

# Tipificación de *streptococcus* del grupo A (SGA) aislados de amigdalofaringitis en población infantil

Nora María Cardona Castro MD. \*  
María Amparo Lotero Cadavid Bact. \*  
Markus Behrend MD. \*\*  
Axel Kroeger MD. \*\*  
Hugo Trujillo MD. \*\*\*  
Jaime Robledo Restrepo MD. \*\*\*

## Resumen

**Introducción:** *Streptococcus* del Grupo A (SGA) posee en la pared celular diversidad de antígenos importantes como factores virulentos. La proteína M se considera el antígeno mayor de virulencia de SGA. Se han clasificado más de 90 serotipos de SGA basados en las diferencias antigénicas de la proteína M, varios asociados a fiebre reumática y a infecciones invasivas. Otros antígenos importantes en la clasificación epidemiológica de SGA son el Factor de Opacidad y la Proteína T. **Objetivo:** tipificar cepas de SGA aisladas de cultivos faríngeos de niños con amigdalitis. **Métodos:** 20 aislamientos faríngeos de SGA fueron tipificados para proteína M, proteína T y Factor de Opacidad. **Resultados:** dos cepas fueron tipificadas como proteína M1, 2 M2, 1 M3, 2 M4, 1 M6, 1 M9, 3 M12, 4 M22, 1 M79, 1

PT4854, 2 cepas no fueron tipificables para proteína M. Siete cepas proteína T12, 2 T1, 2 T2, 1 T3, 2 T4, 1 T6, 1 T9, 1 T8/25/IMP19, 1 cepa que no fue tipificable para M tampoco lo fue para T. De las cepas estudiadas 45% tuvieron Factor de Opacidad negativo. **Conclusiones.** La tipificación de SGA mostró que en Colombia se encuentran serotipos similares a los encontrados en otras regiones del mundo que se han asociado a fiebre reumática e infecciones invasivas severas. 10% de las cepas no fueron tipificables para M, una de ellas tampoco para T, la cual fue FO negativo. En Colombia existen nuevos serotipos de SGA que deben tipificarse y asociarse a los síndromes clínicos que producen. **Palabras clave:** SGA, Proteína M, Proteína T, Factor de opacidad.

*Infectio* 2002; 6(1): 16-20

\* Instituto Colombiano de Medicina Tropical. Medellín, Colombia.

\*\* Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, Inglaterra

\*\*\* Corporación para Investigaciones Biológicas CIB, Medellín, Colombia.

Correspondencia: Nora María Cardona Castro, Instituto Colombiano de Medicina Tropical AA 52162. E-mail: icmt@epm.net.co, Medellín, Colombia.



## Introducción

Durante la década de 1980 se incrementó el número de casos reportados de infecciones por SGA y complicaciones como fiebre reumática y glomerulonefritis en países en desarrollo (1). Se han encontrado diferencias en la incidencia de infección estreptocócica entre grupos étnicos y socio económicos, siendo los más pobres, los de más alta incidencia (1,2). En años recientes se ha presentado un resurgimiento mundial de infecciones agudas severas causadas por SGA asociadas con síndrome de choque. En el departamento de Antioquia se reportan aproximadamente en el año 800 casos de fiebre reumática (comunicación verbal DSSA), estos casos consultan por presentar signos y signos compatibles con la entidad dando como resultado un diagnóstico adecuado. Existen casos cuya clínica es bizarra, pasan desapercibidos y no reciben un manejo adecuado agravando las secuelas. Es preocupante el número de casos de fiebre reumática reportados anualmente en nuestro medio y el desconocimiento del número de infectados con SGA en riesgo de desarrollar y presentar complicaciones. La fiebre reumática es una complicación no supurativa de la infección amígdalo-faríngea causada por SGA afectando válvulas cardíacas, articulaciones y el sistema nervioso central. Representa un problema de salud pública que afecta principalmente a los niños de 6 a 15 años, aunque toda la población es susceptible a adquirir esta enfermedad. Por las características de contagio persona a persona, se ha asociado a hacinamiento en grupos escolares y bases militares entre otras (1,3,4).

