

Desarrollo de antisueros para identificar serotipos M-1 y M-3 de *Streptococcus pyogenes*

asociados a enfermedades invasivas severas

Palabras clave: *Streptococcus pyogenes*, serotipos M-1 y M-3, desarrollo de antisuero, índice bactericida, precipitación en capilar, prueba de Ouchterlony.

Key words: *Streptococcus pyogenes*, M-1 and M-3 serotypes, antisera development, bactericidal index, capillary precipitin test, Ouchterlony test.

Recibido: 10/02/2006
Aceptado: 27/03/2006

EBHGA: Estreptococo beta hemolítico del grupo A
IB: Índice bactericida
IBLog2: Logaritmo base 2 del índice bactericida

María Guadalupe Márquez-Rosales,* Alberto Villaseñor-Sierra**

* QFB Laboratorio de Microbiología Molecular. Centro de Investigación Biomédica de Occidente. Instituto Mexicano del Seguro Social. Guadalajara, Jalisco.

** Pediatra Infectólogo, Doctor en Ciencias Médicas. Investigador Nacional Nivel I, Investigador Asociado "D", Laboratorio de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de Occidente. Instituto Mexicano del Seguro Social. Guadalajara, Jalisco.

Correspondencia:

D. en C. Alberto Villaseñor Sierra.

Laboratorio de Microbiología Molecular. Centro de Investigación Biomédica de Occidente. Instituto Mexicano del Seguro Social. Guadalajara, Jalisco. Sierra mojada 800, Col. Independencia, Guadalajara, Jalisco. Tel: (33) 3668-3000 ext 31953. Fax: (33) 3618-1756. E-mail: avillase@prodigy.net.mx

Resumen

Antecedentes: La producción de antisueros para la identificación de cepas de *S. pyogenes* serotipos M-1 y M-3 es importante para la adecuada tipificación de cepas aisladas de pacientes con enfermedades invasivas severas en México. **Métodos:** Se inmunizaron conejos de Nueva Zelanda con cepas serotipos M-1 y M-3 de *S. pyogenes*. Los antisueros obtenidos fueron adsorbidos con cepas heterólogas y retados con cepas de serotipos homólogos y heterólogos (B3264, M-Non-Tipificable, M-4, M-6 y M-12) mediante micro-precipitación en capilar, doble difusión de Ouchterlony o la prueba bactericida indirecta para evaluar la serotipo-especificidad y la actividad bactericida. **Resultados:** La evaluación con microprecipitación capilar demostró el desarrollo de anticuerpos serotipo específicos con títulos elevados. La acti-

Abstract

Introduction: Development of antisera to identify M-1 and M-3 *S. pyogenes* strain serotypes is important to identify those isolated from patients with severe invasive infections in Mexico. **Methods:** New Zealand rabbits were immunized with M-1 and M-3 *S. pyogenes* strains. The immune sera was adsorbed with heterologous serotypes and challenged against homologous and heterologous strains (B3264, M-non-typeable, M-4, M-6 and M-12) using capillary precipitation test, double diffusion Ouchterlony test or indirect bactericidal test to evaluate serotype specificity and bactericidal activity. **Results:** The micro precipitin capillary test showed high level titers of serotype specific antibodies. The bactericidal activity of antisera against homologous strains was elevated, but absent with heterologous strains. The double diffusion Ouchterlony test

vidad bactericida de los antisueros fue muy elevada contra cepas homólogas y ausente en heterólogas. La prueba de Ouchterlony demostró la presencia de doble banda de precipitado al retar el antisuero homólogo, reduciéndose a una banda única al usar antisuero adsorbido con una cepa heteróloga. No hubo reacciones cruzadas con cepas de serotipos heterólogos y la potencia fue elevada. **Conclusiones:** El modelo animal fue exitoso para la obtención de antisueros M-1 y M-3, serotipo-específicos, sin cruces antigénicos con cepas de otros serotipos y de potencia elevada, útiles para la identificación de cepas de *S. pyogenes* asociadas a infecciones invasivas severas en nuestro país.

