



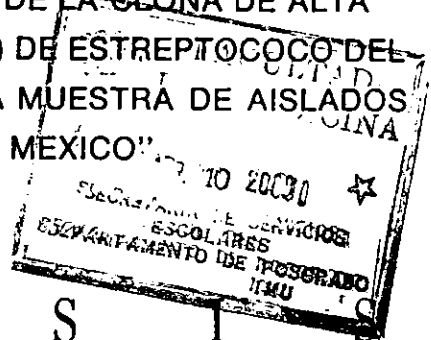
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

112190 ej.

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE PEDIATRIA
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

"PREVALENCIA DE LA CLONA DE ALTA VIRULENCIA (CAV) DE ESTREPTOCOCCO DEL GRUPO B EN UNA MUESTRA DE AISLADOS EN MEXICO"



T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALIZACION EN INFECTOLOGIA
P E D I A T R I C A
P R E S E N T A :
DRA. MARIA NORMA GONZALEZ CEJUDO

TUTOR: DR. GERARDO DEL CARMEN PALACIOS SAUCEDO.
COTUTOR: DR. FORTINO SOLORIZANO SANTOS.

Handwritten signature

277636

Handwritten signature

MEXICO, D. F.

1998.





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.

DEDICATORIAS.

A: Dios
por permitirme concluir
esta parte de mi vida.

A mis queridos padres:
Engel y Carmen
que siempre estan conmigo
brindandome su apoyo incondicional
Mi agradecimiento con respeto y cariño
!Gracias!

A mis hermanos:
Sigfrido y Cristy; Lourdes y Juan;
Oscar y Erika; Sergio, Alicia; Elia,
Héctor, Marcos, Engel.
por su comprensión y apoyo

A mis sobrinos:
Arturo, Alejandro, Luis A., Carolina,
símbolo de ternura y alegría
Gracias.

A mi familia extensa
Por su apoyo.

Un sincero reconocimiento
para la familia Arreola, especialmente
para la Señora Esperanza Arreola,
por su apoyo y disposición incondicional
durante mi formación profesional

A los niños:
Estimulo y base de mi formación
profesional.

A mis maestros:

Dr Fortino Solórzano Santos.
Dr. Gerardo Palacios Saucedo
Dr. Humberto Díaz Ponce
Dr. Guillermo Vázquez
Dra. Guadalupe Miranda
quienes me guiaron por el
camino del conocimiento
en forma desinteresada.
Por su experiencia, paciencia
y contribución en mi formación
profesional. Gracias.

Al personal del laboratorio de
Microbiología Clínica.
En Especial a Blanca Leños
Por su disposición y paciencia

Al personal de la Unidad de Investigación Médica
en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del
HPCMN SXXI, especialmente al Dr. Javier Torres,
Dr. Gerardo González y Dr. Felipe González
por el apoyo de siempre.

Al Dr. José Luis Arredondo,
Dr. F. Javier Ortiz,
Quim. Magdalena Beltrán
y a todo el personal del Depto de
Infectología e Inmunología del
Instituto Nac. de Perinatología
Por su apoyo incondicional.
Mi agradecimiento.

A Rosy y Roselia compañeras inolvidables.

A Amalia, Adriana y Azucena
por su ayuda en este trabajo.

INDICE.

	Página
RESUMEN	1 - 2
INTRODUCCION	3 - 7
OBJETIVO	8
MATERIAL Y METODOS	9 - 12
RESULTADOS	13 - 18
DISCUSION	19 - 25
CONCLUSIONES	26
BIBLIOGRAFIA	27 - 31
FIGURAS Y TABLAS.	32 - 40

PREVALENCIA DE LA CLONA DE ALTA VIRULENCIA (CAV) DE ESTREPTOCOCO DEL GRUPO B EN UNA MUESTRA DE AISLADOS EN MÉXICO.

RESUMEN.

Antecedentes. Estreptococo del grupo B (EGB) o *Streptococcus agalactiae* es la causa más frecuente de sepsis y meningitis neonatal en países desarrollados. En estudios previos en México se detectó colonización por EGB en 10.3% de las mujeres embarazadas e infección neonatal en 1 de 1500 recién nacidos vivos con una letalidad de 38.5%. Una clona de alta virulencia (CAV) del serotipo III de EGB parece explicar la mayoría de la morbimortalidad perinatal causada por EGB en países desarrollados. Debido a una aldolasa mutante, la CAV puede ser identificada por su incapacidad para crecer a 40°C. Un estudio previo en una muestra de 57 aislados demostró la existencia de esta CAV en México, con una prevalencia del 5.2%.