*Streptococcus* es una bacteria compleja desde el punto de vista estructural, varias moléculas han sido relacionadas con virulencia. El hialuronato capsular, producido por algunas cepas, es aparentemente idéntico al encontrado en tejidos conectivos humanos, no es antigénico y le sirve como factor de virulencia retardando la fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares y macrófagos del hospedero. La pared celular contiene varias sustancias

antigénicas, la más estudiada de ellas, la proteína M se considera el principal antígeno de virulencia de SGA. Las cepas ricas en esta proteína son también resistentes a la fagocitosis por polimorfonucleares, se multiplican rápidamente en sangre humana fresca y son capaces de iniciar la enfermedad. Por el contrario, las cepas que carecen de proteína M son avirulentas (5,6). Se han clasificado más de 90 serotipos de SGA basados en las diferencias antigénicas de la proteína M. La inmunidad en humanos es debida a la presencia de anticuerpos dirigidos contra la porción antifagocítica de esta proteína, esta inmunidad es específica de cada tipo de proteína M y se ha demostrado activa por muchos años (6,7). Estos anticuerpos protegen contra infección subsecuente con microorganismos del mismo tipo M, pero la persona permanece susceptible a la infección por tipos heterólogos (8). Otro antígeno proteico relacionado con la molécula de la proteína M es el llamado factor de opacidad del suero (FO), este factor es una lipoproteína, la cual es detectada por su capacidad para opacificar el suero de caballo. La propiedad de producir FO es estrictamente específica de tipo y es antigénica. Esta sustancia es importante por su utilidad como marcador epidemiológico ya que ayuda a clasificar los *Streptococcus* cuando no son tipificables por proteína M. La respuesta inmune específica de tipo y no específica a la proteína M es generalmente más débil después de la infección faríngea con cepas FO positivas que con FO negativas (9). Las cepas de SGA no tipificables con proteína M, pueden tipificarse utilizando un sistema con aglutinación basado en reacciones antigénicas de la proteína T. La proteína T ha probado ser un marcador epidemiológico útil, pero no se conoce su papel en la virulencia del *Streptococcus* (5).

El concepto de que SGA puede variar en su potencial reumatológico y de invasividad ha sido apoyado por la observación geográfica y temporal en la incidencia de fiebre reumática aguda y de síndromes invasivos (10,11,12). Estudios de brotes de faringitis estreptocócica revelan que ciertas cepas están más frecuentemente asociadas con fiebre reumática (10,

12, 13). Estudios de síndrome de choque en Trinidad han revelado que cepas que causan esta complicación pertenecen a serotipos diferentes a las que causan glomerulonefritis postestreptocócica en la misma población (11). Se ha sugerido que las cepas con factor de opacidad negativo, las cuales producen altos títulos de anticuerpos que reaccionan cruzadamente con la proteína M en humanos y en modelos animales experimentales, tienen mayor potencial para desarrollar fiebre reumática (11). En Colombia como en la mayoría de países Latinoamericanos, poco se conoce acerca de la infección por SGA y de su importancia en Salud Pública. Es relevante averiguar cuáles son los tipos de SGA que circulan en las diferentes zonas geográficas del país y su variación en las diferentes estaciones climáticas para poder prevenir y controlar las secuelas que este tipo de infecciones producen.

## Materiales y Métodos

Se obtuvieron 20 aislamientos de SGA de 20 niños de 3 a 12 años con amigdalitis. Los hisopados faríngeos fueron cultivados en agar sangre de carnero al 5% en el Laboratorio de Bacteriología de la Corporación para Investigaciones Biológicas CIB (Medellín, Colombia), y las cepas fueron tipificadas para proteína M, proteína T y Factor de Opacidad en el Laboratorio de Referencia Central Public Health Laboratory (Londres – Inglaterra).

### Tipificación de la proteína M

Las colonias de SGA se inocularon en 20 ml de caldo Neopeptone Hewrtt, se incubó a 37°C durante la noche, luego fue centrifugado a 3000 rpm. / 5 minutos, 2 ml del sobrenadante fueron reservados y el resto descartado. El depósito celular fue usado para realizar la extracción en ácido de la proteína M, se le agregó 0.4 ml de HCl 0.4N, se hirvió durante 10 minutos en un baño maría a 100°C. Cuando se enfrió la mezcla, se le adicionó 1 gota de rojo fenol y se procedió a neutralizar la solución con NaOH 0.2N a pH 7, la solución se coloreó roja. Luego se centrifugó a 3000 rpm. / 5 minutos y el

sobrenadante fue utilizado para realizar pruebas de difusión - precipitación en gel con antisueros obtenidos en conejo a los diferentes tipos de proteína M (90 sueros antiproteína M disponibles) (12).

### Tipificación de la proteína T

Se realizó siguiendo los protocolos del Respiratory and Systemic Infection Laboratory Public Health Laboratory Service (London, UK). Varias colonias de SGA se inocularon en 2 tubos con 5 ml de caldo Neopeptone Hewirtt, se les adicionó 0.3 ml de tripsina al 10% y se incubó a 30°C toda la noche. Los tubos se centrifugaron a 3000 rpm. / 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se realizaron pruebas de aglutinación en placa utilizando el depósito celular y antisueros obtenidos en conejos para los tipos de proteína T que han sido identificados.