Introducción

El *Streptococcus pyogenes* o Estreptococo β -hemolítico del Grupo A (E β HGA) es un coco Gram positivo que crece en cadenas y se asocia a infecciones moderadas a severas tales como faringitis, impétigo, fiebre escarlatina, neumonía, celulitis, síndrome de choque tóxico y fascitis necrotizante.¹

Uno de los factores de virulencia más importantes es la proteína M, que en ausencia de anticuerpos específicos contra la región N-terminal de la misma en el hospedero evita su fagocitosis y su posterior destrucción. La secuencia de aminoácidos de la región N-terminal de esta proteína determina además los serotipos, de los que hasta el momento se conocen más de 80 distintos, siendo los serotipos M-1 y M-3 los implicados con mayor frecuencia (74%) a enfermedades invasivas severas tales como el síndrome de choque tóxico y la fascitis necrotizante^{2,3} así como en algunos pacientes con amigdalitis, fiebre escarlatina y en portadores sanos.^{4,5} Los estreptococos asociados a síndrome de choque tóxico están relacionados con la habilidad de producir exotoxinas pirogénicas A y B que actúan como superantígenos.⁶

La identificación de cepas de *S. pyogenes* se realiza mediante técnicas que utilizan antisueros así como técnicas moleculares.⁷ La serotipificación M se realiza mediante la extracción ácida de su proteína M (extractos de Lancefield) y su pre-

first showed a double band of precipitation with the homologous antiserum, which was then reduced to a single band when antiserum was adsorbed against a heterologous serotype. There was no cross-reactive activity of antiserum against heterologous strains and the potency was high. **Conclusions:** The animal model was successful for obtaining serotype specific antiserum against M-1 and M-3 serotypes, without cross-reactions against other serotypes, and was also highly potent. It will be useful for identifying *S. pyogenes* serotypes associated with severe infections in our country.

cipitación al ser reconocida por antisueros específicos utilizando microtécnicas en capilar o técnicas de inmunodifusión en gel de agarosa (Ouchterlony).⁸

En México a partir de 1983, el número de casos de síndrome de choque tóxico y fascitis necrotizante se han reportado con la misma frecuencia que en otras partes del mundo.⁹ Sin embargo, se desconoce si los serotipos M-1 y M-3 están implicados en estas infecciones severas y son tan prevalentes como lo reportado por otros autores fuera del país. La serotipificación no se realiza en México debido a que no se cuenta con un banco de antisueros por sus altos costos y por el desconocimiento de su utilidad para tipificar las cepas aisladas en nuestro país. El presente proyecto fue realizado con la finalidad de desarrollar antisueros específicos para serotipos M-1 y M-3 de E β HGA en un modelo animal (conejo) y utilizarlos en estudios posteriores para identificar si estos serotipos están asociados a infecciones graves por *S. pyogenes* en nuestro país.

Material y métodos

Lugar y periodo de estudio. El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Centro de Investigación Biomédica de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social y en el Zooterio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Guadalajara, durante el

periodo de febrero a noviembre de 2003. El proyecto fue aprobado por el Comité Local de Investigación de la Universidad Autónoma de Guadalajara con el número 706-02-054. Los experimentos se manejaron con estricto apego a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio descritas en la Norma Oficial Mexicana (NOM-SSA062-ZOO-1999).¹⁰

Cepas de *S. pyogenes*. Las cepas utilizadas para la inmunización y producción de antisueros fueron aislamientos clínicos de pacientes mexicanos y caracterizadas como M-1 y M-3 por E. Kaplan M.D. y D.R. Johnson Ph.D. del Laboratorio de Referencia para Estreptococos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de la Universidad de Minnesota en Estados Unidos de Norteamérica (EUA). La cepa del serotipo M-1 se aisló de un hemocultivo de una recién nacida, cuya madre padecía fascitis necrotizante; la cepa de serotipo M-3 se aisló de un paciente con amigdalitis aguda. Algunas cepas utilizadas como controles (para evaluar posibles reacciones cruzadas de los antisueros) de los serotipos M-B3264, M-No tipificable, M-4, M-6 y M-12 fueron aisladas de pacientes mexicanos con amigdalitis aguda.