Objetivo. Evaluar la prevalencia de CAV de EGB en una muestra de cepas aisladas en México.

Diseño de estudio. Transversal-descriptivo.

Material y métodos. Se incluyeron 344 aislados de EGB obtenidos de portadores y de casos de enfermedad en el Instituto Nacional de Perinatología y el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI durante el periodo de 1988 a abril de 1998 y de 1993 a 1997 respectivamente.

Una colonia aislada fue precrecida a 37°C en un medio definido químicamente (FMC) hasta 0.400 de densidad óptica (DO) a A_{675} nm. Una alícuota de este crecimiento fue inoculada a dos tubos con 10 ml de FMC (DO inicial de 0.030 a 0.040), uno de estos tubos fue crecido a

37°C y el otro a 42°C midiendo la DO cada 30 minutos durante 4 horas. Algunos aislados de crecimiento lento (27) fueron ensayados adicionando caldo Todd-Hewitt al medio FMC. Se consideró con inhibición del crecimiento a 42°C a todo aislado cepa con una densidad óptica menor de dos veces a la obtenida a 37°C.

Las diferencias de crecimiento fueron comparadas por la prueba *t* de Student y la asociación de aislados CAV con enfermedad y con los serotipos por la prueba χ^2 .

Resultados. De los 344 aislados ensayados, 46 (13.37%) tuvieron el patrón de crecimiento de la CAV, cinco de las cuales presentaron una curva de crecimiento lento. La diferencia de las medias de crecimiento entre los aislados CAV y No CAV a 42°C fue estadísticamente significativa ($p=0.005$)

El origen clínico de los aislados fue: cervicovaginal 187 (54.4%), urocultivo 66 (19.2%), espermocultivo 19 (5.5%), hemocultivo 19 (5.5%), líquido cefalorraquídeo 12 (3.5%), exudado faríngeo 4 (1.2%), absceso 3 (0.9%), punta de catéter vascular 2 (0.6%), aspirado bronquial 1 (0.3%) y se desconoció el origen clínico en 31 (9%) de los aislados.

El 43.9% (151) de estos aislados fue del serotipo I, 13.7% (47) del serotipo II, 29.6% (102) del serotipo III, 3.8% (13) no tipificables y el 9.3% (32) el serotipo se desconoció.

De los 46 aislados CAV solo 10 correspondieron a casos de enfermedad causados por el serotipo III y cinco fueron del serotipo I; sin embargo, en los aislados No CAV, 88 fueron de casos de enfermedad, de los cuales el serotipo III se encontró en 27, el serotipo I en 48 y el serotipo II en 7 aislados.

Conclusiones. Se confirma la existencia de la CAV en México. La prevalencia de CAV de EGB en este estudio fue mayor que la reportada en el estudio previo. La CAV se observó en serotipos diferentes al serotipo III y no estuvo asociada a casos de enfermedad.

PREVALENCIA DE LA CLONA DE ALTA VIRULENCIA (CAV) DE ESTREPTOCOCO DEL GRUPO B EN UNA MUESTRA DE AISLADOS EN MEXICO.

INTRODUCCION.

Desde 1938 se reporta la participación del *Streptococcus agalactiae* ó Estreptococo del grupo B (EGB) en la infección humana. Al final de la década de los 1960s y principios de los 1970s se observó un incremento progresivo de infecciones graves por este microorganismo en recién nacidos, lactantes y en mujeres embarazadas, desde entonces es la causa más frecuente de enfermedad invasiva neonatal en Estados Unidos de Norteamérica y en otros países desarrollados ya que ocasiona significativa mortalidad y morbilidad neonatal. (1-3). En México y en otros países en vías de desarrollo ha sido considerado como una causa poco común en infecciones perinatales, tanto en el recién nacido como en las madres embarazadas o en el puerperio (4).

Estudios realizados en Estados Unidos de Norteamérica han detectado colonización por EGB en el 4.5 al 41% de las mujeres embarazadas, con una tasa de infección neonatal de 2 x 1000 recién nacidos y una letalidad del 5 al 20% promediando 5.8%. En este y otros países desarrollados, el serotipo III de EGB es la causa más común de enfermedad invasiva neonatal ya que se presenta hasta en dos terceras partes de los casos con enfermedad invasiva neonatal. Sin embargo este serotipo III también es aislado de manera frecuente en portadores asintomáticos, tanto en mujeres embarazadas como en recién nacidos (5,7).