### Factor de opacidad

Fue realizado siguiendo los protocolos del Respiratory and Systemic Infection Laboratory Public Health Laboratory Service (London, UK), utilizando el sobrenadante reservado de la tipificación de la proteína M. Se mezclaron 1 ml de agarosa 2% p/v mas 1 ml de suero de caballo y se procedió a cubrir una placa de vidrio. Cuando el agar-suero de caballo se enfrió, 1 ml del sobrenadante fue puesto en contacto con la superficie del agar. La propiedad de precipitar proteínas del suero de caballo, se visualizó con la formación de una mancha opaca en la superficie del agar. La formación de esta mancha, se consideró como factor de opacidad positivo.

## Resultados

Dos cepas de SGA fueron proteína M1, 2 M2, 1 M3, 2 M4, 1 M6, 1 M9, 3 M12, 4 M22, 1 M79, 1 PT4854, 2 cepas no fueron tipificables para proteína M, es decir este tipo de proteína M no había sido detectada anteriormente, por lo tanto no existían antisueros disponibles. Siete cepas se clasificaron como proteína T12, 2 T1, 2 T2, 1



T3, 2 T4, 1 T6, 1 T9, 1 T8/25/IMP19, 1 cepa que no fue tipificable para M tampoco lo fue para T. De las cepas estudiadas 45% tuvieron Factor de Opacidad negativo. La tabla 1 muestra los resultados obtenidos al tipificar las cepas para Proteína T, Proteína M y Factor de Opacidad.

## Discusión

La tipificación de 20 cepas de SGA, mostró que en Colombia existen serotipos similares a los encontrados en Europa que tienen tropismo cardíaco y que se han asociado a infecciones invasivas (1,2,3,4,9,11,13,14). Dos de 20 cepas (10%) no fueron tipificables para proteína M con los antiseros disponibles en el momento para realizar dicha clasificación; es decir, estas cepas tienen una proteína M desconocida. De estas dos cepas proteína M desconocida, una cepa tampoco fue tipificable para proteína T, sugiriendo que en Colombia existen serotipos diferentes que deben ser tipificados y estudiados.

Los tipos de proteína M 1, 3, 4, 12 que fueron encontrados en este estudio, son similares a los encontrados en Inglaterra, Escandinavia y Estados Unidos y han sido asociados por producir infecciones invasivas y fatales (4,9,13). Los tipos de proteína M 1 y 3 también se han observado en grupos de pacientes con fiebre reumática, estas cepas tienen aspecto mucoide en el cultivo, característica relacionada con la producción de ácido hialurónico (8). Esta característica fenotípica también ha sido reportada en cepas que tienen los mismos tipos de proteína M y que se han aislado de pacientes con choque tóxico por SGA o con infección invasiva severa (9, 14). El 45% de las cepas estudiadas fueron Factor de Opacidad negativo, estas cepas como se mencionó antes, producen una respuesta inmune a la proteína M más fuerte que las cepas FO positivas. Se podría concluir que estos pacientes con aislamientos de SGA FO negativos, poseen una buena respuesta inmune que probablemente los protegerá por años de la infección por este tipo de cepa proteína M específico.

La clasificación antigénica de las cepas aisladas de estos 20 pacientes, permite establecer

si fueron infectados con cepas con tropismo cardíaco o productoras de infecciones invasivas severas. Conocer estos serotipos en nuestro medio, su circulación en diferentes áreas geográficas del país y su variación en diferentes estaciones climáticas, proporcionaría herramientas epidemiológicas válidas para establecer políticas de control y prevención de la fiebre reumática y de las infecciones severas producidas por SGA a través de medidas de salud pública y futuro desarrollo de vacunas (15).<sup>b</sup>

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Salud de Colombia, Instituto Colombiano de Medicina Tropical, School of Tropical Medicine - University of Liverpool y Corporación para Investigaciones Biológicas.

## Abstract

TABLA 1

Tipificación de Proteína M, Proteína T y Factor de Opacidad de las 20 cepas de SGA aisladas de 20 niños con amigdalitis

PROTEINA M	PROTEINA T	FACTOR DE OPACIDAD
M1	T1	NEGATIVO
M1	T1	NEGATIVO
M2	T2	POSITIVO
M2	T2	POSITIVO
M3	T3	NEGATIVO
M4	T4	POSITIVO
M4	T4	POSITIVO
M6	T6	NEGATIVO
M9	T9	POSITIVO
M12	T12	NEGATIVO
M12	T12	NEGATIVO
M12	T12	NEGATIVO
M22	T12	POSITIVO
M79	T8/25/IMP19	POSITIVO
PT4854	T3/13/B3264	NEGATIVO
NO TIPIFICABLE	T5	POSITIVO
NO TIPIFICABLE	NO TIPIFICABLE	NEGATIVO

