. pyogenes</i> asociados a diferentes casos clínicos.	54
Tabla 13. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes <i>sic, sof, speA, speC</i> de <i>S. pyogenes</i> .	62
Tabla 14. Resultados de los factores de virulencia <i>sic/sof speA/speC</i> de todas las cepas, agrupadas por los tipos M identificados.	65
Tabla 15. Información de la procedencia y el tipo de muestra de las cepas agrupadas por año.	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo 3D del <i>Streptococcus pyogenes</i> ⁵ _____	13
Figura 2. Esquema representativo de las características diferenciales de los principales estreptococos patógenos para el humano. (modificado) ³ _____	15
Figura 3. Estructura de <i>Streptococcus pyogenes</i> ¹⁵ _____	17
Figura 4. Características de la secuencia completa de la Proteína M. ¹⁹ _____	25
Figura 5. Interacción del superantígeno. ¹⁹ _____	29
Figura 6. Esquema de PCR que se utilizó para la amplificación de los genes <i>sic</i> , <i>sof</i> , <i>speA</i> , <i>speC</i> de <i>S. pyogenes</i> _____	36
Figura 7. Distribución de las cepas aisladas de <i>S. pyogenes</i> recolectadas en diferentes centros de salud en el periodo del 2011 al 2019. _____	41
Figura 8. ADN extraído de cepas aisladas de <i>S. pyogenes</i> _____	42
Figura 9. Producto de PCR del gen <i>emm</i> _____	43
Figura 10. Amplificación de los genes <i>sic/sof</i> de las cepas de <i>S. pyogenes</i> _____	44
Figura 11. Amplificación de los genes <i>speA/speC</i> de las cepas de <i>S. pyogenes</i> _____	44
Figura 12. Corte de restricción del gen <i>emm</i> con enzima <i>DdeI</i> de las cepas <i>sic</i> positivas _____	45
Figura 13 y 14. Corte de restricción del gen <i>emm</i> con enzima <i>DdeI</i> de las cepas <i>sof</i> positivas _____	46
Figura 15. Corte de restricción del gen <i>emm</i> con enzima <i>DdeI</i> de las cepas <i>sof</i> negativas _____	47
Figura 16. Electroferograma de la cepa 2890 _____	49
Figura 17. Electroferograma de la cepa 2940 _____	50
Figura 18. Alineamiento de la secuencia y asignación del tipo M. _____	51
Figura 19. Frecuencia de los tipos M de acuerdo con la procedencia de las cepas aisladas de <i>S. pyogenes</i> _____	52
Figura 20. Distribución de los genes <i>speA/speC</i> de las cepas aisladas de <i>S. pyogenes</i> . _____	53
Figura 21. Distribución de los tipos M de acuerdo con el año en que se obtuvieron las cepas aisladas de <i>S. pyogenes</i> _____	55

ABREVIATURAS

aa: Aminoácidos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AS: Agar sangre

ASO: Antiestreptolisina

BHI: Infusión cerebro y corazón

CAD San Rafael: Centro de Apoyo Diagnóstico San Rafael, ISSSTE

CAMP: Prueba para identificar *S. agalactiae* por Chtistie, Atkins, Munch-Petersen.

C3: Proteína C3 del complemento

C3b: Proteína C3b del complemento

CDC: Centros para el Control y Prevención de enfermedades de E.U.A

CLSI: Instituto de estándares clínicos y de laboratorio

CV: Coeficiente de variación

DMSO: Dimetil Sulfoxido

dNTP's: Desoxirribonucleótidos trifosfato

EGA: Estreptococo del grupo A

emm: Gen que codifica para la proteína M del *S. pyogenes*

Fc: Fracción constante de inmunoglobulinas

h: horas

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleucina

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social

ISSSTE: Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado.

LESP: Laboratorio Estatal de Salud Pública

LPMN: Linfocitos Polimorfonucleares

Medio TH: medio de Todd-Hewitt

mg: miligramos

MHC: Complejo Principal de Histocompatibilidad

min: minutos

mL: mililitros

mM: Milimolar

pb: pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PYR: Pirolidonil-aril-amidasa

RFLP's: Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción.

rpm: revoluciones por minuto

sic: Gen que codifica para la proteína estreptocócica inhibidora del complemento

sof: Gen que codifica para el Factor de opacidad del suero

spe: Exotoxinas pirogénicas estreptocócicas

SSTE: Síndrome de choque tóxico estreptocócico

TBE: Amortiguador Tri-Boratos-EDTA

U: Unidades

UMF: Unidad de Medicina Familiar

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México

UV: Luz ultravioleta

°C: Grados Celsius

μL: microlitros

μM: micromolar

% : Porcentaje

I. RESUMEN

El *Streptococcus pyogenes* (EGA) es un coco grampositivo β -hemolítico. Presenta diferentes factores de virulencia como la proteína M, que le facilita la entrada, supervivencia y colonización dentro del hospedero. Se ha asociado CON diferentes enfermedades entre ellas destacan la faringitis, fiebre escarlatina, síndrome de choque tóxico estreptocócico (SSTE), fascitis necrosante, éstas tres últimas se han asociado con las toxinas pirogénicas A y C que también son factores de virulencia de importancia clínica debido a las secuelas que provocan. En el presente estudio se identificaron los tipos M (*emm*) y toxinas A (*speA*) y C (*speC*) de cepas de *S. pyogenes* aisladas de muestras clínicas, para conocer la frecuencia y la relación entre los genes de virulencia. Se identificaron 14 tipos M de *S. pyogenes* y los más frecuentes fueron: M1 (31%), M12 (22%) y M89 (11%). Las toxinas *speA* y *speC* se presentaron con unas frecuencias de 32% y 56% respectivamente. El gen *speC* estuvo presente en al menos una cepa de todos los tipos M identificados.

En México como en la mayoría de los países latinoamericanos, poco se conoce acerca de las infecciones causadas por *S. pyogenes* y de su importancia en Salud Pública. El identificar a los tipos M de *S. pyogenes* más frecuentes en México y su asociación con los diferentes tipos de toxinas y su variación a través del tiempo es de gran importancia para realizar una vigilancia epidemiológica de *S. pyogenes*. La información obtenida será útil para establecer políticas de control y prevención de las infecciones producidas por *S. pyogenes* a través de la implementación de medidas de salud pública.

II. MARCO TEÓRICO

1. Género *Streptococcus*.

Los estreptococos son un grupo de bacterias heterogéneas de gran relevancia clínica que tienen características muy similares entre sí. Son cocos grampositivos agrupados generalmente en cadenas (excepto *S. pneumoniae* que se agrupa en diplococos), miden aproximadamente 1 μm de diámetro, requieren CO_2 para su crecimiento, son catalasa negativa, no móviles, no esporulados y la mayoría presentan una cápsula en su estructura. Es un grupo muy exigente en cuanto a su requerimiento de nutrientes y generalmente crecen en medios enriquecidos con sangre o suero.¹

Las principales especies patógenas de interés clínico del género *Streptococcus* son: *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*.² Estas bacterias se pueden encontrar colonizando las mucosas del tracto respiratorio, piel, músculo y tejido cardíaco. Algunas cepas pueden ser comensales y otras pueden ser patógenas causando cuadros clínicos severos.^{3,4}

La nomenclatura para los estreptococos de interés clínico se basa en la identificación y tipificación de componentes de la pared celular. La clasificación de género y especies de estreptococos se basa en pruebas bioquímicas, tipos de hemólisis, pruebas serológicas y pruebas moleculares.

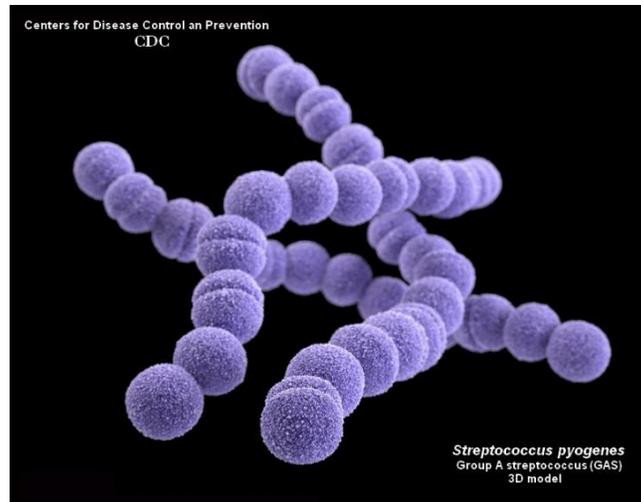


Figura 1. Modelo 3D del *Streptococcus pyogenes*⁵

1.1. Clasificación

Los estreptococos se clasifican mediante los siguientes criterios:

- ❖ **Tipo de hemólisis en agar sangre.** Las colonias de los estreptococos pueden producir alfa hemólisis, beta hemólisis o pueden ser no hemolíticas. Para poder observar claramente el efecto hemolítico, se emplea el medio de cultivo de agar con 5% de sangre de carnero.⁶ Cuando se observa una zona clara traslúcida alrededor de las colonias se define como beta hemólisis y se debe a una lisis total de los eritrocitos inducida por la estreptolisina S (soluble en suero) y la estreptolisina O (lábil en oxígeno). Si las colonias están rodeadas de un halo verdoso es porque la hemoglobina fue oxidada por peróxido de hidrógeno a metahemoglobina y el fenómeno se conoce como alfa hemólisis o con lisis parcial de eritrocitos y se debe principalmente a la estreptolisina O.²

- ❖ **Especificidad serológica.** El sistema de clasificación serológica para los estreptococos fue desarrollado por Rebeca Lancefield en 1932 y se basa en las diferencias antigénicas atribuidas al polisacárido específico o carbohidrato C ubicado en la pared celular de las bacterias.^{7,8,9} El grupo serológico se determina mediante la extracción del carbohidrato C y la confrontación con anticuerpos específicos para cada uno de los grupos de Lancefield.⁹ Es importante mencionar que el carbohidrato C no está presente en *S. pneumoniae* ni en algunos estreptococos alfa hemolíticos (estreptococos viridans orales como *S. mitis*, *S. mutans*).⁹ Actualmente se han identificado 21 grupos serológicos denominados de la A a la H y K a la W. El fundamento de la serotipificación utilizando un kit comercial, se basa en la reacción de coagulación en látex para los principales grupos de interés clínico como lo son A, B, C, D y G.⁸
- ❖ **Pruebas bioquímicas.** En los aislamientos clínicos de estreptococo es importante conocer la especie, por lo que la prueba de sensibilidad a la bacitracina es muy útil para identificar *S. pyogenes*. Esta prueba consiste en colocar un disco de bacitracina (0.04U) sobre un cultivo de estreptococo en Base Agar Sangre con 5% de sangre de carnero y observar un halo de inhibición del crecimiento a este antibiótico. Otra prueba que también nos ayuda a identificar al *S. pyogenes* es la prueba de PYR que detecta la actividad de la enzima pirrolidonil aminopeptidasa. La prueba de CAMP sirve para identificar *S. agalactiae* y se basa en evidenciar un efecto sinérgico de la hemólisis en el agar sangre entre un péptido difusible producido por *S.*

agalactiae y la hemolisina de *S. aureus*, que al entrar en contacto intensifica la hemólisis en la zona de coincidencia. Determinar la sensibilidad a optoquina es de gran ayuda para la identificación de *S. pneumoniae*.^{6,9}

Estas son algunas de las pruebas de rutina que se realizan para poder identificar a los estreptococos y poder clasificarlos. En el siguiente esquema se muestra la clasificación de acuerdo con los criterios descritos anteriormente.

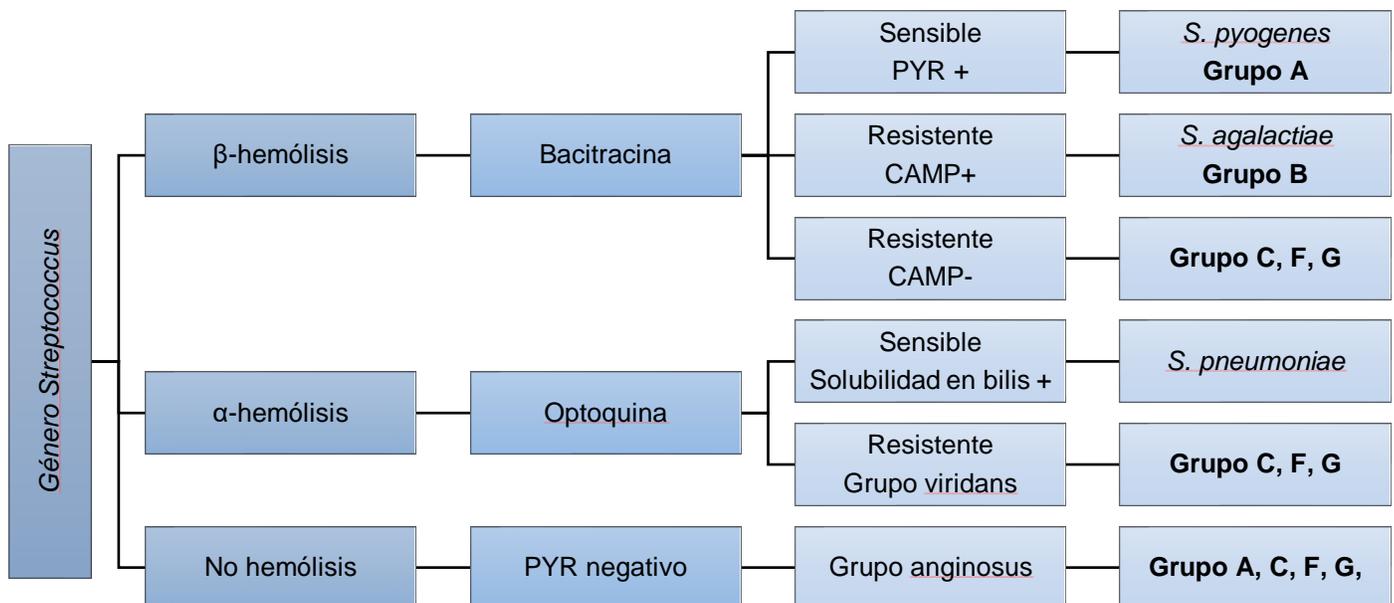


Figura 2. Esquema representativo de las características diferenciales de los principales estreptococos patógenos para el humano. (modificado)³