La información sobre EGB en México es escasa. El primer estudio fue realizado por Anthony y cols. en mujeres México-Estadounidenses en el área de los Angeles California, en el que se reportó colonización en el 18.4% (8). Posteriormente Collado y colaboradores encontraron una colonización de 1.5% en mujeres mexicanas embarazadas (9). Estudios posteriores realizados en México en una institución de tercer nivel de atención (4,10,11), detectaron una colonización por EGB de 10.3% de mujeres embarazadas mexicanas e infección neonatal de 1/1500 recién nacidos vivos (0.6/1000), no obstante, la letalidad fue de 38.5%, superior a la reportada en los Estados Unidos de Norteamérica. Además, los serotipos más frecuentemente identificados fueron el Ia/c (33.3%) y el Ia (24.2%)%, con una baja prevalencia del serotipo III aun en casos de enfermedad invasiva (3%). Con los resultados de estos estudios la baja frecuencia de enfermedad invasiva por EGB se atribuyó a la baja prevalencia de colonización por el serotipo III, sin embargo esto no explicaba la elevada letalidad.

Aunque la serotipificación es el método tradicionalmente usado para clasificar aislados de EGB, el poder discriminatorio de este método es bajo (12), ya que algunos aislados de EGB del serotipo III (el más frecuentemente asociado con enfermedad invasiva) pueden ser obtenidos tanto en casos de enfermedad como de portadores asintomáticos; además, algunos aislados no pueden ser clasificados con este método.

Existen estudios en E.U. (1,6) que reportan una prevalencia de cepas no tipificables de menos del 1%, en cambio, en el único estudio donde se evaluó los serotipos participando en México la frecuencia de aislados no tipificables fue del 18.2% (10). No obstante, Palacios y

cols., encontraron que algunos aislados mexicanos no tipificables por el método estándar de Lancenfield pueden ser serotipificadas a través de un método de extracción enzimática no ácida. Ellos reportaron que la mayoría de estos aislados no tipificables correspondieron al serotipo III y se demostró que estas cepas producen poco antígeno específico de tipo (13). Con estos resultados los autores sugieren que la hipótesis que atribuía la baja incidencia de enfermedad invasiva en México debido a la baja prevalencia de cepas del serotipo III y a la alta prevalencia de cepas no tipificables es poco probable.

La encuesta seroepidemiológica realizada en la República Mexicana en 1996, incluyó 2,269 sueros de mujeres en edad reproductiva y reportó que el 90% de la población tiene anticuerpos contra el antígeno de grupo de EGB, lo que sugiere que la población mexicana esta altamente expuesta al EGB (14).

Por otro lado, aunque las cepas de EGB que colonizan el aparato genital materno pueden invadir el líquido amniótico antes o durante el trabajo de parto, no todas causan enfermedad invasiva en el recién nacido, así mismo no todos los niños colonizados desarrollan enfermedad, esto sugiere que la colonización vaginal no es el único factor de riesgo para enfermedad neonatal sino que existen otros factores que pueden determinar el resultado de colonización e infección en el desarrollo de enfermedad invasiva, tales como, el estado inmune del huésped, la variación de la virulencia entre las cepas de EGB y la ocurrencia de factores de riesgo perinatal (1, 15-19).

Varios métodos moleculares han sido usados en investigación epidemiológica para la

clasificación a nivel de subespecie de aislados de EGB y para analizar la correlación de genotipos particulares con enfermedad, no obstante no hay todavía un sistema que pueda adecuadamente subtipificar a EGB y predecir enfermedad (16, 20,21).

Musser y cols. a través de electroforesis de multilocus enzimático analizaron los genotipos cromosómicos de 128 cepas de EGB y encontraron que aislados sintetizando el polisacárido de tipo III pertenecen a dos diferentes líneas filogenéticas, que parecen tener diferente potencial patogénico. La división filogenética I considerada como un tipo clonal con un alto grado de virulencia, se asoció a la mayoría de morbimortalidad causada por EGB serotipo III (ya que 80% de ellas fueron aisladas de casos de enfermedad invasiva). Esta división I fue llamada "CLONA DE ALTA VIRULENCIA" (CAV) (8).

Resultados similares fueron obtenidos por Helmig y cols. en Dinamarca (15) y Quentin y cols. en Francia (16). Estos estudios confirman así la estructura clonal de EGB, la diferencia en la virulencia entre clonas, la dicotomía filogenética de aislados del serotipo III y la existencia de un número limitado de clonas causantes de enfermedad invasiva. Sin embargo Hauge y cols. (22) al analizar 91 aislados de EGB a través de análisis de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de DNA (RFLP), encontraron la dicotomía filogenética de las cepas que expresan el tipo III, la diferencia en el potencial patogénico entre los tipos clonales, pero no la asociación con enfermedad.