**Introduction:** Group A *Streptococcus* (GAS) has in the wall cell several antigens considered virulence factors. Protein M is the main virulent antigen of GAS. More than 90 serotypes of M had been classified according the antigenic differences of M protein. Some of them had been associated with rheumatic fever and invasive infections. Protein T and Opacity Factor are also important antigens in the epidemiological classification of GAS. **Objective:** To type GAS strains isolated from cultures of children with throat infection. **Methods:** 20 GAS isolates were typed for M protein, T protein and Opacity Factor. **Results:** Two strains typing M1, 2 M2, 1 M3, 2 M4, 1 M6, 1 M9, 3 M12, 4 M22, 1 M79, 1 PT4854, 2 strains were not typed for M. Seven strains were protein T12, 2 T1, 2 T2, 1 T3, 2 T4, 1 T6, 1 T9, 1 T8/25/IMP19, 1 strain that was not typed for M was not typed for T. 45% of the strains were Opacity Factor negative. **Conclusions:** This study shows that in Colombia there are GAS protein M serotypes similar to the other world regions that had been associated with rheumatic fever and invasive disease. 10% of the strains were not typed for M protein; one of them was not typed for T protein. In Colombia exists new serotypes of M protein GAS that have to be typed and study what kind of disease are producing. **Key words:** GAS, M Protein, T protein, Opacity Factor.

## Referencias

1. **Markowitz M.** Streptococcal disease in developing countries. *Pediatr Infect Dis J* 1991; 10:S11-S14
2. **Davies HD, Schwartz B.** Invasive group A streptococcal infections in children. *Adv Pediatr Infect Dis* 1999; 14: 129-45.
3. **Kaplan E. L.** Clinical guidelines for Group A streptococcal throat infections. *Lancet* 1997; 350:899-890.
4. **Kaplan EL, Johnson DR, Cleary PP.** Group A streptococcal serotypes isolated from patients and sibling contacts during the resurgence of rheumatic fever in the United States in the mid-1980s. *J Infect Dis* 1989;159:101-103.
5. **Bisno AL.** *Streptococcus pyogenes*. In: *Principles and Practice of Infectious Diseases* 1985. Mandell, Douglas and Bennett; p.1124 - 1132.
6. **Berkower C, Ravins M, Moses AE, Hanski E.** Expression of different group A streptococcal M proteins in an isogenic background demonstrates diversity in adherence to and invasion of eukaryotic cells. *Mol Microbiol* 1999; 31: 1463-75.
7. **Bisno AL.** Nonsuppurative poststreptococcal sequelae: Rheumatic fever and glomerulonephritis. In: *Principles and Practice of Infectious Diseases* 1985. Mandell, Douglas, Beneth. P.1133-1142.
8. **Kaplan EL.** The group A streptococcal upper respiratory tract carrier state: an enigma. *J. Pediatr* 1980; 97: 3379.
9. **Ferrieri P.** Microbiological features of current virulent strains of Group A streptococci. *Pediatr Infect Dis J* 1991; 10: S20-S24.
10. **Bisno AL.** The concept of rheumatogenic and non rheumatogenic group A streptococci. In: *Streptococcal diseases and the immune response*. Read S, Zabriskie JB eds. New York Academic Press, 1980: 789.
11. **Swanston W.H., Woo J, Murphy A, Efstratiou A, Tanna A and HFM Reid.** Invasive group A streptococcal infections. Serotype Newly Associated with Toxic Shock-like syndrome in Trinidad. In: *Streptococci and the host*. Edit Horaud et al. Plenum press, NY. 1997, P.71-73.
12. **Fischetti V.A.** Streptococcal M Protein: A Molecular Design and Biological Behavior. *Clin Microbiol Reviews* 1989, 2: 285-314.
13. **Ashbaugh CD, Moser TJ, Shearer MH, White GL, Kennedy RC, Wessels MR.** Bacterial determinants of persistent throat colonization and the associated immune response in a primate model of human group A streptococcal pharyngeal infection. *Cell Microbiol* 2000; 2: 283-292.
14. **Roberts S, Kosanke S, Terrence Dunn S, Jankelow D, Duran CM, Cunningham MW.** Pathogenic mechanisms in rheumatic carditis: focus on valvular endothelium. *J Infect Dis* 2001; 3: 507-511.
15. **Brandt ER, Teh T, Relf WA, Hobb RI, Good MF.** Protective and nonprotective epitopes from amino termini of M proteins from australian aboriginal isolates and reference strains of group A Streptococci. *Inf Immunity* 2000; 68: 6587-6594.