1.2. *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes o estreptococo del grupo A (EGA) es un coco grampositivo, β-hemolítico, anaerobio facultativo, es microaerofílico, catalasa negativa y sensible a la bacitracina.¹⁰ Posee cápsula, su pared celular es de las más estudiadas y está compuesta de unidades de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico que

componen la peptidoglicana. La identificación definitiva de la especie está dada por la reactividad serológica descrita anteriormente donde el carbohidrato del grupo A está formado por N-acetil-glucosamina unido a un esqueleto polimérico de ramnosa.¹¹ Rebeca Lancefield además de clasificar al grupo A mediante el carbohidrato C, también describió un sistema para tipificar a los EGA basado en otro importante determinante antigénico: **la proteína M**. Esta proteína está localizada en la pared celular del estreptococo, en forma de fibrillas y es reconocida como el principal factor de virulencia del estreptococo; su variación antigénica permitió tipificar serológicamente al estreptococo del grupo A. Lancefield encontró inicialmente 80 serotipos M. Actualmente gracias a las técnicas de biología molecular se han registrado más de 200 tipos M.^{12,13}

La proteína T está localizada en la superficie celular y sirve como marcador epidemiológico más que como factor de virulencia. La estreptolisina O es una hemolisina que causa lisis de eritrocitos y su característica inmunogénica permite la determinación de anticuerpos anti-estreptolisina "O" que constituye un marcador diagnóstico importante de las infecciones estreptocócicas.¹⁴

1.2.1. Factores de virulencia

Streptococcus pyogenes produce una amplia variedad de factores de virulencia (Figura 3) ocasionando un gran número de enfermedades. Dentro de los principales factores de virulencia se encuentran los siguientes:

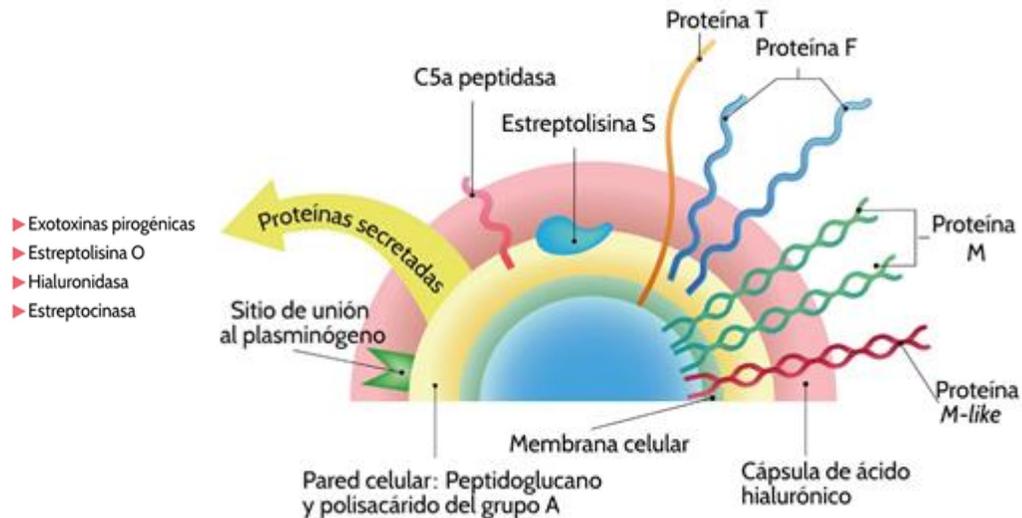


Figura 3. Estructura de *Streptococcus pyogenes*¹⁵

➤ **Proteína M.**

Es una proteína localizada en la superficie de la bacteria y es el principal factor de virulencia del EGA con más de 200 serotipos M identificados. La proteína M inhibe la fagocitosis mediante su unión a la proteína reguladora del complemento conocida como factor H y al fibrinógeno, además de favorecer la degradación del factor del complemento C3b.^{16,17} La formación de anticuerpos anti-M brinda protección al organismo hospedero promoviendo la fagocitosis y muerte de la bacteria. Sin embargo, en algunas ocasiones estos anticuerpos también pueden reaccionar de manera cruzada contra los tejidos propios del hospedero. Más adelante se describirá con detalle esta proteína.¹⁸

➤ **Cápsula**

Está formada por un polímero de ácido hialurónico, contiene unidades de repetición de ácido glucorónico y N-acetilglucosamina, no es inmunogénica

y protege al estreptococo contra la fagocitosis, ya que interfiere en el reconocimiento por células polimorfonucleares,¹⁹ bloquea el acceso de anticuerpos, inhibe la formación del complemento y la unión a la trampa extracelular de neutrófilos (estructuras extracelulares compuestas de ADN y proteínas antimicrobianas).²⁰ Las cepas que producen una mayor cantidad de cápsula desarrollan colonias con apariencia mucóide cuando se cultivan en agar sangre, este tipo de colonias se han observado con mayor frecuencia en aislamientos de infecciones invasivas.²¹

➤ **Proteínas semejantes a M.**

Existen genes relacionados con el gen que codifica para la proteína M que son llamados superfamilia de genes M que codifican proteínas de unión a inmunoglobulinas (en la región Fc), actividad antifagocitaria o pueden unirse al inhibidor de proteasas α 2-microglobulina. Se ha sugerido que las proteínas que enlazan inmunoglobulinas tienen un papel importante en las secuelas que se presentan posteriores a una infección por estreptococo.^{8,19}

➤ **Proteína F**

La proteína F es una adhesina no fibrilar, que juega un papel importante en el primer paso de colonización ya que se une a la fibronectina localizada en la matriz extracelular de las células epiteliales de la faringe y de la piel. La presencia del gen de la proteína F (*prtF1*) se asocia con algunos serotipos M.^{8,12}

➤ **Estreptocinasa**

También conocida como fibrinolisisina y es expresada por todas las cepas de *S. pyogenes* como factor de diseminación. Promueve la degradación de los coágulos al convertir plasminógeno a plasmina.^{11,12}

➤ **Exotoxinas pirogénicas**

La exotoxina pirogénica (Spe) A es responsable de muchas de las manifestaciones o síntomas de la fiebre escarlatina y del síndrome de choque tóxico. La *speA* exhibe una variedad de propiedades tóxicas como la pirogenicidad, citotoxicidad y aumento de la susceptibilidad a los efectos letales de la endotoxina.¹⁴ Entre las Spe, las toxinas A y C pueden producir fiebre, un efecto sobre el sistema inmune como superantígenos. La respuesta inflamatoria disparada por ellas puede conducir a respuestas de tipo autoinmune.²² Han sido asociadas a enfermedades invasivas y son producidas por medio de recombinación de fagos, ya que son de origen diverso y de alta movilidad.

➤ **Estreptolisinas**

Existen dos tipos de hemolisinas liberadas por *S. pyogenes*, las cuales son denominadas O y S. La estreptolisina O deriva su nombre por ser lábil al oxígeno y es antigénica. La titulación de los anticuerpos antiestreptolisina O en suero humano ha probado ser una prueba útil como indicador de infección estreptocócica reciente. Por otro lado, la estreptolisina S es una hemolisina producida por los estreptococos en presencia de suero y no es antigénica.

Tiene la capacidad de dañar la membrana de leucocitos, plaquetas y organelos subcelulares. No es inactivada por el oxígeno y es termolábil.

Dadas las características de ambas hemolisinas se observa que la hemólisis en la superficie del agar es causada principalmente por la estreptolisina S, en tanto que la hemolisina O exhibe su efecto en la profundidad del agar debajo del desarrollo bacteriano.¹⁴

➤ **DNasa**

Despolimerizan al ADN libre presente en el pus, reduciendo así la viscosidad del medio en el absceso, facilitando la diseminación de las bacterias.¹⁷

➤ **Peptidasa C5a**

Es una proteína inmunogénica con actividad proteolítica codificada por el gen *scpA*. Está presente en la superficie de la bacteria y colabora en el mecanismo antifagocítico al romper el factor quimiotáctico derivado del complemento C5a en su sitio de unión con los PMN, inhibiendo el reclutamiento de células fagocíticas al sitio de infección.²³ Estimula la producción de anticuerpos específicos contra esta proteína estreptocócica y ha sido considerada para la elaboración de vacunas.^{12,17}

➤ **Proteína estreptocócica inhibidora de la lisis mediada por el complemento (Sic).**

El gen *sic* que codifica para la proteína inhibidora de la lisis mediada por el complemento (Sic) es muy polimórfico y sólo se ha determinado su presencia en los serotipos M1 y M57. Sic bloquea al complejo de ataque a la membrana

del complemento y contribuye a la virulencia de los estreptococos del grupo A mediante la inhibición de péptidos antibacterianos.^{8,9}

1.2.2. Principales enfermedades asociadas a *S. pyogenes*.

Streptococcus pyogenes forma parte de los microorganismos patógenos extracelulares más comunes para el humano, causante de una gran variedad de enfermedades con amplio grado de severidad. Los sitios que coloniza con mayor frecuencia son las mucosas superficiales, garganta y piel.^{19,21} El tracto respiratorio superior es la vía de entrada más común para la bacteria. Los portadores asintomáticos son una fuente importante de transmisión de *S. pyogenes* y se presenta con mayor frecuencia en niños que en adultos. Las enfermedades más comunes son las **no invasivas** como faringitis, fiebre escarlatina e impétigo.²² También hay **secuelas no supurativas** posteriores a una infección por estreptococo, la enfermedad se desarrolla a causa de reacciones inmunes de una a cinco semanas después de haber superado la infección por el sistema inmune o por el tratamiento antimicrobiano, de estas enfermedades destacan la Fiebre Reumática y la Glomerulonefritis. Finalmente están las infecciones **invasivas** que se presentan cuando la bacteria tiene la capacidad de romper la barrera epitelial y llegar a sitios estériles como sangre, fluido cerebroespinal, articulaciones, hueso, líquido sinovial y órganos;²² ejemplo de ello es el desarrollo del síndrome de choque tóxico estreptocócico por complicaciones aumenta la mortalidad hasta 81%, convirtiéndolo en una de las formas más severas de enfermedad invasiva junto con la fascitis necrosante y sepsis neonatal.²⁴ (Tabla 1)

Tabla 1. Enfermedades provocadas por EGA, clasificadas de acuerdo con su invasividad.²⁵

ENFERMEDADES	
No invasivas	Faringitis Fiebre escarlatina (Mediada por toxina) Impétigo (Pioderma)
Invasivas	Sepsis purpural Meningitis Fascitis necrosante (Mediada por toxina) SSTS (Mediada por toxina)
Secuelas no supurativas	Fiebre reumática Glomerulonefritis post-estreptococcica

1.2.3. Incidencia

Aunque *Streptococcus pyogenes* es sensible a la penicilina,²⁶ en los últimos 30 años se ha observado un incremento de la incidencia de las infecciones invasivas por EGA en diferentes zonas geográficas, incluyendo cuadros de considerable gravedad clínica, sin conocerse bien las causas de dicho aumento. En el año 2012, 11 países europeos iniciaron un proyecto de investigación y vigilancia de enfermedad invasiva por EGA para conocer la epidemiología de esta enfermedad. En este estudio se encontró que en Europa la incidencia de la enfermedad invasiva por EGA varía entre 0.4 a 4.8/100 000 personas/año, mientras que en EU está en 3.54/100 000 personas/año.²⁷ En el año 2017 se realizó en España un estudio retrospectivo de los últimos 8 años, para evaluar la incidencia de la enfermedad invasiva por EGA. Los resultados mostraron que la incidencia se triplicó de 5.6 a 18.9 casos/100 000 de urgencias pediátricas por año.²⁸

La incidencia de EGA parece estar aumentando en los últimos años en todo el mundo, como lo muestran algunos estudios recientes realizados en niños y adultos. La epidemiología de los EGA no se conoce bien en la mayoría de los países, incluido el nuestro, al no existir un sistema de vigilancia epidemiológico adecuado, por lo que los datos de incidencia son muy limitados.²⁹

La tipificación de la proteína M es una herramienta útil para la vigilancia epidemiológica. La importancia de determinar el tipo M, ya sea por técnicas serológicas o por medio de la secuenciación del gen *emm*, radica en que se ha observado que la infección causada por una cepa con un tipo M específico desarrolle manifestaciones clínicas de una enfermedad en particular.¹³ En la tabla 2 se puede observar la asociación que se ha descrito entre las manifestaciones clínicas de la enfermedad con los tipos M específicos.

Tabla 2. Ejemplos de enfermedades asociadas a diferentes tipos de proteína M de *S. pyogenes*. (Modificado)¹³

Enfermedades	Tipos M asociados
Faringitis	M1 , M3, M5, M6, M12 , M14, M17, M19, M24
Fiebre reumática	M1 , M3 M5, M6, M11, M12 , M14, M17, M18, M19, M24, M27, M29, M30, M32, M41
Fascitis necrotizante	M1 , M3, M28
SSTE	M1 , M3
Impétigo	M33, M41, M42, M52, M53, M70, M28
Glomerulonefritis	M1 , M4, M12 , M49. M55, M57, M60
Meningitis	M1 , M12

En estudios realizados previamente en el laboratorio de Epidemiología Molecular de la Facultad de Medicina de la UNAM en México, los tipos M más frecuentes en el 2006 fueron el M12(19.7%), M1(18.5%) y M75(13.9%).³⁰ En otro estudio realizado

en el mismo laboratorio en el 2014, se encontró muestra que los tipos mas frecuentes fueron el M1 (21.4%), M12 (15.3%) y M11 (10.7%).³¹

A pesar de la variación genética que ha presentado la proteína M a través del tiempo, incluyendo cambios en su virulencia y en factores de resistencia a antibióticos, estas asociaciones permanecen estables. Esto indica que la proteína M por sí misma, o las proteínas codificadas por genes relacionados con el gen *emm*, son las fuentes más probables de las presentaciones clínicas específicas.^{32,33}

1.2.4. Proteína M y su tipificación.

Representa el factor de virulencia de mayor importancia debido a su actividad antifagocítica en ausencia de anticuerpos opsonicos, a la interacción que presenta con numerosas proteínas del hospedero en el proceso de infección y a su variabilidad antigénica.¹⁹

La proteína M (Figura 4) está compuesta por dos cadenas polipeptídicas con configuración alfa hélice, que están ancladas en la membrana celular, atravesando la pared celular y apareciendo como fibras en la superficie celular. El extremo carboxilo terminal (COOH-) de la proteína, se encuentra altamente conservado entre las cepas de EGA. La porción amino terminal (-NH₂) varía entre los diferentes aislamientos clínicos. Esta porción, junto con el segmento de la región adyacente A, constituye la región hipervariable de la proteína.^{13, 19}