Sueros control. Como control negativo se utilizó un suero normal de conejo que carece de anticuerpos contra cepas de *S. pyogenes*. Como control positivo se utilizó un suero humano con una actividad bactericida comparable al suero control positivo de conejo utilizado por el Centro de Referencia para Estreptococos de la OMS de la Universidad de Minnesota en EUA.

Preparación de la vacuna. El protocolo para la preparación del inóculo bacteriano y el esquema de inmunización de los conejos fue tomado de E. Kaplan y cols.¹¹ Brevemente, una colonia aislada de cada una de las cepas M-1 y M-3 fue colocada en tubos separados que contenían caldo Todd-Hewitt con neopeptona (Difco, Sparks, EUA) e incubados a 37°C y en un ambiente de 5% de CO₂ hasta llegar a la fase estacionaria

(18 horas). El botón de bacterias fue lavado en dos ocasiones con solución salina estéril, centrifugado a 3,000 x g por 15 minutos a 4°C y disuelto en 5 mL de solución salina estéril. Se tomó una muestra para control de pureza y las bacterias fueron muertas por calor en baño maría a 56°C durante 1 a 2 horas.

Animales de experimentación e inoculación. Para la producción de los antisueros se utilizaron cuatro conejos de Nueva Zelanda, machos de 2.5 a 3.0 kg de peso. La aplicación del material para su inmunización se realizó vía intravenosa con una jeringa para insulina a través de una vena de la oreja, iniciando con una dosis de sensibilización de 0.5 mL, seguida de dos dosis semanales de 1.0 mL durante cinco semanas tanto de una cepa serotipo M-1 y otra del serotipo M-3 (dos conejos para cada una). Los animales fueron evaluados diariamente y se anotaron los datos de temperatura, peso y cualquier otra observación respecto a su comportamiento o estado de salud. Una vez concluidas las inmunizaciones se obtuvieron muestras de suero y se realizó primero una prueba de precipitación en capilar y luego una prueba bactericida indirecta para confirmar tanto el desarrollo como el título de anticuerpos opsonicos serotipo-especificos. Luego, de cada animal se obtuvo la totalidad de la sangre por punción cardiaca siendo sacrificado posterior al uso de un anestésico inhalado.

Adsorción de sueros. Con la finalidad de remover anticuerpos inespecificos y evaluar la serotipo-especificidad de los sueros obtenidos de cada animal, una muestra de éstos fue sometida a adsorción con una cepa homóloga y otra con una cepa heteróloga acorde con lo descrito por Lancefield.¹² Una parte de suero fue mezclada con cuatro partes (w/w) de un botón de bacterias muertas y lavadas de una cepa heteróloga y otra parte con una homóloga. Luego se incubó durante 30 minutos a 37°C en baño maría y fue centrifugado a 3,000 x g durante 10 minutos para separar el suero adsorbido.

Prueba bactericida indirecta. La actividad bactericida de los antisueros de conejo fue evaluada con el procedimiento descrito por Todd¹³ y modificada por Lancefield¹⁴ utilizando sueros sin adsorber y adsorbidos. Se mezclan 120 μ L de suero con 120 μ L de suspensión bacteriana conteniendo ~200 a 400 UFC y se incuba a 4°C durante una hora con agitación horizontal suave (100 RPM); después se agregan 100 μ L de la mezcla (suero-bacterias) a 300 μ L de sangre fresca (obtenida ~ 10 minutos previos a su uso) heparinizada de un donador conocido que carece de anticuerpos contra cepas de los serotipos M-1 y M-3 y se incuba a 37°C durante tres horas con una rotación término-terminal a 8 RPM. Se realizan cultivos de 100 μ L de la suspensión bacteriana en tiempo cero y después de la incubación de tres horas se realizan cultivos de 100 μ L de la mezcla sin diluir y de dos diluciones 1:100 para el conteo inicial y final de las UFC, con lo cual se calculan el índice bactericida (IB) y su logaritmo base 2 (IBLog2). La interpretación del índice bactericida fue de acuerdo a la escala descrita por Stollerman con un rango de 0 a + + + + en donde 0 corresponde a sueros con un IB < 25 y + + + + a sueros con un IB > 500.¹⁵