Esta clona de alta virulencia, posee varias características fenotípicas únicas que la hacen diferente de las cepas clasificadas como no ser de dicha clona, dentro de éstas tenemos la producción de niveles elevados de antígeno capsular ó específico de tipo III de alto peso

molecular, hialuronidasa, proteasa y ácido lipoteicoico (23-31). Otras características únicas de esta clona son la incapacidad para crecer en un medio de cultivo conteniendo 200 mM de fosfato (32) y a 40°C en un medio definido químicamente (FMC) (33-35). Esta inhibición del crecimiento se debe a una enzima fructuosa-1,6-bifosfato aldolasa mutante, sensible a altas temperaturas (fba) (36). Esta característica de inhibición ha sido utilizada para identificar aislados de EGB que pertenecen a esta clona con una elevada sensibilidad y especificidad (ambas del 100%). El grupo de Mattingly y cols. clonaron un fragmento de DNA de 3.5 Kb asociado al gen de aldolasa, desde la cepa 181 de EGB del serotipo III de baja virulencia, el cual ha sido usado como sonda altamente específica y sensible para identificar aislados que pertenecen a la clona de alta virulencia (37-38).

Palacios y cols. evaluaron una muestra de 57 cepas de EGB aisladas en México a través de experimentos de cambios en la temperatura de crecimiento y de RFLP utilizando la sonda antes comentada encontraron dos patrones de restricción de DNA, uno correspondió al de los aislados clasificadas dentro de la clona de alta virulencia por Musser y cols (18). De las 57 cepas, 19 fueron del serotipo III y tres de ellas fueron identificadas como CAV. Con estos hallazgos concluyeron que CAV existe en México aunque en baja prevalencia (38,39).

La aparente baja incidencia de casos de enfermedad invasiva en México podría ser explicada por una baja prevalencia de la clona de alta virulencia en dicho país; sin embargo, esto no explica la elevada letalidad detectada en los estudios realizados, además a pesar de estos datos en México se desconoce la prevalencia real de la clona de alta virulencia.

OBJETIVO GENERAL.

El objetivo de este estudio fue evaluar la prevalencia de la clona de alta virulencia de EGB en una muestra de aislados en México a través de experimentos de cambio en la temperatura de crecimiento en un medio definido químicamente (FMC).

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

-Identificar a la CAV de EGB a través de la característica de inhibición del crecimiento a 40°C en un medio definido químicamente (FMC).

-Evaluar la prevalencia de CAV de EGB en la muestra estudiada.

-Evaluar si la CAV de EGB identificada a través de la característica de inhibición de crecimiento a 40°C es exclusiva del serotipo III.

MATERIAL Y METODOS.

Diseño de estudio: transversal y descriptivo.

AISLAMIENTOS.

Los aislados de EGB estudiados en su mayoría fueron obtenidos del Banco de cepas del Instituto Nacional de Perinatología (INPer), (desde 1988 se busca intencionadamente EGB en toda mujer embarazada y recién nacido en este instituto) y otros aislados fueron obtenidos del laboratorio de Microbiología Clínica del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS (HPCMNSXXI); ambas instituciones de la Ciudad de México. Los experimentos fueron realizados en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

El origen clínico de los aislados fue obtenido de los registros de los laboratorios de Microbiología del INPer y del Hospital de Pediatría. Se consideró casos de enfermedad a los aislados obtenidos de hemocultivo, urocultivo, cultivo de líquido cefalorraquídeo (LCR), absceso, aspirado bronquial y punta de catéter vascular y, fueron considerados como aislados de portadores a los cultivos cervicovaginales, espermocultivos y de exudados faríngeos.

CEPAS CONTROL.

La cepa 110, fue usada como control CAV. Esta cepa fue aislada de un paciente con meningitis de inicio tardío, con características fenotípicas de alta virulencia, el patrón de restricción por multilocus enzimático de la CAV (división I de Musser) (18), y que es inhibida a 40°C en un medio definido químicamente (35).

Las cepas 181 y D136c se utilizaron como control no CAV, las cuales fueron aisladas de portadores asintomáticos, tienen características fenotípicas de baja virulencia, un patrón de restricción por multilocus enzimático diferente a CAV (división II de Musser) y crecen a 40°C en un medio definido químicamente (18,35).

IDENTIFICACION DE GENERO Y ESPECIE DE LOS AISLADOS.