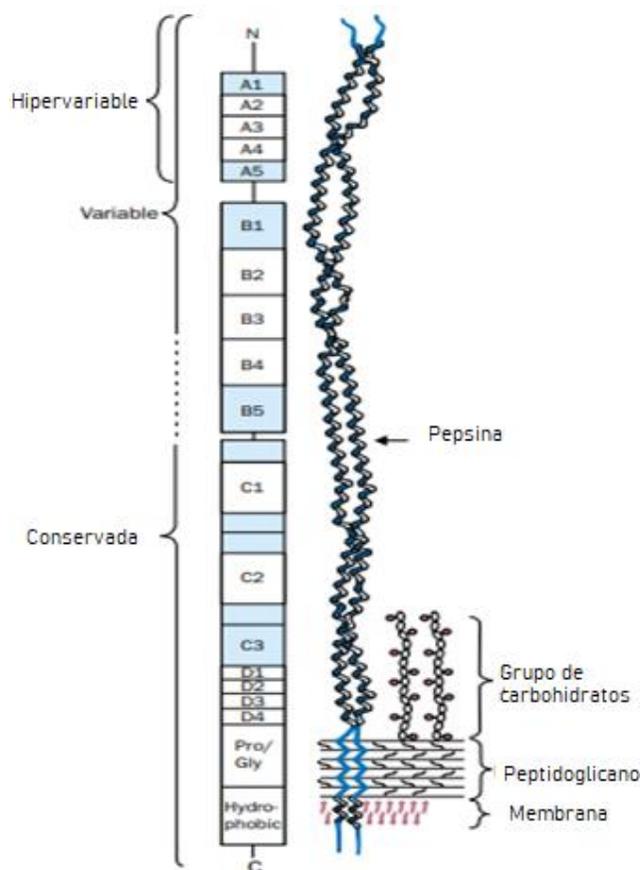


Figura 4. Características de la secuencia completa de la Proteína M.¹⁹ Las cadenas están conformadas de bloques repetitivos (A-D), cada uno difiere en tamaño y en la secuencia de aminoácidos (aa). La estructura del extremo carboxilo terminal (COOH-) de la proteína, está localizada entre la pared y la membrana celular. La porción amino terminal (-NH₂) se extiende hacia la superficie y concluye en una serie de aproximadamente 11 aa.

La región amino terminal (NH₂) fue empleada por Lancefield para determinar serológicamente los tipos M y actualmente mediante el estudio de la secuencia del gen *emm*, que codifica para la proteína M, se realiza la tipificación molecular de las cepas de *S. pyogenes*, hasta ahora se conocen más de 200 tipos M.⁹ La variación antigénica de la proteína M le permite al EGA evadir el ataque de anticuerpos. Dependiendo del tipo M puede unirse en mayor o menor grado a ligandos como plasmina, albúmina, IgA, IgG y factor H. La proteína M impide la fagocitosis por la

vía alterna del complemento al unirse al factor H (inhibidor de la vía clásica), al igual que la vía clásica cuando la proteína de unión a C4 se une a la región hipervariable.¹⁹

El análisis molecular del gen *emm* permite la identificación de los factores de virulencia individuales para cada tipo M de EGA lo que sin duda permitirá entender mejor el mecanismo por el que esta bacteria ocasiona la diversidad de cuadros clínicos en los que se ve involucrada.¹⁰

La tipificación de las cepas de EGA es frecuentemente usada para caracterizar la epidemiología y patogénesis de las infecciones por esta bacteria. Hasta el momento existen tres formas para tipificar a *S. pyogenes*

1.- Tipificación serológica. Las diferencias antigénicas en la región hipervariable constituyen la base para la tipificación serológica establecida por Lancefield.

2.- Cortes enzimáticos. El blanco más común de los métodos de tipificación es la proteína M. Un sistema de tipificación molecular empleando enzimas que cortan a la proteína M en puntos específicos formando patrones de corte.

3.- Secuenciación. Tipificación de la secuencia *emm*, si el tipo M se determina por este método se le llama genotipo M, el cual se basa en el análisis de la región hipervariable amino terminal del extremo 5' del gen *emm* (que codifica para la proteína M).³⁴

La identificación de los genes *sic* (factor de estreptococo que inhibe la lisis mediada por complemento) y *sof* (factor de opacidad) son auxiliares en la tipificación.

❖ **Inhibidor estreptocócico del complemento. (SIC)**

Es una proteína extracelular de 31 kDa codificada por el gen *sic*, el cual cuenta con más de 300 variantes alélicas en M1. La proteína Sic interfiere con la formación del complejo de ataque de membrana al inhibir la unión del complejo del complemento C5b67 con la membrana celular del huésped haciendo a la bacteria resistente a la lisis mediada por el complemento.^{35,36}

La localización del gen *sic* en el genoma de *S. pyogenes* el tipo M1 está relacionada con la presencia de una secuencia de inserción IS1562. El gen *sic* puede estar ligado a elementos genéticos móviles al encontrarse localizado cerca de una transposasa *spy2009* que está ubicada río abajo del regulón *mga*.³⁴

❖ **Factor de opacidad del suero. (SOF)**

Es una proteína extracelular con un tamaño de 110 kDa que está unida a la pared celular y es codificada por el gen *sof*.³⁷ Es una lipoproteína, la cual es detectada por su capacidad para opacificar el suero. La propiedad de producir factor de opacidad es estrictamente específica del tipo y es antigénica. Esta sustancia es importante por su utilidad como marcador epidemiológico ya que ayuda a clasificar los *Streptococcus*. La respuesta inmune es específica de tipo y no específica a la proteína M, es generalmente más débil después de la infección faríngea con cepas *sof* positivas que con *sof* negativas.³⁸

El gen *sof* se ha asociado con tipos M específicos (M2, M4, M11, M12, M22, M28, M44, M48, M49, M75, M87, M89, M90).³⁴

1.2.5. Exotoxinas

EGA produce distintas exotoxinas pirogénicas estreptocócicas (*spe*) de 24 a 28 kDa que están relacionadas entre sí y son producidas por cepas lisogénicas. La virulencia de *S. pyogenes* está determinada también por una serie de genes (*speA*, *speB*, *speC*, *speF*, *speG*, *speH*, *speJ*, *smeZ* y *smeZ-2*) que codifican para la producción de exotoxinas: A, B, C, F (factor mitogénico), G, H, J, SSA (superantígeno de estreptococo) y SMEZ respectivamente. En relación con el huésped, los principales factores que aumentan el riesgo de presentar SSTE y enfermedad invasora con edades cortas o avanzadas.³⁹ Las exotoxinas A y C son codificadas genéticamente por los bacteriófagos T12 y CS112 respectivamente, por lo que no todas las cepas presentan estos factores de virulencia.

Las toxinas más estudiadas son SpeA, SpeB, SpeC, que son factores de virulencia de gran importancia debido a su actividad como superantígenos (Figura 5), al ser capaces de interactuar simultáneamente con la cadena α o β del MHC II con la región variable V β del receptor de la célula T sin procesamiento del antígeno, resultando en la estimulación de forma directa e inespecífica de hasta el 20% de las células T originando la liberación excesiva de citocinas inflamatorias (IL-1, IL-6, interferón gamma y factor de necrosis tumoral alfa) provocando como consecuencia fiebre y shock sistémico.^{19,40}

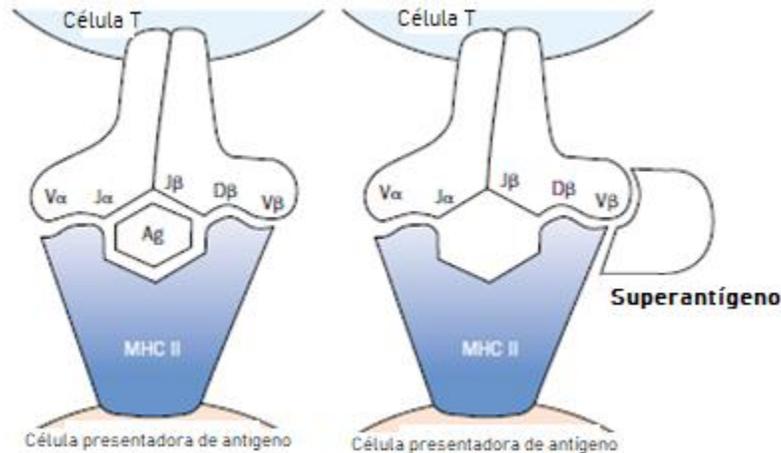


Figura 5. Interacción del superantígeno.¹⁹ Las spe funcionan como superantígenos, que estimulan los linfocitos T de forma específica al unirse al complejo principal de histocompatibilidad clase II. Los linfocitos T activados liberan citocinas que median el choque séptico y la lesión de los tejidos. MHC II y una célula T mediada por antígeno (izquierda) e inducida por superantígeno (derecha)

- ✓ **SpeA.** Es una toxina eritrogénica. Es producida por la mayoría de las cepas de *S. pyogenes* de los tipos M1 y M3 que se han visto relacionados con casos de SSTS, fiebre escarlatina (responsable de la erupción-rash), fiebre reumática aguda y fascitis necrosante. Tiene dos dominios conservados, el C-terminal y N-terminal, en este último se encuentra el sitio de unión a la cadena alfa de MCH II, además presenta un sitio de unión a zinc entre los dominios.³⁴
Ha sido detectada en más de 85% de las cepas responsables de procesos invasivos y sólo en el 15% de las cepas en cuadros no invasivos.
- ✓ **SpeB.** Conocida también como cisteína proteasa es producida por todas las cepas de EGA. Degrada tanto proteínas del hospedero como de la bacteria, se ha demostrado que la eliminación de esta proteína disminuye la virulencia del estreptococo.³⁴
- ✓ **SpeC.** Toxina encontrada en mayor frecuencia en aislamientos clínicos. Tiene preferencia por la cadena Vβ2.1 del TCR, se une a una amplia variedad de moléculas de MHC II y se une a la cadena beta en forma de dímero estabilizado por un segundo sitio de unión a zinc.³⁴

III. JUSTIFICACIÓN

Streptococcus pyogenes es un patógeno reconocido para el humano, asociado con una gran variedad de enfermedades, siendo la más común la faringitis, seguida de las secuelas tradicionales como la glomerulonefritis postestreptocócica fiebre reumática aguda, así como infecciones invasivas severas como la fascitis necrosante, fiebre escarlatina y el síndrome de choque tóxico estreptocócico.

Se sabe que los factores de virulencia juegan un papel importante en la fisiopatogenia. Entre estos factores de virulencia, la proteína M y las exotoxinas estreptocócicas son reconocidas como las más importantes.

Actualmente se han descrito más de 200 tipos de M, algunos se han asociado a enfermedades específicas al igual que las toxinas estreptocócicas A y C que son de las más estudiadas por su relevancia médica ya que la toxina A está asociada con la fiebre escarlatina y el SSTS que pueden llegar a ser mortales. La identificación de los tipos M ayuda a conocer su frecuencia, ofrece información epidemiológica sobre cambios en su distribución en las poblaciones, las toxinas A y C contribuyen al conocimiento de la relación que éstas tienen con los diferentes tipos M asociadas con enfermedades invasivas o no invasivas. Por lo que es importante tener una vigilancia epidemiológica de *S. pyogenes* ya que se ha visto que las frecuencias cambian dependiendo de la región y el año. Debido a que *S. pyogenes* se asocia con múltiples enfermedades, es necesario realizar el seguimiento epidemiológico que representa la infección por esta bacteria.

IV. HIPÓTESIS

- Los tipos M de *S. pyogenes* más frecuentes serán M1, M12 y M75, la toxina C se presentará con mayor frecuencia y la toxina A se asociará con mayor frecuencia al tipo M1.

V. OBJETIVOS

1. General:

- ✓ Establecer la relación entre el genotipo M y los genes asociados a factores de virulencia, *sic*, *sof*, *speA*, *speC* en cepas de *Streptococcus pyogenes* aisladas de muestras clínicas.

1.1. Particulares:

- ✓ Identificar el tipo M mediante la caracterización molecular del *gen emm*
- ✓ identificar la presencia de los genes *sic*, *sof*, *speA*, *speC*
- ✓ Establecer la relación de los genes de virulencia y los tipos M más frecuentes.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

1. *Diseño*

El presente estudio es transversal, observacional, retrospectivo, comparativo y cerrado.

2. *Criterios*

Inclusión: 100 cepas de *S. pyogenes* aisladas de casos clínicos.

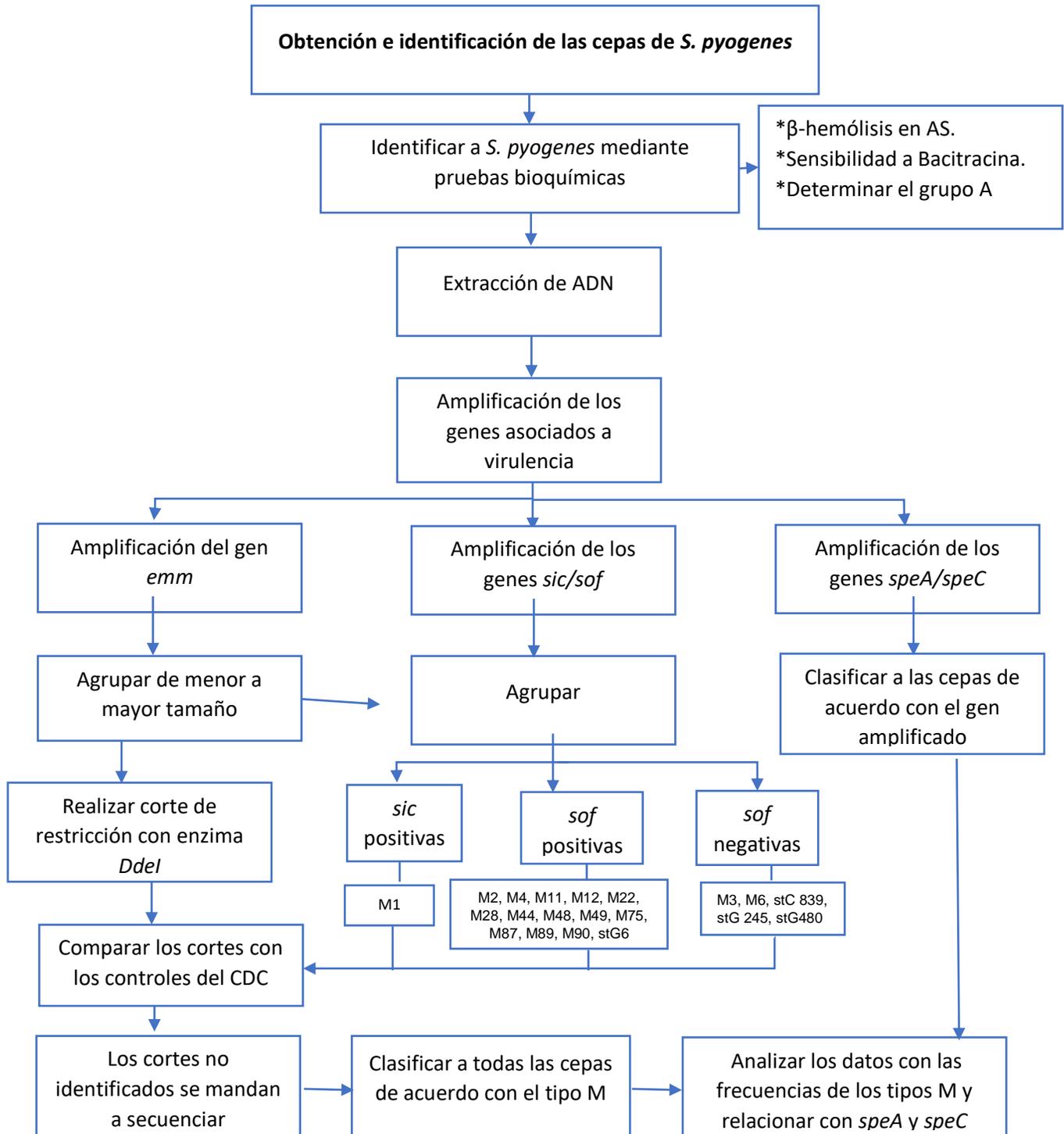
Exclusión: Cepas que no fueron *S. pyogenes*.