Precipitación en capilar. Esta prueba tiene el objetivo de visualizar la formación de complejos solubles antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) entre un suero con anticuerpos opsonicos serotipo-especificos y el extracto ácido de la proteína M.¹⁶ En un pedazo de parafilm se colocan en forma separada 10 μ L de extracto ácido y 10 μ L del suero a probar. Con un capilar no heparinizado, se toma primero el extracto ácido seguido del suero problema teniendo cuidado de no dejar formar burbujas entre ambos. Luego se pone un tapón de plastilina, se colocan a 90 grados y se dejan en incubación a 37°C por dos horas realizando entonces la primera lectura de precipitación. La segunda y última lectura se realiza a las 18 horas después de haber dejado los capilares a 4°C. La interpretación del grado de precipitación fue acor-

de a lo descrito por Lancefield^{16,17} con rango desde un precipitado apenas visible (\pm) hasta la formación de columnas llenas de precipitado (+ + + a + + + +).

Prueba de doble difusión de Ouchterlony. Con ella se detectan complejos antígeno-anticuerpo al colocar en diferentes pozos de una placa de agarosa al 1%, el antisuero y el extracto de proteína M tanto homólogo como heterólogo. La difusión del antígeno como del anticuerpo en la agarosa forman precipitados visibles al colocar la laminilla por encima de un fondo oscuro.¹⁶ La agarosa se coloca en un porta-objetos y al solidificarse se realizan siete perforaciones (una central y seis periféricas) en donde se colocan el extracto ácido de proteína M (pozo central) y los diversos antisueros M (en las periféricas). Luego se colocan en una cámara húmeda sellada y se incuban a 37°C durante dos horas realizando una lectura preliminar. Después se incuba nuevamente a 4°C durante 18 horas y se realiza la lectura definitiva.

Evaluación de una posible precipitación cruzada de los antisueros M-1 y M-3 con extracto ácido de cepas heterólogas. Con la finalidad de evaluar posibles reacciones cruzadas, se realizó la prueba de precipitación en capilar y prueba de doble difusión de Ouchterlony utilizando antisueros M-1 y M-3 adsorbidos con una cepa heteróloga y se retaron con extractos ácidos de proteína M de las cepas de los serotipos M-B3264, M-no tipificable, M-4, M-6, M-12.

Resultados

Evaluación de la presencia de anticuerpos serotipo-especificos. La evaluación preliminar, a la quinta semana de inmunización y la final a la sexta semana (*figura 1*), de la presencia de anticuerpos serotipo-especificos en una muestra de suero (no adsorbido) de los conejos inmunizados con cepas M-1 y M-3, se realizó con la prueba de precipitación en capilar, retándolos con extractos

Cuadro I. Actividad bactericida de los sueros anti M-1 y anti M-3 con y sin adsorción vs cepas homólogas y heterólogas.

Suero anti M - 1	vs Cepa	Índice bactericida	Escala de Stollerman	Suero anti M - 3	vs Cepa	Índice bactericida	Escala de Stollerman
Sin adsorber	M-1	1,657	++++	Sin adsorber	M-3	1,643	++++
Sin adsorber	M-3	5.34	0	Sin adsorber	M-1	3.06	0
Adsorbido con cepa homóloga	M-1	4.43	0	Adsorbido con cepa homóloga	M-3	1.20	0
Adsorbido con cepa heteróloga	M-1	2,230	++++	Adsorbido con cepa heteróloga	M-3	1,511	++++