Todos los aislados fueron identificados a nivel de género y especie a través de los métodos bacteriológicos estándar (morfología colonial, tinción de Gram, la prueba de catalasa, la prueba de CAMP y aglutinación de látex). La serotipificación de cada aislado se realizó por la técnica de aglutinación de látex (Pastorex Strepto B, Diagnostic Pasteur, Marnes la Coquette, Francia). Este procedimiento se llevó a cabo de manera cegada para el alumno quién desconocía el serotipo durante la realización de los experimentos de crecimiento a diferentes temperaturas.

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO.

Cada aislado fue inicialmente cultivado en placa de agar sangre de camero al 5% a

37°C durante 16 a 24 horas antes de cada experimento. Un medio definido químicamente (FMC) con 65 mM de fosfato de sodio y un pH entre 6.5 y 7.0 fue preparado y usado para los experimentos de cambio en la temperatura de crecimiento. (33-35). El crecimiento fue monitorizado con un espectrofotómetro (Spectronic 21, Bausch & Lomb) a una $A_{675\text{nm}}$. La densidad óptica (DO) fue multiplicada por 1000 (1 UDO equivale a 0.43ug de peso celular seco por ml ó 8.0×10^5 Unidades Formadoras de Colonia por ml).

El medio de cultivo fue modificado por la adición de caldo Todd-Hewitt a una concentración de 700 $\mu\text{g/ml}$ para el estudio de las cepas de crecimiento lento en el medio definido químicamente. Se ha demostrado que esta concentración no altera la inhibición de crecimiento a 40°C de tales aislados CAV (38).

EXPERIMENTOS DE CAMBIO EN LA TEMPERATURA DE CRECIMIENTO.

Dos a tres colonias aisladas en agar sangre fueron inoculadas en el medio FMC e incubadas a 37°C en baño María circulante hasta alcanzar 0.400 ó 0.500 de DO (fase exponencial-media). Una vez alcanzada la DO el cultivo fue enfriado inmediatamente en hielo al menos por 30 minutos. Posteriormente dos tubos con 10 ml de FMC fresco fueron inoculados con una alícuota de aproximadamente 625 μl del cultivo inicial, para obtener 0.030 a 0.040 de DO. Uno de estos tubos fue incubado en baño María a 37°C y el otro a 42°C. El crecimiento en ambas temperaturas fue monitorizado cada 30 minutos durante 4 horas. La incapacidad para crecer a 42°C fue definida como la inhibición de al menos dos veces de la densidad óptica alcanzada a 37°C durante este periodo de tiempo. Cada cepa fue analizada por lo menos en dos ocasiones.

ANALISIS ESTADISTICO.

Para comparar las diferencias en crecimiento entre aislados clasificados como CAV y No CAV se utilizó la prueba t de Student para muestras independientes. El crecimiento a las dos temperaturas ensayadas de los aislados, tanto CAV como No CAV, fue comparado con la prueba t de Student para muestras pareadas. Para evaluar la asociación de aislados CAV con enfermedad y su distribución por serotipos se utilizó la prueba χ^2 y se midió la Razón de momios con IC al 95%. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo (40).

RESULTADOS.

Se evaluaron 350 cepas de EGB aisladas de portadores y casos de enfermedad en el INPer y en el HPCMN SXXI recolectadas en el periodo de 1988 a abril de 1998 y de 1993 a 1997 respectivamente. Debido a que seis aislados se eliminaron por presentar crecimiento lento aun en el medio definido químicamente (FMC) adicionado con caldo Todd-Hewitt, lo cual impedía su clasificación como CAV o No CAV, se incluyeron en el estudio 344 aislados.

De los 344 aislados ensayados, 41 (11.9%) presentaron una curva con inhibición del crecimiento a 42°C semejante al control positivo 110 por lo cual, fueron clasificadas como CAV (figura 1). El promedio de crecimiento a las cuatro horas a esta temperatura para los aislados CAV fue de 115.1 ± 49 UDO ($X \pm DS$) mientras que a 37°C el crecimiento final fue de 972.6 ± 83.2 UDO ($p < 0.001$) (Tabla 1).

Por otro lado, 276 (80.23%) aislados no presentaron inhibición de su crecimiento a 42°C, por lo que fueron clasificados como No CAV. Estos aislados tuvieron un promedio de crecimiento a 37°C a las cuatro horas de 985.8 ± 91.1 UDO y a 42°C de 920.9 ± 89.8 UDO (p no significativa {NS}) (Figura 1).