Eliminación: Cepas no viables o cepas que no amplificaron el gen *emm*.

Tabla 3. Origen de los cultivos de *Streptococcus pyogenes*

LUGAR DE PROCEDENCIA	No. CEPAS	CULTIVOS
Centro de Apoyo Diagnóstico San Rafael ISSSTE (CAD San Rafael)	73	Faríngeos
Hospital Gonzalo Castañeda (ISSSTE Tlatelolco)	4	Faríngeos
Unidad de Medicina Familiar 20 IMSS (UMF 20 IMSS)	8	Faríngeos
Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán (LESP Michoacán)	10	2 Faríngeos 8 Invasivos
Alumnos de Facultad de Química de la UNAM (FQ)	5	Faríngeos

3. Metodología



4. Métodos

4.1. Cultivo de muestras

Para confirmar la pureza de las cepas, se sembraron en AS por estría cruzada y se incubaron a 37°C en condiciones de microaerofilia por 24 h para obtener colonias β-hemolíticas aisladas y observar pureza. Se realizó la prueba de bacitracina y CAMP. Asimismo, se llevaron a cabo las pruebas serológicas con el kit comercial Pastorex™ Strep de (BIO-RAD®) para conocer el grupo de Lancefield correspondiente. Las cepas fueron conservadas en caldo BHI con glicerol al 15%, a una temperatura de -70°C.

4.2. Extracción ADN

La extracción de ADN se realizó con el Kit comercial DNeasy Tissue (Qiagen®), siguiendo la metodología indicada por el fabricante. Para obtener el inóculo a una concentración de aprox 2×10^9 bacterias/mL utilizado para la extracción del ADN de *S. pyogenes* se inocularon 15 colonias en caldo TH incubando de 18 a 24 h a 37°C en agitación constante.

La calidad y cantidad del ADN extraído se evaluó mediante electroforesis, 3 µL de ADN extraído se cargaron en un gel de agarosa al 1.0% con 0.2 µg/mL (2mL/100mL) de Bromuro de Etidio (Research Organics®) y se visualizó en un transiluminador UV Macro Vue Uvis-20 (Hoefer®).

4.3. Amplificación de genes de virulencia (*emm*, *sic*, *sof*, *speA*, *speC*) por PCR

La amplificación de los genes de virulencia *sic*, *sof*, *speA*, *speC* de *S. pyogenes* a partir de ADN extraído de cada cepa se realizó mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Cada ciclo de la reacción consta de tres etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión. (Figura 6).



Figura 6. Esquema de PCR que se utilizó para la amplificación de los genes *sic*, *sof*, *speA*, *speC* de *S. pyogenes*

La técnica de PCR consta de tres fases. Para la fase de inicio de la PCR, la mezcla de reacción se lleva a una temperatura de 94°C por 5 min (desnaturalización inicial). Fase de reacción (30 ciclos) con las siguientes etapas: 1) Desnaturalización de 94°C por 60 s. En esta fase se lleva a cabo la separación de las cadenas del ADN. 2) Alineamiento de los oligonucleótidos con la cadena complementaria de ADN a una temperatura de 50°C durante 60 s. 3) Elongación, cuando la *Taq* polimerasa identifica al oligonucleótido y amplifica la cadena complementaria del segmento específico del gen en estudio a 72°C por 1 min 20 s. El termociclador se mantuvo

trabajando por 30 ciclos y fase final donde la mezcla de reacción se somete a 72°C por 7 min (extensión final) y se detiene la reacción bajando la temperatura a 4°C.

La amplificación de los genes *emm*, *sic*, *sof*, *speA* y *speC* se realizó para las 100 cepas de *S. pyogenes* bajo condiciones previamente probadas en el laboratorio. La mezcla de reacción para cada gen se describe en las siguientes tablas.

Tabla 4. Mezcla de reacción para amplificar el gen *emm*

REACTIVOS	Volumen (50µL)
Buffer de reacción 10x	5
MgCl ₂ 50mM	3
dNTP's 1.25mM	8
Primer <i>emm</i> A 10µM	1.3
Primer <i>emm</i> B 10µM	1.3
Taq polimerasa 5U/µL	0.2
H ₂ O ultrapura	29.3
DNA <i>S. pyogenes</i>	2

Tabla 5. Mezcla de reacción, PCR dual para amplificar los genes *sic/sof*

REACTIVOS	Volumen (30µL)
Buffer de reacción 10x	3
MgCl ₂ 50mM	2
dNTP's 1.25mM	5
Primer <i>sic</i> 1 10µM	0.8
Primer <i>sic</i> 2 10µM	0.8
Primer <i>sof</i> 1 10µM	0.8
Primer <i>sof</i> 2 10µM	0.8
Taq polimerasa 5U/µL	0.1
H ₂ O ultrapura	15.5
DNA de <i>S. pyogenes</i>	2

Tabla 6. Mezcla de reacción, PCR dual para amplificar genes *speA/speC*

REACTIVOS	Volumen (30µL)
Buffer de reacción 10x	3
MgCl ₂ 50mM	1.5
dNTP's 1.25mM	3
Primer <i>speA1</i> 10µM	0.3
Primer <i>speA2</i> 10µM	0.3
Primer <i>speC1</i> 10µM	0.3
Primer <i>speC2</i> 10µM	0.3
Taq polimerasa 5U/µL	0.06
H ₂ O ultrapura	20
DNA de <i>S. pyogenes</i>	2

4.4. Electroforesis

Después de amplificar el gen de interés, se visualizó en un gel de electroforesis de agarosa al 1.7% en amortiguador TBE 0.5x. La cantidad de producto amplificado por PCR que se agregó a cada pozo fue de 4 µL, se usó el marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Scientific®), la corriente utilizada fue de 90 V durante 40 min. Se agregaron 2 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL por cada 100 mL de agarosa) y se visualizó en un transiluminador UV y se tomó una fotografía digital.

4.5. Tipificación de la proteína M

Para la identificación del tipo M de las cepas, se realizó la amplificación del gen *emm*, en geles de agarosa al 1.7% observando los productos por medio de una electroforesis y se determinó el tamaño del producto (pares de bases) mediante el software Kodak 1D 3.5 teniendo como referencia el marcador de peso molecular GeneRuler 100pb (0.5µg/µL) DNA Ladder Plus (Thermo Scientific®). Los resultados

de la PCR de los genes *sic* y *sof* se utilizaron de escrutinio para caracterizar los tipos M.

Para identificar el tipo M de cada cepa, se realizó el corte enzimático del gen *emm* con la enzima de restricción *DdeI* (Thermo Scientific) que corta el ADN al reconocer la secuencia 5´C TNAG-3´ (donde N puede ser cualquier base).

El volumen final por muestra fue de 40 µL (Tabla 7), se incubó por 24 h a 37°C. Posteriormente para facilitar la identificación el corte se reveló en un gel de agarosa al 2.5% con las muestras que compartieron pesos moleculares similares y genotipo *sic* y *sof*, con electroforesis a una corriente de 90 V durante 83 min y un marcador de 50 pb.

Tabla 7. Mezcla de reacción para el corte de restricción del gen *emm* con la enzima *DdeI*.

REACTIVOS	Volumen (40µL)
Buffer de reacción 10x	4
Enzima <i>DdeI</i>	0.2
Producto de PCR gen <i>emm</i>	35.8

Una vez obtenido el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP´s) o patrón de restricción resultante de la digestión enzimática, se tomó una fotografía digital. Posteriormente se clasificaron los patrones de restricción, mediante el criterio de que las muestras que pertenecían a un mismo tipo M mostrarían un patrón de corte igual. Estos patrones se compararon con una serie de cortes de restricción obtenidos de cepas de referencia de los CDC y de cepas tipificadas anteriormente en el laboratorio. De esta manera se asigna un tipo M correspondiente.

4.6. Secuenciación

Las cepas cuyos patrones de restricción del gen *emm* no pudieron identificarse mediante la comparación con los patrones de referencia del laboratorio, se determinó la secuencia del gen en Macrogen™ (Seoul, Korea), para esto se realizó una nueva amplificación del gen *emm* de estas cepas y cuando se realizó el gel se observó que el producto de PCR presentara una concentración entre 5 y 20 ng/μL para realizar la secuenciación. Para determinar la masa molecular de las muestras a secuenciar, las muestras se corrieron en un gel de garosa y se utilizó el marcador de peso y masa molecular Low Mass (Gibco BRL®), se le tomó una foto digital y mediante el Software Kodak 1D 3.5 se determinó la concentración de ADN.

Las muestras se enviaron por servicio de paquetería internacional para ser secuenciadas en la empresa Macrogen™ (Seoul, Korea), utilizando el oligonucleótido *emmA* como iniciador. La determinación del tipo M se realizó utilizando el servicio de tipificación que proporciona el laboratorio de estreptococos de los CDC en Atlanta, Ga. Estados Unidos (<https://www2.cdc.gov/vaccines/biotech/strepblast.asp>). En el sitio web se ingresa la secuencia obtenida del gen *emm* y los resultados del alineamiento son enviados al correo electrónico.

Una vez tipificadas las cepas de *S. pyogenes*, mediante el análisis de su patrón de restricción, se procedió a analizar la distribución general de los tipos M obtenidos, así como las frecuencias de los tipos M entre los laboratorios de origen y sus toxinas.

VII. RESULTADOS

1. Origen clínico de las cepas

Las 100 cepas aisladas de *Streptococcus pyogenes* provenían de diferentes entidades (Figura 7). El 73% de las cepas aisladas provenían de la CAD San Rafael, el 10% del LESP Michoacán, el 8% de la UMF 20 del IMSS, el 5% fueron aisladas de alumnos de la FQ de la UNAM y el 4% del ISSSTE Tlatelolco. El 92 % de las cepas provenían de cultivos faríngeos, el 8% restante fueron cepas aisladas de infecciones de piel como: infección en herida, absceso de codo, un caso de varicela, fascitis necrosante invasiva, artritis séptica y un caso de hemorragia subaracnoidea. Todas estas cepas provenían del laboratorio estatal de Michoacán.

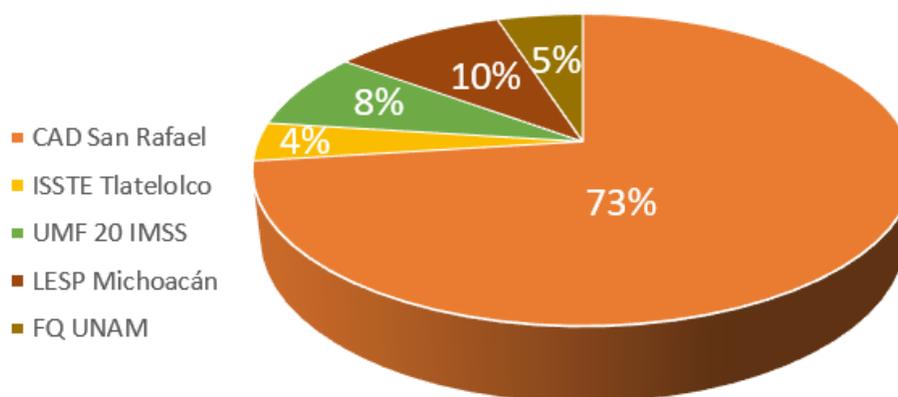


Figura 7. Distribución de las cepas aisladas de *S. pyogenes* recolectadas en diferentes centros de salud en el periodo del 2011 al 2019.

2. Integridad y pureza de la extracción del ADN

En la figura 8 se muestran las bandas de ADN's obtenidas por el método de extracción en columna previamente descrito. La extracción es el primer paso y el más importante en el proceso de tipificación de las cepas. Se debe obtener ADN íntegro y libre de impurezas, es decir, que al momento de observar en el gel de agarosa la banda correspondiente a cada cepa sea única, sin barrido y de buena intensidad.

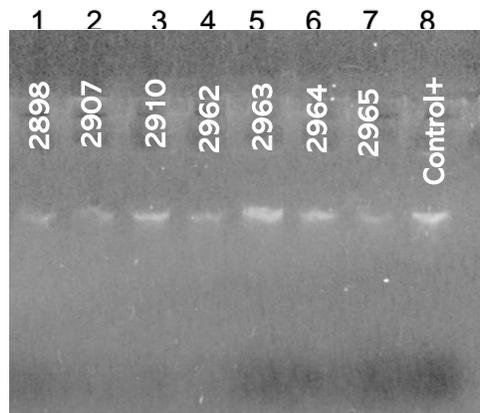


Figura 8. ADN extraído de cepas aisladas de *S. pyogenes* (carriles 1-7 cepas; carril 8 control de extracción) en un gel de Agarosa al 1%

3. Amplificación del gen *emm*

A partir del ADN extraído se realizó la amplificación del gen *emm* (gen que codifica para la proteína M), con la ayuda del marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Scientific®) y del Software Kodak 1D 3.5v. En el gel de agarosa se pudo observar la presencia de una banda de 950 a 1600 pb (figura 9). El peso molecular de cada tipo M de *S. pyogenes* varía de acuerdo con las diferencias en el número de repeticiones de aminoácidos de la región hipervariable de la proteína M.