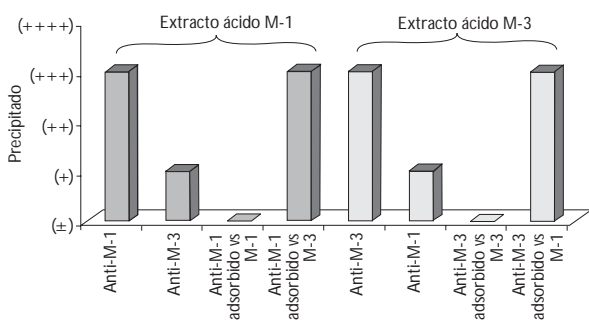


Figura 1. Serotipo-especificidad de los sueros anti-M1 y anti-M3 evaluada mediante la prueba de precipitación capilar. En el eje de las abscisas se muestra la cuantificación de la precipitación en el capilar en un rango desde nula (±) hasta el capilar lleno de precipitado (++++). En el eje de las ordenadas, la mitad izquierda representa en gráfico de barras la precipitación intensa al retar un extracto ácido de proteína M-1 con el antisuero M-1 no adsorbido, con el antisuero M-3, la desaparición de la precipitación al adsorber el suero con una cepa homóloga M-1 y la también precipitación intensa con antisuero adsorbido con una cepa heteróloga. Del lado derecho se muestra el mismo experimento utilizando extracto ácido de proteína M-3 y el reto con antisueros homólogos con y sin adsorción, así como con un antisuero heterólogo.

ácidos de proteína M de cepas de los serotipos M-1 y M-3, mostrando un grado de precipitación importante (columna llena de precipitado) hacia el extracto homólogo (++++).

Desarrollo de anticuerpos bactericidas serotipo-específicos. Al término del periodo de inmunización (seis semanas), la evaluación de la actividad bactericida de los antisueros M-1 y M-3

no adsorbidos y adsorbidos con una cepa homóloga y una heteróloga (para demostrar que la actividad bactericida era dependiente de anticuerpos serotipo-específicos) mediante la prueba bactericida indirecta, mostró un desarrollo de altos niveles en contra de la cepa homóloga y mínima para las heterólogas (cuadro I). La serotipo-especificidad se evaluó además con la prueba de doble difusión de Ouchterlony utilizando extracto ácido de proteína M-1 y M-3 retándolos con antisueros homólogos con y sin adsorción (vs cepa homóloga y heteróloga) y antisueros heterólogos (figura 2).

Presencia de reacciones cruzadas de los antisueros M-1 y M-3 adsorbidos al retarlos con extractos ácidos de cepas de cinco serotipos heterólogos. La evaluación de los antisueros M-1 y M-3 previamente adsorbidos con cepas heterólogas (M-3 y M-1 respectivamente) al retarlos con extractos ácidos de cepas de *S. pyogenes* de cinco serotipos distintos no presentaron precipitación alguna en la prueba de microprecipitación capilar, ni presencia de bandas de precipitado en la prueba de doble difusión de Ouchterlony (cuadro II) demostrando su serotipo-especificidad.

Potencia de los antisueros desarrollados. Para evaluar la potencia de los antisueros se realizaron diluciones 1:2 (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) para cada uno de los antisueros (anti-M1 y anti-M2), encontrando la presencia de precipitación visible aún en la sexta dilución.