Del total de las muestras estudiadas, 27 aislados (7.8%) presentaron una curva de crecimiento lento en FMC, los cuales tuvieron un promedio de crecimiento a 37°C de 218.4 ± 117.3 UDO y a 42°C de 190.7 ± 102.4 UDO (p NS) (Figura 2), por lo cual, estos aislados

fueron ensayados en medio FMC adicionado con caldo Todd Hewitt (700 $\mu\text{g/ml}$). Con este método, 22 aislados fueron clasificados como No CAV con un promedio de crecimiento a 37°C de 580.8 ± 157.6 UDO y a 42°C 570.8 ± 113.5 UDO (p NS), mientras que cinco aislados presentaron una curva de crecimiento semejante a los aislados CAV, de 830 ± 34.6 UDO a 37°C y de 228 ± 50.7 UDO a 42°C ($p < 0.001$) (Figura 3).

Las curvas de crecimiento de algunos aislados clasificados como CAV y No CAV así como de las cepas control se presentan en la figura 4, con el propósito de ejemplificar la diferenciación entre las curvas de crecimiento. Los aislados 72 y 185 presentan una curva de crecimiento semejante al control positivo 110, el cual pertenece a la división I de Musser, mientras que los aislados 159 y 128 al control negativo 181, aislados de la división II de Musser (18).

La diferencia en los promedios de crecimiento a 42°C medidos en unidades de densidad óptica (UDO) x 1000 entre aislados CAV (115.1 ± 49 UDO) y No CAV (920.9 ± 89.8 UDO) fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$) (Tabla 1).

El tiempo mínimo necesario para observar una diferencia significativa entre las curvas de crecimiento a 37°C y 42°C de los aislados CAV fue de una hora ($p < 0.001$), mientras que para las cepas CAV ensayadas en FMC adicionado con Todd-Hewitt fue de dos horas ($p = 0.006$) (Figura 1 y 3).

La prevalencia de la clona de alta virulencia encontrada en la muestra estudiada fue de

13.4% (46/344) (Tabla 2), mientras que los aislados clasificados como No CAV fue 86.6% (298/344). Así mismo en los casos de enfermedad, 15 de 103 aislados (14.6%) fueron CAV y de los aislados obtenidos de portadores de 210, 28 (13.3%) fueron CAV (Tabla 3).

El origen clínico de los aislados fue: cervicovaginal 187 (54.4%), urocultivo 66 (19.2%), espermocultivo 19 (5.5%), hemocultivo 19 (5.5%), líquido cefalorraquídeo 12 (3.5%), exudado faríngeo 4 (1.2%), absceso 3 (0.9%), punta de catéter vascular 2 (0.6%), aspirado bronquial 1 (0.3%) y se desconocido en 31 (9%) (Tabla 4).

Del total de los aislados, 277 (88.5%) fueron obtenidos de personas adultas, de los cuales 67 (24.2%) fueron de casos de enfermedad (66 urocultivos y un absceso) y 210 (75.8%) de portadores (187 cervicovaginales, 19 espermocultivos, y cuatro exudados faríngeos); mientras que 36 (11.5%) aislados fueron de recién nacidos todos ellos con enfermedad (12 LCR, 19 hemocultivos, dos abscesos, dos de punta de catéter y uno de aspirado bronquial). La distribución de los serotipos con respecto al estado portador y casos de enfermedad de los aislados CAV y NO CAV se presenta en la Tabla 5.

La distribución por serotipos fue la siguiente: el 43.9% (151) correspondió al serotipo I, 13.7% (47) al serotipo II, 29.6% (102) al serotipo III, 3.8% (13) no tipificables y el 9.3% (31) el serotipo no se pudo determinar (Tabla 4).

De los 46 aislados clasificados como CAV, 15 (32.6%) fueron obtenidos de casos de enfermedad, de ellos ocho (53.3%) fueron de adultos (siete urocultivos y un absceso) y siete

(46.6%) de recién nacidos (cuatro de LCR y tres hemocultivos); 28/46 (60.1%) aislados fueron obtenidos de portadores (25 cervicovaginales y tres espermocultivos). El origen clínico de tres aislados fue desconocido (6.5%).

El serotipo III presentó un predominio en los aislados clasificados como CAV ya que 35 aislados (76.1%) de los 46 fueron de este serotipo. De esos 35 aislados, 10 fueron de casos de enfermedad (cuatro urocultivos, tres hemocultivos, dos LCR y un absceso) y 23 de portadores (20 cervicovaginales y tres espermocultivos). En dos aislados el origen clínico se desconoció. Seis aislados clasificados como CAV (13%) fueron del serotipo I, de los cuales cinco fueron obtenidos de casos de enfermedad (dos de LCR y tres urocultivos) y en uno el origen clínico se desconoció. Así mismo, cuatro aislados cervicovaginales obtenidos de portadores y clasificados como CAV fueron del serotipo II (8.7%) y uno fue no tipificable (2.2%), el cual también fue un aislado cervicovaginal (Tabla 4).