Las cepas se agruparon de mayor a menor tamaño de tal manera que los pesos moleculares similares posiblemente tendrían el mismo corte por pertenecer al mismo tipo M.

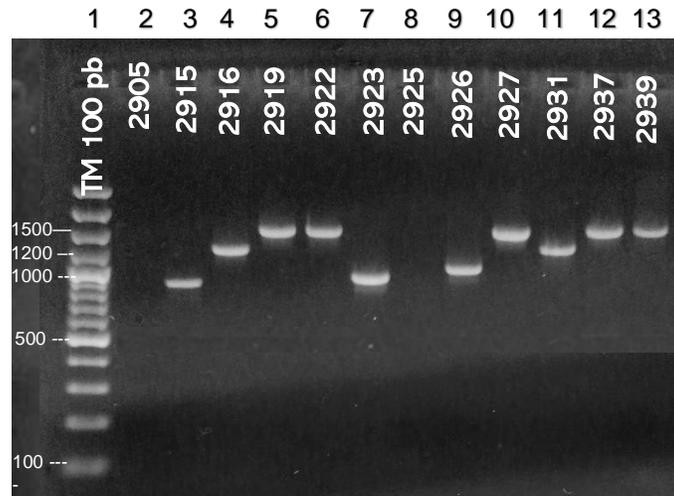


Figura 9. Producto de PCR del gen emm en un gel de agarosa al 1.7%.
Carriles 3,7,9 cepas de *S. pyogenes* con un tamaño aproximado de 1000 pb; carriles 4,11 tamaño aprox. de 1300 pb y carriles 5, 6, 10, 12, 13 cepas con un tamaño aprox. de 1500 pb, carriles 2 y 8 sin producto (se volvieron a amplificar), carril 1 marcador de PM 100 pb (Thermo Scientific®).

4. Amplificación de los genes sic/sof

Se realizó la amplificación de los genes *sic* y *sof* mediante un PCR dual (Figura 10). Se identificaron las probables cepas tipo M1 de *S. pyogenes*, al observar la banda correspondiente al *sic*. Las cepas que amplificaron el gen *sof* se clasificaron en otro grupo al igual que las cepas que no amplificaron ninguno de los dos genes. De las 100 cepas analizadas, 31 cepas resultaron *sic* positivas, 59 cepas *sof* positivas y 10 cepas no amplificaron ninguno de estos dos genes.

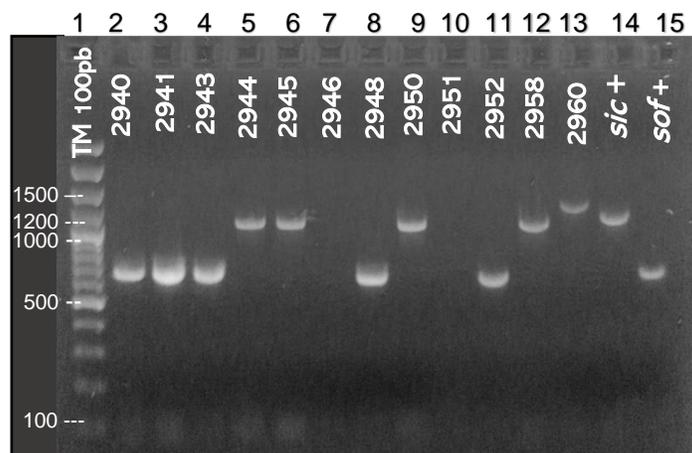


Figura 10. Amplificación de los genes *sic/sof* de las cepas de *S. pyogenes* en un gel de agarosa al 1.7%. Carriles 2-4, 8, 11 muestras *sof*+, carriles 5, 6, 9, 12, 13 muestras *sic*+, carriles 7 y 10 muestras *sof*-, carriles 14 y 15 controles para *sic* (1200pb) y *sof* (700pb) respectivamente, carril 1 marcador de TM 100 (Thermo Scientific®)

5. Amplificación de los genes *speA/speC*

Se realizó la amplificación de los genes *speA* y *speC* mediante un PCR dual (Figura 11). Se observaron, 32 cepas *speA* positivas, para el gen *speC* 56 cepas positivas, 2 cepas amplificaron ambos genes y 12 cepas fueron negativas para ambos genes.

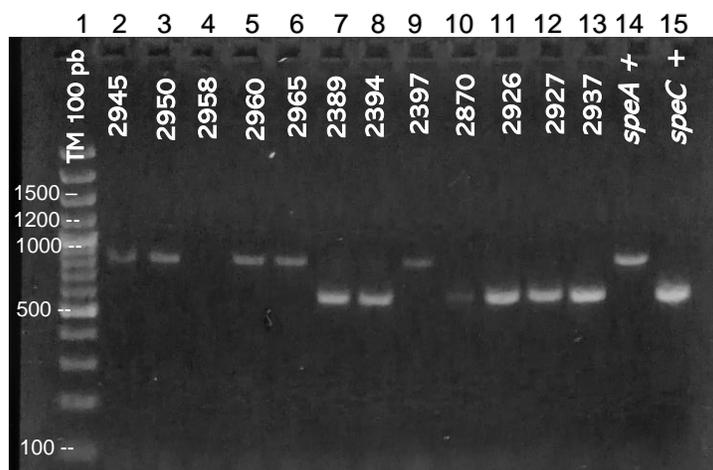


Figura 11. Amplificación de los genes *speA/speC* de las cepas de *S. pyogenes* en un gel de agarosa al 1.7%. Carriles 2, 3, 5, 6, 9 muestras *speA*+, carriles 7,8,10-13 muestras *speC*+, carril 4 muestra negativa, carriles 14 y 15 controles para *speA* (800 pb) y *speC* (600 pb) respectivamente, carril 1 marcador de TM 100 pb (Thermo Scientific®)

6. Corte de restricción con enzima Ddel

Para realizar el corte de restricción del producto de PCR del gen *emm*, se agruparon las cepas de acuerdo con su tamaño. Se agruparon todas las cepas que amplificaron el gen *sic* y se observó que por el corte de restricción pertenecían al tipo M1 (Figura 12).

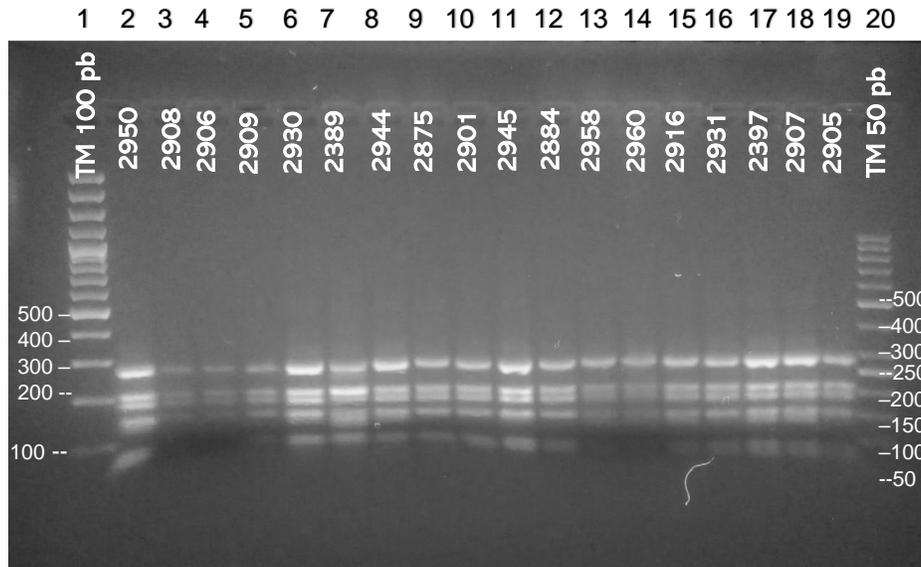


Figura 12. Corte de restricción del gen *emm* con enzima *Ddel* de las cepas *sic* positivas en un gel de agarosa al 2%. Carriles 2-19 corte de muestras *sic*+, carril 1 y 20 marcador de TM 100 pb y 50 pb (Thermo Scientific®) respectivamente.

En un segundo gel se observa el corte de restricción de las cepas que amplificaron el gen *sof*, agrupadas de acuerdo con su tamaño. Se observó que la gran mayoría pertenecen a un mismo tipo M ya que el corte que se muestra es muy similar (Figura 13).

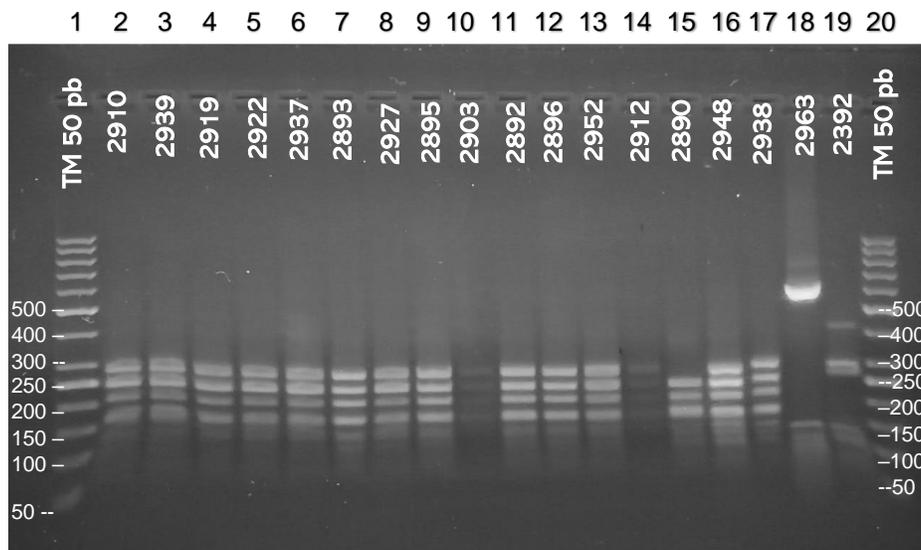


Figura 13. Corte de restricción del gen emm con enzima DdeI de las cepas sof positivas en un gel de agarosa al 2%. Carriles 2-19 corte de muestras sof+, carriles 1 y 20 marcador de TM 50 pb (Thermo Scientific®).

En el tercer gel se observa que hay diferentes tipos de corte, aunque se repiten ciertos patrones, todas estas cepas también amplificaron el gen sof (Figura 14).

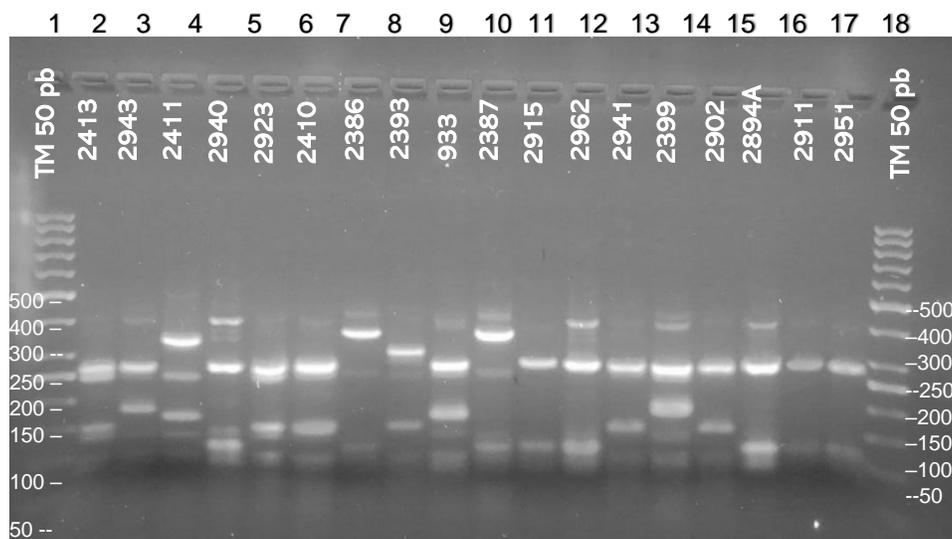


Figura 14. Corte de restricción del gen emm con enzima DdeI de las cepas sof positivas en un gel de agarosa al 2%. Carriles 2-19 corte de muestras sof+, carriles 1 y 20 marcador de TM 50 pb (Thermo Scientific®).

En la Figura 15 se observa que los patrones de corte para las cepas *sof* negativas, presentaron un patrón de bandeado similar. El patrón de restricción obtenido se comparó con los de las cepas control de CDC para determinar el tipo específico de M de cada muestra.

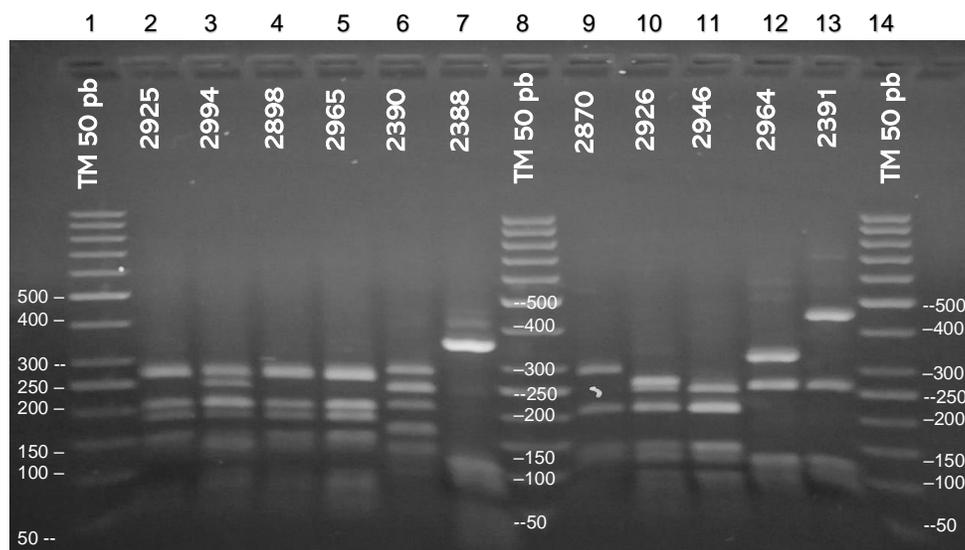


Figura 15. Corte de restricción del gen *emm* con enzima *DdeI* de las cepas *sof* negativas en un gel de agarosa al 2%. Carriles 2-7, 9-13 corte de muestras *sof*-, carriles 1, 8 y 14 marcador de TM 50 pb (Thermo Scientific®).