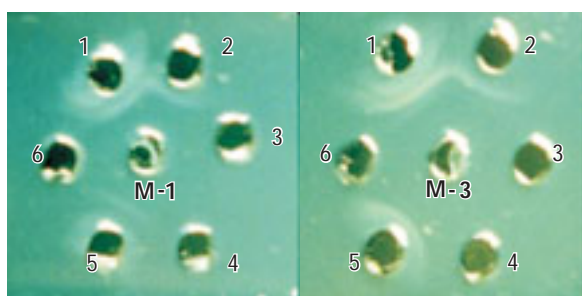


Figura 2. Formación de bandas de precipitado de sueros anti M-1 y anti M-3 (con y sin adsorción) al ser retados con extractos ácidos homólogos y heterólogos de cepas M-1 y M-3 mediante la prueba de doble difusión de Ouchterlony. **En el Ouchterlony izquierdo:** extracto ácido de proteína M-1 (en pozo central) contra: (1) anti M-1 no adsorbido; (2) anti M-1 adsorbido vs una M-3; (3) anti M-1 adsorbido vs una M-1; (4) control negativo (suero normal de conejo); (5) anti M-3 sin adsorber; (6) anti M-3 adsorbido vs una M-1. **En el Ouchterlony derecho:** extracto ácido de proteína M-3 (pozo central) contra: (1) anti M-3 sin adsorber; (2) anti M-3 adsorbido vs una M-1; (3) anti M-3 adsorbido vs una M-3; (4) control negativo (suero normal de conejo); (5) anti M-1 sin adsorber; (6) anti M-1 adsorbido vs una M-3.

Cuadro II. Evaluación de reacciones de precipitación cruzadas de antisueros M-1 y M-3 adsorbidos con extractos ácidos de 5 cepas de *S. pyogenes* heterólogas.

Extractos ácidos	Grado de precipitación mediante la prueba de precipitación en capilar		Formación de bandas en la prueba de Ouchterlony	
	Antisuero M-1 adsorbido	Antisuero M-3 adsorbido	Antisuero M-1 adsorbido	Antisuero M-3 adsorbido
M-1	++++	±	(+) única	(-)
M-3	±	++++	(-)	(+) única
M - B3264	±	±	(-)	(-)
M- NT	±	±	(-)	(-)
M-4	±	±	(-)	(-)
M-6	±	±	(-)	(-)
M-12	±	±	(-)	(-)

rotipo-especificidad y la nula capacidad de opsonizar de manera cruzada a una cepa heteróloga. De la misma manera, la actividad bactericida del suero anti M-3 fue elevada en contra de una cepa homóloga M-3, nula con la cepa heteróloga M-1, no disminuyó al ser adsorbida con la cepa heteróloga M-1 y cayó a niveles basales al ser adsorbida con la cepa homóloga M-3, demostrando de igual manera la serotipo-especificidad y la nula opsonización cruzada con una cepa heteróloga.

La prueba de doble difusión de Ouchterlony nos permitió demostrar que al retar los antisueros M-1 y M-3 no adsorbidos de conejo contra extractos ácidos de proteína M de cepas de serotipos homólogos, la presencia de varias bandas de precipitado representan anticuerpos tanto en contra de la proteína M como en contra de otras fracciones proteicas de la superficie del estreptococo tales como la proteína R descrita por Lancefield,¹⁴ las que desaparecen (dejando una banda única) posterior a la adsorción del suero (eliminando los anticuerpos contra fracciones proteicas distintas a la proteína M). Estos resultados demuestran la importancia de la adsorción de los antisueros para evitar precipitación inespecífica.

Discusión

La inoculación seriada de cepas muertas y lavadas de los serotipos M-1 y M-3 en conejos, resultó en desarrollo de antisueros con capacidad de formar complejos antígeno-anticuerpo y causar precipitación en los capilares no heparinizados al mezclarse con un extracto ácido de cepas de serotipo homólogo. Tanto para la cepa M-1 como para la M-3, la dilución seriada de los antisueros mostró precipitación aun después de cinco diluciones demostrando una potencia apropiada.

La actividad bactericida del suero anti M-1 fue elevada en contra de una cepa homóloga M-1 y mínima con una cepa heteróloga M-3 (posiblemente relacionada con anticuerpos dirigidos contra otras proteínas de superficie del estreptococo). Asimismo, la actividad bactericida no disminuyó al ser adsorbida con una cepa heteróloga M-3 y cayó a un nivel basal al ser adsorbida con una cepa homóloga M-1, demostrando la se-

Para finalizar, es importante mencionar que no hubo reacción cruzada al usar un antisuero adsorbido y retarlo con las cepas heterólogas de los serotipos B3264, NT, M-4, M-6 y M-12 por lo que los antisueros desarrollados son específicos para los serotipos diseñados.