En la Tabla 2 se observa la relación entre la distribución por origen clínico de aislados clasificados como CAV con el serotipo III, mientras que en la Tabla 3 muestra la relación de aislados clasificados como CAV y el serotipo III con los casos de enfermedad y de portador.

Aunque la mayoría de los aislados clasificados como CAV fueron del serotipo III ($p < 0.001$), el aislamiento de la CAV de este serotipo no se asoció a un mayor riesgo de enfermedad (RM 1.15, IC 95% 0.56-2.34; $p = 0.80$).

Por otro lado, de los aislados clasificados como No CAV, 88 (29.5%) fueron obtenidos

de casos de enfermedad; de ellos 59 (67%) fueron de adultos (todos de urocultivo) y 29 (33%) de casos neonatales (8 de LCR, 16 hemocultivos, dos de abscesos, dos de punta de catéter y uno de aspirado bronquial). Ciento ochenta y dos (67.4%) fueron aislados de portadores (162 cervicovaginales, 16 espermocultivos, y cuatro exudados faríngeos), no obstante, en 28 (9.4%) aislados se desconoció el origen clínico.

La mayoría de los aislados clasificados como No CAV fueron del serotipo I, siendo 145 (48.6%) de 298 aislados, de ellos 30 se asociaron a casos de enfermedad en adultos, (todos de urocultivos) y 16 a casos neonatales (10 hemocultivos, cuatro de LCR, uno de punta de catéter y uno de aspirado bronquial). 88 fueron aislados de portadores (75 cervicovaginales, 11 espermocultivos y dos de exudado faríngeos) y en 11 el origen clínico fue desconoció. El 14.4% (43) de los 298 clasificados como No CAV fueron del serotipo II, de los cuales, 30 fueron obtenidos de portadores (todos de origen cervicovaginal), cuatro de casos de enfermedad en adultos (urocultivos) y tres de casos de enfermedad neonatal (un LCR y dos hemocultivos). El origen clínico se desconoció en seis. Sesenta y siete (22.5%) aislados No CAV correspondieron al serotipo III, 17 de ellos fueron de casos de enfermedad de adultos (todos de urocultivos) y nueve de recién nacidos (tres de LCR, tres hemocultivos, dos abscesos y uno de punta de catéter). Los aislados obtenidos de portadores fueron 35 (31 cervicovaginales, tres espermocultivos y uno de exudado faríngeo). En seis aislados de este serotipo se desconoció el origen clínico. El 4% (12) de los aislados No CAV fueron No tipificables, nueve de estos fueron obtenidos de portadores (ocho cervicovaginales y un espermocultivo), uno de enfermedad en adultos (urocultivo) uno de enfermedad neonatal (hemocultivo) y uno sin origen clínico. En 31 aislados (10.4%) No CAV el serotipo se

desconoció, de ellos 20 fueron obtenidos de portadores (18 cervicovaginales, un espermocultivo, un exudado faringeo); siete urocultivos se obtuvieron de casos de enfermedad en adultos y de cuatro aislados el origen clínico se desconoció (Tabla 4).

DISCUSION.

Aunque *Streptococo del grupo B (EGB)* es el agente patógeno que con mayor frecuencia se aísla en infecciones neonatales, tanto en Estados Unidos de Norteamérica como en Europa, en México es considerado una causa poco frecuente de infección perinatal. Sin embargo, la letalidad atribuida a EGB en un estudio realizado en México fue seis veces superior al promedio reportado en Estados Unidos de Norteamérica (5.8% vs 38.5%) (1-4,11). Así mismo, otros estudios demostraron que la población mexicana está altamente expuesta a EGB y que el serotipo III, más frecuentemente relacionado con enfermedad invasiva en países desarrollados, tiene una frecuencia más elevada a la reportada en estudios iniciales en este país (13,14).

Una clona de alta virulencia (CAV) de EGB fue recientemente identificada y se ha sugerido que es la responsable de la mayoría de la morbimortalidad perinatal en países desarrollados (18). Esta clona tiene varias características fenotípicas únicas, dentro de las cuales se encuentra la incapacidad para crecer a 40°C en un medio definido químicamente (FMC). Examinando la base molecular de la inhibición del crecimiento a 40°C se ha identificado que una fructuosa 1-6 bifosfato aldolasa sensible a altas temperaturas (fba) es la responsable de esta inhibición. Esta aldolasa pierde el 75% de su actividad enzimática cuando un aislado CAV es incubado a 40°C. Esta característica ha sido usada como un marcador altamente específico y sensible para identificar a la clona de alta virulencia de EGB (35,36).