7. Secuenciación

Un conjunto de 15 cepas que su patrón de corte no coincidía con el de los controles, se dividieron en diferentes grupos de acuerdo con la similitud del patrón de corte que presentaron (Tabla 8). De cada grupo se seleccionó una cepa representativa para secuenciar (Tabla 8 marcadas en negritas).

Tabla 8. Cepas agrupadas de acuerdo con el patrón de corte observado.

Grupo	A	B	C	D	E	F	G
Cepas	2387 2388	2926 2946	2890 2938 2934 2935	2940 2392 2962 2894	2411	2391	2964

Una vez seleccionada la cepa para secuenciar se vuelve a amplificar el gen *emm* como se describe en la metodología. Se realizó la extracción y la cuantificación del DNA para secuenciar las diferentes cepas (Tabla 9).

Tabla 9. Concentración y tamaño del producto de PCR del gen *emm* de las cepas a secuenciar.

Cepa	Concentración (ng/μL)	Tamaño del producto (pb)
2387	61.8	806.2
2388	161.1	797.5
2391	72.2	1425.3
2411	48.6	877.8
2890	244.6	1288.8
2926	66.6	1034
2938	58.3	1590.4
2940	49.5	1023.2
2946	50.4	1152.3
2964	62.1	1340

A continuación, se muestran dos ejemplos de los resultados de secuenciación representados en electroferogramas de las cepas 2890 y 2940 respectivamente.

File: 2890_emm1.ab1 Run Ended: 2019/12/9 23:7:29 Signal G:1867 A:3514 C:3261 T:3441
 Sample: 2890_emm1 Lane: 96 Base spacing: 18.730602 873 bases in 10343 scans Page 1 of 2



Figura 16. Electroferograma de la cepa 2890

File: 2940_emm1.lab1 Run Ended: 2019/12/9 23:7:29 Signal G:1389 A:2473 C:2113 T:1945
 Sample: 2940_emm1 Lane: 90 Base spacing: 19.342577 868 bases in 10380 scans Page 1 of 2



Figura 17. Electroferograma de la cepa 2940

Para determinar el tipo M, se ingresó la secuencia obtenida del gen *emm* en forma de texto en el banco de datos de estreptococos del CDC en Atlanta, Georgia, Estados Unidos (<https://www2.cdc.gov/vaccines/biotech/strepblast.asp>) los resultados del alineamiento son enviados por correo electrónico.

```

>|cl|EMM75.0 emm75.0 (emm-cluster E6) subtype determining sequence. Identity
to bases
Length=180

Score = 325 bits (360), Expect = 5e-90
Identities = 180/180 (100%), Gaps = 0/180 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 50 GGCTTTGCAAACCAAACAGAAGTTAAGGCGGAAGAAGAACGTACTTTTACTGAGTTACCA 109
|||||
Sbjct 1 GGCTTTGCAAACCAAACAGAAGTTAAGGCGGAAGAAGAACGTACTTTTACTGAGTTACCA 60

Query 110 TATGAAGCACGATACAAAGCATGGAAAAGTGAAAATGATGAGCTTCGGGAAAATTATAGA 169
|||||
Sbjct 61 TATGAAGCACGATACAAAGCATGGAAAAGTGAAAATGATGAGCTTCGGGAAAATTATAGA 120

Query 170 AGGACCTTAGATAAGTTAATACTGAGCAAGGTAAGACTACGAGATTAGAAGAACAAAAT 229
|||||
Sbjct 121 AGGACCTTAGATAAGTTAATACTGAGCAAGGTAAGACTACGAGATTAGAAGAACAAAAT 180
  
```

Figura 18. Alineamiento de la secuencia y asignación del tipo M.

El resultado del tipo M es asignado al grupo al que pertenecía la cepa secuenciada (Tabla 10). Una vez obtenidos los datos de las 100 cepas se analizaron las frecuencias de cada tipo M (Figura 16).

Tabla 10. Tipos M de las cepas de *S. pyogenes* identificados mediante secuenciación.

Tipo M	4	6	12	75	87	stC839	stG4831
Cepas	2387 2388	2926 2946	2890 2938 2934 2935	2940 2392 2962 2894	2411	2391	2964

8. Análisis de frecuencias de los resultados obtenidos

- Tipos M y su distribución

Entre los 14 tipos M de *S. pyogenes* encontrados, el 31% correspondió al tipo M1, el 22% al tipo M12 y el 11% al tipo M89. Con una frecuencia $\leq 4\%$ se encontraron a los tipos M2, M3, M4, M6, M11, M43, M49, stC839 y stG4831.

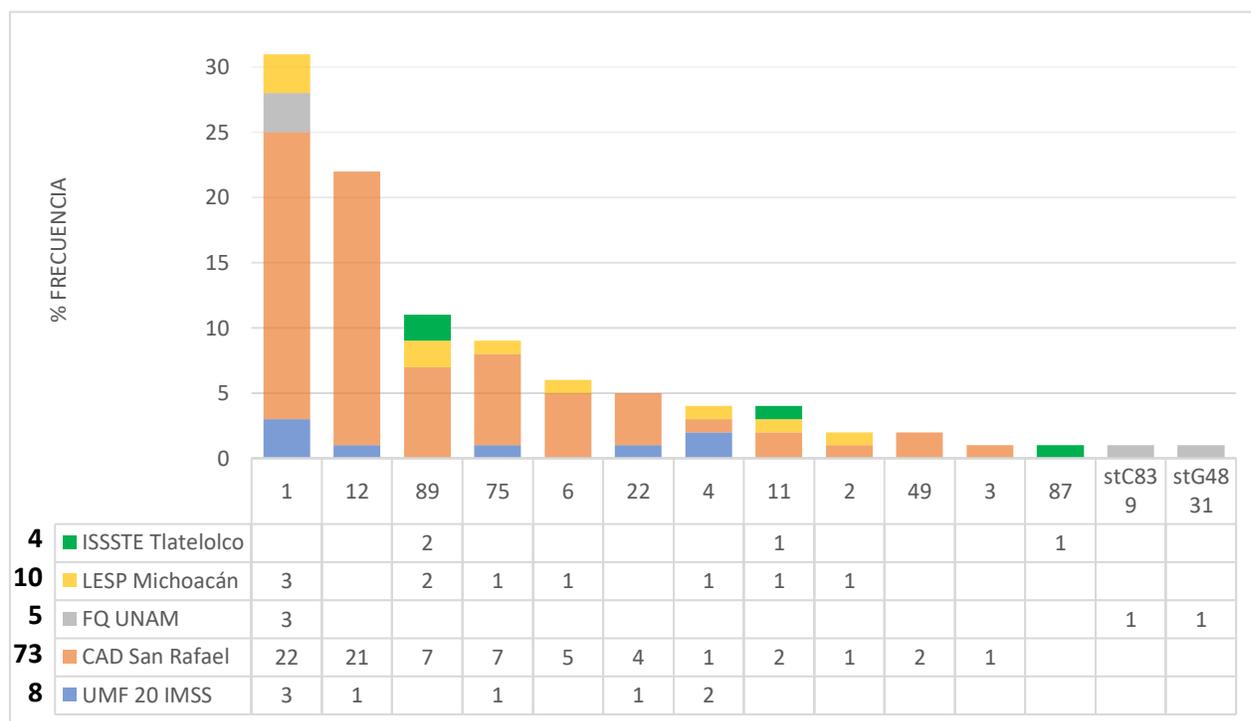


Figura 19. Frecuencia de los tipos M de acuerdo con la procedencia de las cepas aisladas de *S. pyogenes*

- Relación de los tipos M con *speA* y *speC*

En el análisis de los genes *speA* y *speC* (Figura 17), se encontró con un 32% la presencia del gen *speA*, el 90% de estas corresponden al tipo M1(29 cepas), el 10% restante se encuentra en las cepas tipo M11, M3 y stC839 cada uno con 3.3 % de

frecuencia. Se observó en un 56% la presencia del gen *speC* distribuido en las cepas tipo M2, M3, M4, M6, M11, M12, M22, M49, M75, M87, M89 y stG 4831. Se obtuvieron 12% de cepas no toxigénicas, es decir que no amplificaron los genes *speA/speC* entre estos están algunas cepas de los tipos M12, M89, M75, M6, M22 y M49. Las dos cepas que presentaron ambos genes (*speA/speC*) corresponden a los tipos M1 y stC839.

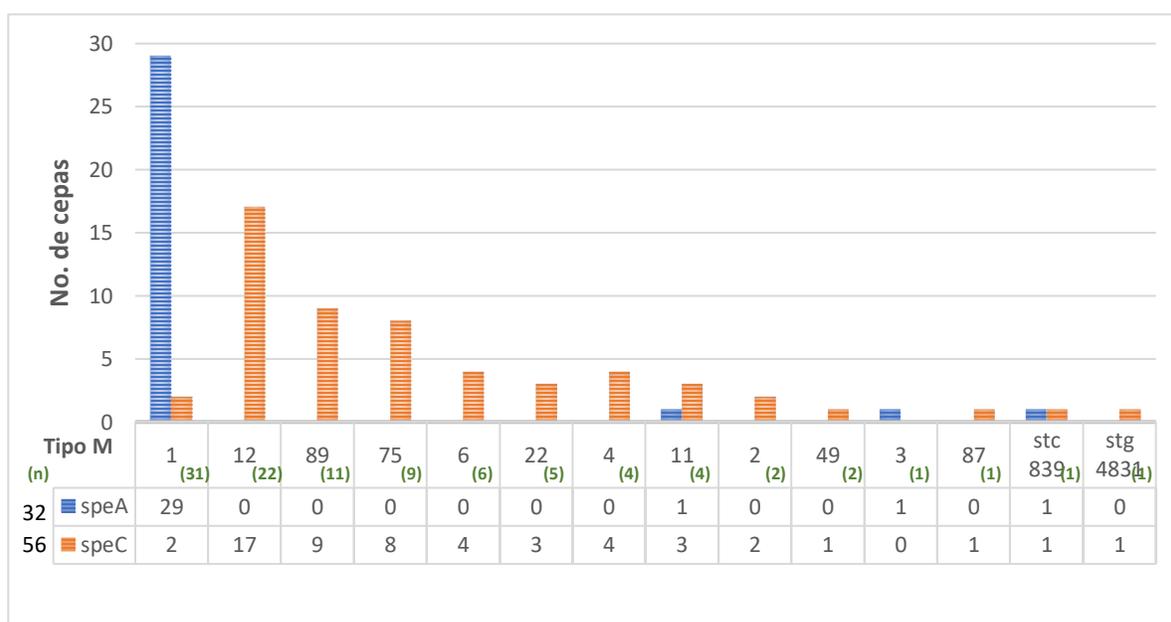


Figura 20. Distribución de los genes *speA/speC* de las cepas aisladas de *S. pyogenes*. (n)= número de cepas del tipo M correspondiente.

- Frecuencias de los tipos M y los genes *sic, sof, speA, speC*

En la tabla 8 se muestra el análisis de las frecuencias de los genes asociados a virulencia que se amplificaron y su respectivo tipo M.

Tabla 11. Frecuencias de los tipos M tipificados de las cepas aisladas de *S. pyogenes* y los factores de virulencia asociados.

TIPO M	% Frecuencia	% <i>sic</i> (n)	% <i>sof</i> (n)	% <i>speA</i> (n)	% <i>speC</i> (n)
1	31	100 (31)	0	94 (29)	6 (2)
12	22	0	100 (22)	0	77 (17)
89	11	0	91 (10)	0	82 (9)
75	9	0	100 (9)	0	89 (8)
6	6	0	0	0	67 (4)
22	5	0	100 (5)	0	60 (3)
4	4	0	100 (4)	0	100 (4)
11	4	0	100 (4)	25 (1)	75 (3)
2	2	0	100 (2)	0	100 (2)
49	2	0	100 (2)	0	50 (1)
3	1	0	0	100 (1)	0
87	1	0	100 (1)	0	100 (1)
stC 839	1	0	0	100 (1)	100 (1)
stG 4831	1	0	0	0	100 (1)

- Distribución de los tipos M del periodo de obtención (2011-2019)

Las cepas analizadas se obtuvieron entre el 2011 y el 2019. En este periodo de tiempo sólo en los años 2011, 2013 y 2017 se obtuvieron un mayor número de cepas para poder hacer un comparativo entre estos años (Figura 18). Se puede observar que el tipo M con mayor frecuencia en los tres años es el tipo M1, el segundo varía de acuerdo con el año, en el 2011 los tipos M89 y M4, en el 2013 los tipos M89 y M22 y en el año 2017 la frecuencia de los tipos M1 y M12 fue la misma, seguido del tipo M75 y M89.