Conclusiones

El modelo animal con inmunización intravenosa seriada de cepas de *S. pyogenes* de serotipos M-1 y M-3 muertas por calor en conejos de Nueva Zelanda, mostró ser apropiado para la obtención de un antisuero de potencia elevada que una vez adsorbido mostró ser altamente específico y sin evidencia de reacciones cruzadas con cepas de cinco serotipos heterólogos. Estos antisueros podrán ser utilizados para la identificación de los dos serotipos más frecuentemente asociados a infecciones invasivas severas en aislamientos de pacientes de nuestro país.

Referencias

1. Floyd WD Jr. *History of hemolytic streptococci and associated diseases*. In: Stevens DL, Kaplan EL, eds. New York, NY: Oxford University Press, 2000: 1-18.
2. Stevens DL. Group A beta-hemolytic streptococci: Virulence factors, pathogenesis, and spectrum of clinical infections. In: Stevens DL, Kaplan EL, eds. New York, NY: Oxford University Press, 2000: 19-36.

3. Hauser AR, Stevens DL, Kaplan EL, Schlievert PM. Molecular analysis of pyrogenic exotoxins from *Streptococcus pyogenes* isolates associated with toxic shock-like syndrome. *J Clin Micro* 1991; 29 (8):1562-1567.
4. Johnson DR, Stevens DL, Kaplan EL. Epidemiologic analysis of group A streptococcal serotypes associated with severe systemic infections, rheumatic fever, or uncomplicated pharyngitis. *J Infect Dis* 1992; 166: 374-382.
5. Kohler W, Gerlach D, Knoll H. Streptococcal outbreaks and erythrogenic toxin type A. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* 1987; 266: 104-115.
6. Mollick JA, Rich RR. Characterization of a superantigen from a pathogenic strain of *Streptococcus pyogenes*. *Clin Res* 1991; 39 (2): 213A.
7. Quiñonez-Alvarado MG, Villaseñor-Sierra A. Métodos convencionales y moleculares para la identificación y tipificación de *Streptococcus pyogenes*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 2004: 84-88.
8. *Characterization of group A streptococci*. In: Stevens DL, Kaplan EL eds. New York, NY: Oxford University Press, 1996: 33-36.
9. Villaseñor-Sierra A, Santos-Preciado JI. Síndrome de choque tóxico por estreptococo beta hemolítico del grupo A: criterios diagnósticos. *Gac Med Mex* 1999; 135: 205-207.
10. *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (PROY-NOM-SSA062-ZOO-1999)*. 1999.
11. *Production of antisera for serological grouping and serotyping*. In: Johnson DR, Kaplan EL, Sramek J et al eds. Minneapolis, MN, USA: World Health Organization, 1996: 96-104.
12. Lancefield RC. Type-specific antigens, M and T, of Matt and Glossy variants of group A hemolytic streptococci. *J Exp Med* 1940; 71: 521-537.
13. Todd EW. Method of measuring increase or decrease of population of haemolytic streptococci in blood. *Brit J Exper Path* 1927; 8: 1-5.
14. Lancefield RC. Differentiation of group A streptococci with a common R antigen into three serological types with a special reference to the bactericidal test. *J Exp Med* 1957; 106: 525-544.
15. Stollerman GH, Kantor FS, Gordon BD. Accessory plasma factors involved in the bactericidal test for type-specific antibody to group A streptococci. *J Exp Med* 1958; 108: 475-491.
16. Lancefield RC. The antigenic complex of *Streptococcus haemolyticus*. I. Demonstration of a type-specific substance in extracts of *Streptococcus haemolyticus*. *J Exp Med* 1928; 47: 91-103.
17. Lancefield RC. A micro precipitin-technic for classifying hemolytic streptococci, and improved methods for producing antisera. *Proc Soc Exp Biol Med* 1938; 38: 473-478.