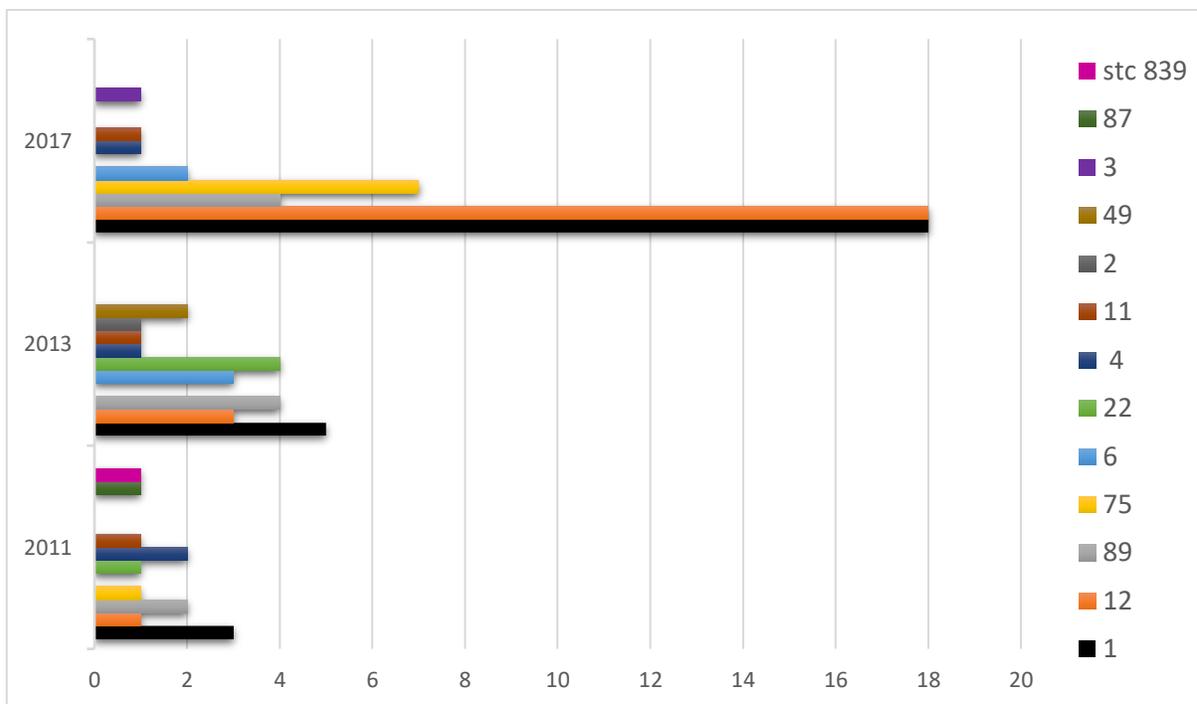


Figura 21. Distribución de los tipos M de acuerdo con el año en que se obtuvieron las cepas aisladas de *S. pyogenes*

En la tabla 9 se muestran los tipos M que se relacionan con las ocho cepas aisladas de casos clínicos diferentes a faringitis, donde podemos observar que el tipo M1 está asociado a tres casos: la fascitis necrosante, varicela y un caso de aborto están asociados al tipo M1 y las tres cepas amplificaron el gen *speA*, los otros casos presentaron únicamente *speC*, a excepción del caso del absceso de codo (tipo M6) que no presentó ninguna toxina.

Tabla 12. Tipos M de *S. pyogenes* asociados a diferentes casos clínicos.

Tipo M1	Tipo M75	Tipo M6	Tipo M4	Tipo M11	Tipo M2
Fascitis necrosante Varicela Aborto	Artritis séptica	Absceso de codo	Infección de herida	Infección de herida	Hemorragia subaracnoidea

VIII. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que los tipos M1 (31%), M12 (22%), M89 (11%) y M75 (9%) de *Streptococcus pyogenes* son los más frecuentes entre los 14 identificados de las cepas estudiadas. En estudios previos realizados en el laboratorio de Biología Molecular del departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina se ha observado también que los tipos M1 y M12 han sido los más frecuentes en la población de estudio,^{26, 31, 41, 42} sin embargo, la frecuencia entre ellos ha sido muy semejante ($\leq 5\%$). En este estudio se observó un aumento en la frecuencia de M1 a 31% lo cual no se había visto anteriormente. Esta observación resulta importante debido a que M1 se considera como el serotipo M más importante de *S. pyogenes* por su reconocida asociación con diferentes enfermedades invasivas como fascitis necrosante y SSTE y enfermedades no invasivas como fiebre escarlatina, faringitis.^{25, 35, 39} Se reconoce el estado de portador asintomático que puede fluctuar entre 15 al 30% de las personas y que representa la fuente potencial de brotes infecciosos o de autoinoculación en heridas de la piel. Los factores de riesgo pueden estar asociados con la hipertrofia adenofaríngea, o bien ser menor de edad o trabajador de la salud que pudieran contagiar a otras personas.⁴³ En el año 2017 la DGE reportó 229 998 casos de faringitis y faringoamigdalitis por *S. pyogenes* y en 2019 se presentaron 40 666 casos de faringitis en la población mexicana.⁴⁴ Estos datos son importantes ya que como se mencionó anteriormente la faringitis está asociada con los tipos M1, M3, M12, M28^{19, 49} adicionalmente los tipos M1 y M3 han sido asociados con la presencia de las toxinas A y C con actividad de superantígeno, codificadas por los genes *speA* y

speC, respectivamente. En anteriores estudios se observó que la frecuencia de genes de las toxinas A y C en *S. pyogenes* tipo M1, fue de 80% para el gen *speA* y 2.1% para el gen *speC*.⁴⁵ En este estudio la presencia de estos genes en las cepas M1 fue mayor, 94% para *speA* y 6% para *speC*, lo que representa un incremento del 15% de la presencia de *speA* en cepas M1. Esta observación es relevante por la estrecha relación de la toxina A con enfermedades como el SSTE, la fiebre escarlatina y la fascitis necrosante que pudieran llegar a ser mortales si no son tratadas oportunamente.³⁹ Nuestros datos de asociación del gen *speA* y los tipos M1 (90%) y M3 (3.3%), coinciden con lo reportado en la literatura⁴⁵ ya que se observó que la toxina A se asocia altamente al tipo M1 (más frecuente) por lo que su presencia aumenta el riesgo de manifestar alguna de las enfermedades antes mencionadas.

En el estudio se encontraron 56% de cepas que amplificaron el gen *speC*, que se presentó en al menos una cepa de los 14 tipos M identificados. También se obtuvieron cepas no toxigénicas (12%), es decir que no amplificaron los genes *speA/speC* entre las que destacan las cepas de los tipos M12, M89, M75, M6, M22 y M49. Este resultado indica que las cepas del mismo tipo M pueden producir diferentes toxinas como son la SpeD, SpeF (factor mitogénico) y el superantígeno de estreptococo (SSA) o las recientes toxinas SpeG, SpeH, SpeJ, SmeZ y SmeZ-2 de las cuales se conoce muy poco.³⁹ No se ha descrito la participación conjunta que podría tener estas nuevas toxinas como complemento a la patogenicidad de la *speA* y *speC*. Sin embargo, son asociaciones que serán de interés para investigar. Es de

suma importancia identificar y realizar el monitoreo de la distribución y frecuencia de los diferentes tipos M de *S. pyogenes* en la población.

Otros factores de virulencia que fueron evaluados son los genes *sic* y *sof* que cumplieron su función de ser utilizados para la estrategia de tipificación. Se ha demostrado que el inhibidor del complemento (Sic) está presente en todas las cepas tipo M1.³⁵ En este estudio corroboramos que todas las cepas que amplificaron el gen *sic* fueron M1. Esto implica que podemos realizar la identificación presuntiva del tipo M1 en un aislamiento de *S. pyogenes* si se identifica por PCR el gen *sic*.

El gen *sof* corresponde con los diferentes tipos M. Se identificaron tipos M *sof* positivos y *sof* negativos, lo que facilita la agrupación inicial de las cepas para la tipificación. En el 59% de las cepas analizadas se identificó este gen *sof*. Una proporción semejante ha sido reportada en estudios realizados en Colombia y México con el 55% de identificación del gen *sof* en las cepas estudiadas, lo que revela la frecuencia en la que se encuentran asociados los tipos M y el gen *sof*. La proteína Sof es un factor de virulencia que se debe tomar en cuenta.

Respecto al tipo M75 estudios previos identificaron una disminución gradual en su frecuencia de aislamiento durante el periodo analizado del 2001 al 2013.²⁶ Por el contrario, en el presente estudio, se identificó una cepa el año 2011 y 7 cepas en el año 2017 lo que nos hace inferir que la frecuencia del tipo M75 es variable. Esta observación es importante porque en nuestra población se ha reportado una asociación del tipo M75 con cepas que presentan resistencia a macrólidos, en particular a eritromicina.²⁶ Esta información fortalece la necesidad de mantener un

monitoreo constante sobre la frecuencia en que los tipos M se asocian con cuadros clínicos específicos o generan patrones de resistencia.

El análisis de la distribución del origen de las cepas estudiadas refleja que más de la mitad provinieron del CAD “San Rafael” del ISSSTE (73%) observándose para este lugar la mayor distribución de los tipos M. Debido a esto, no se realizó una comparación con las demás unidades de salud de donde se analizaron las demás cepas. Lo que sí podemos hacer notar es la presencia de al menos una cepa del tipo M1 en cada uno de los otros tres sitios donde se analizaron cepas de *S. pyogenes*, demostrando que el tipo M1 se encuentra con mayor frecuencia en la población estudiada. También se observa que en el LESP de Michoacán no se encontraron tipos M diferentes de los encontrados en la Ciudad de México. Sin embargo, un dato que nos llama la atención es que las dos cepas pertenecientes a los tipos stC839 y stG4831 (tipos M de muy baja frecuencia) fueron identificados en aislamientos de alumnos la Facultad de Química, respecto al tipo stC839. Este tipo M ya se habían identificado previamente en cepas analizadas en el laboratorio de Biología Molecular, sin embargo, la cepa de este estudio mostró la presencia de los genes *speA* y *speC* en contraste con lo encontrado previamente para este tipo M.⁴⁰ El tipo stG4831 no se había tipificado anteriormente, lo cual da una idea de la variedad de proteína M que pueda encontrarse en una población de estudio.

A partir del año 2008 se ha observado un incremento continuo en la frecuencia del tipo M89 en varias regiones, reportándose incluso con mayor frecuencia que el tipo M1 y sobre todo asociado con casos invasivos. En este estudio M89 representó el

tercer lugar de frecuencia con 11%, dos veces menor que el tipo M1 por lo que en nuestra población no ha llegado a sobrepasar la frecuencia de M1. Sin embargo, puede resultar interesante realizar un análisis genético de las cepas M89 identificadas para saber si en nuestra población está circulando la clona emergente descrita por Turner en el 2015, que presenta características únicas por ser acapsulada y mostrar sobreexpresión de la Estreptolisina O y la enzima NADasa.⁴⁶

Los tipos M identificados mediante el análisis de la secuencia del gen *emm* se agruparon junto con los tipificados por cortes de restricción. Entre las cepas secuenciadas se identificaron dos tipos M frecuentes, M12 y M75. Este dato nos muestra la limitación que puede alcanzar la tipificación realizada por cortes de restricción ya que se pueden encontrar variaciones en el patrón de corte para el mismo tipo M. Lo anterior constituye un reto para el laboratorio de tipificación que tiene que considerar a las variaciones que se pueden encontrar en los diferentes tipos M de *S. pyogenes*.

En México, como en la mayoría de los países latinoamericanos, se conoce poco acerca de las cepas de *S. pyogenes* que circulan y que causan una infección. Es necesario conocer cuáles son los tipos M y su asociación a factores de virulencia claves como las toxinas *SpeA* y *SpeC*. El conocer con mayor detalle la epidemiología de *S. pyogenes* en las diferentes zonas geográficas del país, así como su variación en las diferentes estaciones climáticas, será de gran utilidad para realizar una vigilancia epidemiológica y establecer políticas públicas de control y prevención de infecciones relacionadas con esta bacteria.

IX. CONCLUSIONES

- Los tipos M1, M12, M89 y M75 representan los tipos M más frecuentes dentro de los 14 tipos M identificados.
- El tipo M1 se identificó en el 31% de las cepas, porcentaje superior a lo reportado en estudios previos realizados en México.
- El gene *speA* se relacionó en el 94% de los M1, resaltando la importancia de este tipo M1 en infecciones donde la toxina A es un factor de virulencia importante.
- El gen *speC* que codifica para la toxina C se encontró en el 56% de las cepas y se relacionó con tipos M específicos.
- La tipificación mediante el análisis de restricción del gen *emm* tiene limitaciones cuando encontramos cepas con patrones de restricción no reconocidos, en estos casos el análisis de la secuencia es de utilidad.
- La identificación de los factores de virulencia y su asociación con los tipos M de *S. pyogenes* que circulan en una población ayuda al entendimiento de la incidencia de infecciones severas asociadas con esta bacteria.

X. ANEXOS

1. **Material**

- Cepas evaluadas.

En el presente estudio se evaluaron 100 cepas de *Streptococcus pyogenes* aisladas de casos clínicos, provenientes la mayoría de ellos de pacientes con faringitis que acudieron a los diferentes Centros de Salud.

- Material de cultivo (Cajas Petri desechables)
- Material para biología molecular (micropipetas Pipetman Classic de 2, 10, 20, 100, 200 y 1000 μ L, puntas para micropipeta de 10, 200 y 1000 μ L Axygen, tubos Ependorf de 200, 500 y 1500 μ L)

5. **Reactivos**

- Microbiología
 - ✓ Base de Agar Sangre (AS) (BBL[®]).
 - ✓ Caldo Todd-Hewitt (TH) (Bacto[®]).
 - ✓ Kit Pastorex Strep (BIO-RAD[®]).
- Extracción de ADN
 - ✓ Buffer de Lisis (20mM Tris-Cl, pH8, 2mM EDTA sódico, 1.2% Triton[®] X-100)
 - ✓ Lisozima Egg White Grado Ultrapuro (Amresco[®]).
 - ✓ Kit de extracción DNeasy Tissue Kit (250) (QIAGEN[®]).
 - ✓ Etanol absoluto (Química Meyer[®]).
- PCR
 - ✓ Buffer A 10x (Vivantis[®]).
 - ✓ Buffer S 10x con MgCl₂ 17.5mM (Vivantis[®]).
 - ✓ dNTP's 1.25mM (Sigma[®]).

- ✓ Taq DNA polimerasa 500U(5U/μL) (Vivantis®).
- ✓ Oligonucleótidos para la amplificación de los genes: *emm* (Genosys®), genes *sic*, *sof*, *speA*, *speC* (Biosynthesis®). (Tabla 4).
- Electroforesis
 - ✓ GeneRuler 100pb (0.5μg/μL) DNA Ladder Plus (Thermo Scientific®).
 - ✓ Loading Dye Solution 6x (Thermo Scientific®).
 - ✓ Agarosa Ultrapure (Invitrogen®).
 - ✓ Bromuro de etidio 10mg/mL (Research Organics, Inc®).
 - ✓ Buffer TBE 0.5x (EDTA, Acido Borico, TrisHCL)
- Corte de restricción.
 - ✓ Enzima Ddel 500U (10U/μL) (Thermo Scientific®).
 - ✓ GeneRuler 50pb DNA Ladder (Thermo Scientific®).

Tabla 13. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes *sic*, *sof*, *speA*, *speC* de *S. pyogenes*

Gen	Oligonucleótido	Secuencia de nucleótidos	pb
<i>emm</i>	emmA	GGG AAT TCT ATT SGC TTA GAA AAT TAA	800-2000
	emmB	GCA AGT TCT TCA GCT TGT TT	
<i>sic</i>	Sic 1	TAA GGA GAG GTC ACA AAC TA	900
	Sic 2	TTA CGT TGC TGA TGG TGT AT	
<i>sof</i>	Sof 1	GTA TAA ACT TAG AAA GTT ATC TGT AGG	600
	Sof 2	GGC CAT AAC ATC GGC ACC TTC GTC AAT T	
<i>speA</i>	speA 1	ATG GAA AAC AAT AAA AAA GTA TTG	700
	speA2	TTA CTT GGT GTT AGG TAG CTT C	
<i>speC</i>	speC 1	ACC TAT CAT CAA AGT GAC TAT AAG AAA GAC	550
	speC 2	CCC TTC ATT TGG TGA GTC AAA TAA GTC TAT TTG A	

6. *Equipos*

- Balanza digital CS 200 (Ohaus®).
- Placa calentadora (Lab-Line®).
- Microcentrífuga 1-15K (Sigma®).
- Horno de Microondas (Panasonic®).
- Incubadora Inkubator 1000 (Heidolph Instruments®).
- Jarras de anaerobiosis (Oxoid®).
- Lámpara de luz UV Macro Vue Uvis-20 (Hofer®).
- Software Kodak 1D 3.5v
- Fuente de poder Powerpac 300 (BIO-RAD®).
- Termociclador (Corbett Research®).
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Inc®).

7. Método de extracción de ADN de acuerdo con el inserto del kit comercial DNeasy Tissue (QIAGEN®)

Se tomó una alícuota de 1mL de cultivo y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se centrifugó a 7500 rpm por 8 min, se eliminó el sobrenadante y al paquete de células se le agregaron 180 µL de buffer de lisis, (adicionando previamente 20 mg/mL de lisozima), se mezcló en un agitador y se dejó incubar a 37°C durante 30 min.

Posteriormente se agregaron 25µL de proteinasa K (600mAU/mL) y 200 µL de buffer AL agitando vigorosamente y se incubó a 70°C por 30 min. Después se adicionaron 200µL de etanol absoluto frío, se agitó y el producto se transfirió a una columna de extracción para centrifugar a 8000 rpm durante 1 min, descartando el sobrenadante. Se realizaron 2 lavados de la muestra. Para el primer lavado se adicionaron 500 µL del buffer de lavado AW1 y se centrifugó en las mismas condiciones. Se descartó el sobrenadante y para el segundo lavado se adicionaron 500 µL de AW2 y se centrifugó a 14 000rpm por 3 min, y se desechó el sobrenadante; para finalizar se adicionó 200 µL de buffer de elución AE, se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto para poder eluir el ADN y almacenarlo en tubos Eppendorf de 1.5 mL a -20°C. Se corrió en el gel de por electroforesis durante 30 min.

89	-	+	-	+
89	-	+	-	+
89	-	+	-	+
89	-	+	-	+
89	-	-	-	+
89	-	+	-	-
89	-	+	-	+
89	-	+	-	+
89	-	+	-	+
stc 839	-	-	+	+
stg 4831	-	-	-	+

Tabla 15. Información de la procedencia y el tipo de muestra de las cepas, agrupadas por año.

Total	Número	Año	Tipo M	Procedencia	Muestra
	1	2011	stC 839	FQ	faríngeo
	2	2011	1	UMF 20 IMSS	faríngeo
	3	2011	1	UMF 20 IMSS	faríngeo
	4	2011	1	UMF 20 IMSS	faríngeo
	5	2011	4	UMF 20 IMSS	faríngeo
	6	2011	4	UMF 20 IMSS	faríngeo
	7	2011	12	UMF 20 IMSS	faríngeo
	8	2011	22	UMF 20 IMSS	faríngeo
	9	2011	75	UMF 20 IMSS	faríngeo
	10	2011	11	ISSSTE Tlatelolco	faríngeo
	11	2011	89	ISSSTE Tlatelolco	faríngeo
	12	2011	87	ISSSTE Tlatelolco	faríngeo
13	13	2011	89	ISSSTE Tlatelolco	faríngeo
	1	2013	1	CAD San Rafael	Faríngeo
	2	2013	1	CAD San Rafael	Faríngeo
	3	2013	1	CAD San Rafael	Faríngeo
	4	2013	1	CAD San Rafael	Faríngeo
	5	2013	1	CAD San Rafael	Faríngeo
	6	2013	2	CAD San Rafael	Faríngeo
	7	2013	4	CAD San Rafael	Faríngeo
	8	2013	6	CAD San Rafael	Faríngeo
	9	2013	6	CAD San Rafael	Faríngeo
	10	2013	11	CAD San Rafael	Faríngeo
	11	2013	12	CAD San Rafael	Faríngeo
	12	2013	12	CAD San Rafael	Faríngeo
	13	2013	12	CAD San Rafael	Faríngeo

	14	2013	22	CAD San Rafael	Faríngeo
	15	2013	22	CAD San Rafael	faríngeo
	16	2013	22	CAD San Rafael	faríngeo
	17	2013	22	CAD San Rafael	faríngeo
	18	2013	49	CAD San Rafael	faríngeo
	19	2013	49	CAD San Rafael	faríngeo
	20	2013	89	CAD San Rafael	faríngeo
	21	2013	89	CAD San Rafael	faríngeo
	22	2013	6	CAD San Rafael	faríngeo
	23	2013	89	CAD San Rafael	faríngeo
	24	24	2013	89	CAD San Rafael
	1	2014	1	FQ	faríngeo
	2	2014	6	LESP Michoacán	absceso de codo
3	3	2014	11	LESP Michoacán	infección de herida
	1	2015	2	LESP Michoacán	hemorragia subaracnoidea
2	2	2015	89	LESP Michoacán	faríngeo
	1	2016	1	FQ	faríngeo
2	2	2016	1	LESP Michoacán	varicela
	1	2017	1	LESP Michoacán	fascitis necrosante
	2	2017	4	LESP Michoacán	infección de herida
	3	2017	89	LESP Michoacán	faríngeo
	4	2017	1	CAD San Rafael	faríngeo
	5	2017	1	CAD San Rafael	faríngeo
	6	2017	1	CAD San Rafael	faríngeo
	7	2017	1	CAD San Rafael	faríngeo
	8	2017	1	CAD San Rafael	faríngeo
	9	2017	1	CAD San Rafael	faríngeo
	10	2017	1	CAD San Rafael	faríngeo
	11	2017	1	CAD San Rafael	faríngeo
	12	2017	12	CAD San Rafael	faríngeo
	13	2017	12	CAD San Rafael	faríngeo
	14	2017	12	CAD San Rafael	faríngeo
	15	2017	12	CAD San Rafael	faríngeo
	16	2017	12	CAD San Rafael	faríngeo
	17	2017	12	CAD San Rafael	faríngeo
	18	2017	12	CAD San Rafael	faríngeo
	19	2017	12	CAD San Rafael	faríngeo
	20	2017	75	CAD San Rafael	faríngeo
	21	2017	75	CAD San Rafael	faríngeo
	22	2017	75	CAD San Rafael	faríngeo

	23	2017	75	CAD San Rafael	faríngeo
	24	2017	89	CAD San Rafael	faríngeo
	25	2017	1	CAD San Rafael	faríngeo
	26	2017	1	CAD San Rafael	faríngeo
	27	2017	1	CAD San Rafael	faríngeo
	28	2017	1	CAD San Rafael	faríngeo
	29	2017	1	CAD San Rafael	faríngeo
	30	2017	3	CAD San Rafael	faríngeo
	31	2017	6	CAD San Rafael	faríngeo
	32	2017	12	CAD San Rafael	faríngeo
	33	2017	12	CAD San Rafael	faríngeo
	34	2017	12	CAD San Rafael	faríngeo
	35	2017	12	CAD San Rafael	faríngeo
	36	2017	12	CAD San Rafael	faríngeo
	37	2017	75	CAD San Rafael	faríngeo
	38	2017	89	CAD San Rafael	faríngeo
	39	2017	1	CAD San Rafael	faríngeo
	40	2017	1	CAD San Rafael	faríngeo
	41	2017	1	CAD San Rafael	faríngeo
	42	2017	1	CAD San Rafael	faríngeo
	43	2017	6	CAD San Rafael	faríngeo
	44	2017	11	CAD San Rafael	faríngeo
	45	2017	12	CAD San Rafael	faríngeo
	46	2017	12	CAD San Rafael	faríngeo
	47	2017	12	CAD San Rafael	faríngeo
	48	2017	12	CAD San Rafael	Faríngeo
	49	2017	12	CAD San Rafael	Faríngeo
	50	2017	75	CAD San Rafael	Faríngeo
	51	2017	75	CAD San Rafael	Faríngeo
52	52	2017	89	CAD San Rafael	Faríngeo
	1	2018	1	LESP Michoacán	Vaginal
2	2	2018	75	LESP Michoacán	artritis séptica
	1	2019	stG 4831	FQ	Faríngeo
2	2	2019	1	FQ	Faríngeo

100

16. Fischetti V., Novick R., Ferretti J. Gram-Positive Pathogens. ASM Press 2000; 11-13.
17. Delgado A, García I, Microbiología Médica. Sexta edición. Editorial ELSEVIER. España 2009: Cap22.
18. Vahakuopus S, Vuento R, Silijander T. Distribution of *emm* types in invasive and non-invasive group A and G streptococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012; (31): 1251-1256.
19. Bisno AL, Brito MO, Collins CM. Molecular basis of group A streptococcal virulence. J Infect Dis. 2003; (3): 191-200.
20. Camicia G, de Larrañaga. Trampas Extracelulares de neutrófilos: un mecanismo de defensa con dos caras. Médica clínica. 2013; 140(2): 70-75.
21. Bisno AI, Gerber MA, Gwaltney JM Jr. Practice guidelines for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis. Clin Infect Dis. 2002; (32): 113-125.
22. Steer AC, Lamagni T, Curtis N, Carapetis JR. Group A streptococcal disease. Drugs. 2012; 79(9): 1213-1227.
23. Zepeda G, Gvirtzman C, Kreft J. *Streptococcus pneumoniae* e Inmunidad innata. Revista chilena de enfermedades respiratorias. 2013; 29(2).
24. Carapetis, Steer, Mulholland, Weber. The global burden of group A *Streptococcus* disease. Lancet Infect. Dis. 2005; 5(11): 685-694.
25. Garza Velasco R. Estreptococos. Manual de prácticas, Bacteriología. México D.F., Facultad de Química, UNAM; 2012: 23.40.
26. Santiago Cruz N. Análisis de la resistencia a Eritromicina en cepas de *Streptococcus pyogenes*. Tesis de licenciatura QFB. UNAM; 2015.
27. Suarez M, Sánchez L, Navarro M. Enfermedad invasiva por *Streptococcus pyogenes*: cambios en la incidencia y factores pronósticos. Anales de pediatría. 2019; 91(5): 286-295.
28. Luca-Harari, J. Darenberg, S. Neal, T. Siljander, L. Strakova, A. Tanna, *et al.* Clinical and microbiological characteristics of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe. J Clin Microbiol. 2009; (47): 1155-1165.
29. Espadas D, Flor Macián E.M, Borrás R. Poujois Gisbert S, Muñoz Monet JI. Infecciones por *Streptococcus pyogenes* en la edad pediátrica: desde faringoamigdalitis hasta infecciones invasivas. An Pediatr. 2018; (88): 75-81.
30. Perea Mejía LM, Rivas C, Inzunza Montiel AE, Garza R, Cravioto A. Erythromycin resistance associated to *mefA* gene and *emm75* allele in *Streptococcus pyogenes* from uncomplicated pharyngitis in Mexico. International congress series 1289. 2006: 99-102.
31. Rodríguez Clemente D. Tipificación Molecular de *Streptococcus pyogenes* de exudados faríngeos. Especialidad en Bioquímica Clínica. UNAM; 2014.
32. Mc Millan D.J.; *et al.* Updated model of group A *Streptococcus* M proteins based on a comprehensive worldwide study. Clin, Microbiol, Infect. 2013; 19(5): 222-229.

33. Chang, H.; *et al.* Molecular analysis of *Streptococcus pyogenes* strains isolated from Chinese children with pharyngitis. *Diagn Microbiol Infect. Dis.* 2011;69(2): 117-122.
34. Tartof SY, Reis JN, Andrade AN, Ramos RT, Reis Mg Riley LW. Factors associated with group A *Streptococcus emm* type diversification in a large urban setting in Brazil: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* 2010;10: 327.
35. Méndez Y, Barrera MC. Fisiopatología de la sepsis por gram positivos. *Cuarzo.* 2016; 21(1): 51-65.
36. Pence M. *et al.* Streptococcal Inhibitor of Complement promotes innate immune resistance phenotypes of invasive M1T1 group A *Streptococcus*. *Innate Immun.* 2010; 2(6): 587-595.
37. Jeng, A. *et al.* Molecular genetic analysis of a group A *Streptococcus* operon encoding serum opacity factor and a novel fibronectin-binding protein, SfbX J, *Bacteriol.* 2003; 185(4): 1208-1217.
38. Cardona NM, Loreto MA, Kroeger A. Tipificación de *Streptococcus* del grupo A (SGA) aislados de amigdalofaringitis en población infantil. *Medellín Infect.* 2002; 6(1): 16-20.
39. Traverso F, Sparo M, Rubio V, Sáez JA. Caracterización molecular de *Streptococcus pyogenes* causantes de enfermedad invasora y síndrome de shock toxico estreptocócico. *Argentina. Microbiología (2010)* 42: 41-45.
40. Proft B.T, Moffatt S.L, Berkahn C.J, Fraser J.D. Identification and Characterization of Novel Superantigen from *Streptococcus pyogenes*. *J. Exp. Med.* 1999; 189(1): 89-101.
41. Troche González E. Identificación de genes asociados a factores de virulencia en cepas de *Streptococcus pyogenes*. Tesis de Licenciatura QFB. UNAM, 2015.
42. Figueroa Martinez F. Tipificación molecular del gen que codifica para la proteína M (*emm*) en cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico. Tesis de Licenciatura QFB. UNAM; 2004.
43. Vasco G, Luna C. Detección de la colonización asintomática en orofaringe por *Streptococcus pyogenes* mediante dos métodos diagnósticos. *Fac. Med.* 2017; 6(4): 633-635.
44. Boletín epidemiológico sistema nacional de vigilancia epidemiológica sistema único de información. 2019; 9(37): 22.
45. Martínez Mendieta S. Identificación de los genes asociados a factores de virulencia en aislamientos faríngeos de *Streptococcus pyogenes* del tipo M1. Tesis de Licenciatura QFB. UNAM; 2018.
46. Turner CE. *et al.* Emergence of a new highly successful acapsular group A *Streptococcus* clade of genotype emm89 in the United Kingdom. *MBio.* 2015; 6(4):11.