Mattingly y cols. en EU, así como Palacios y cols. en México (35,38), identificaron a la CAV de EGB a través de estos experimentos de cambio en la temperatura de crecimiento (37 vs 40°C). En el presente estudio la inhibición del crecimiento tanto del control positivo CAV como de los aislados mexicanos examinados se observó a 42°C. Una posible explicación de estos hallazgos, es la diferencia en la altitud del área geográfica en donde se realizaron los dos estudios previos, los cuales fueron hechos en San Antonio Texas, E.U., mientras que el presente estudio fue realizado en la ciudad de México. Estas ciudades se encuentran a 90 y 2,400 metros sobre el nivel del mar respectivamente (41).

Con este método, en el presente estudio se confirmó la existencia de la CAV en México con una prevalencia de 13.4%, cifra más alta que la reportada por Palacios y colaboradores, (5.2%)(38). No obstante, en este último estudio solo se analizaron 57 aislados mexicanos de EGB, de un estudio inicial diseñado para evaluar aislados no tipificables (13,38). Aunque la muestra evaluada correspondió a aislados que en su mayoría fueron colectados de personas atendidas en un centro de atención de tercer nivel para población con alto riesgo perinatal, los resultados de este estudio sugieren una prevalencia mayor de la CAV en México a lo previamente reportado.

La prevalencia en este estudio fue 2.5 veces más elevada que la reportada en el estudio de Palacios y cols (38). En este último estudio los autores atribuyen la baja incidencia de enfermedad a la baja prevalencia de la CAV en México, sin embargo, con los resultados del presente estudio, esa hipótesis es poco probable. Además de la diferencia en la característica de la muestra estudiada por Palacios y cols., con respecto a la muestra del presente estudio,

otra posible explicación de la prevalencia encontrada, es que la prevalencia de la colonización por la CAV haya tenido un incremento en esta población. Se desconoce si existen factores particulares en la población estudiada que influyan en la prevalencia de la CAV.

Del total de la muestra estudiada, 33 aislados presentaron una curva de crecimiento lento tanto a temperatura de 37°C como a 42°C. Sin embargo, al adicionar caldo Todd-Hewitt al medio FMC (700 µg/ml) 27 de los 33 aislados pudieron ser clasificados, de los cuales cinco fueron CAV y 22 No CAV. Solo seis aislados presentaron la misma curva de crecimiento lento aun con la adición del caldo Todd-Hewitt al medio FMC por lo que fueron excluidos del estudio. Hasta el momento se desconoce la causa de este patrón de crecimiento. Al adicionar este medio enriquecido (contiene infusión de corazón de vaca, peptona, dextrosa y fosfato disódico entre otros componentes), al medio FMC a la concentración referida previamente, se proporcionaron algunos elementos requeridos para el crecimiento de los aislados que crecieron lentamente en FMC no suplementado sin modificar la inhibición de crecimiento a 40-42°C de los aislados CAV (38).

Por otro lado, se han buscado varios métodos para clasificar y subtipificar a EGB y correlacionarlo con el desarrollo de enfermedad; sin embargo, no hay todavía algún método de subtipificación que pueda predecir el desarrollo de enfermedad. Desde hace tiempo, la serotipificación del antígeno capsular ha sido la técnica estándar para estudiar la relación de aislados de EGB con enfermedad, no obstante, este y otros métodos tales como el análisis de plásmidos han sido poco útiles en la subclasificación de EGB (15, 16, 18, 20-22).

Estudios realizados por Musser (18), Helming (15) y Quentin (16) en diferentes países han reportado la asociación de la CAV del serotipo III con los casos de enfermedad invasiva. Además, en el estudio realizado en México por Palacios y cols., los tres aislados clasificados como CAV del total de 57, fueron del serotipo III y correspondieron a casos de enfermedad (38). En cambio, a pesar de no contar con los datos clínicos detallados de los pacientes de los cuales los aislados fueron obtenidos para el presente estudio, 15 de los 46 (32.6%) aislados clasificados como CAV fueron de casos de enfermedad y de ellos 10 correspondieron al serotipo III. De este modo, y contrario a lo reportado anteriormente, en este estudio no hubo una asociación significativa entre la CAV del serotipo III y enfermedad (RM 1.15, IC 95% 0.56-2.34; $p=0.80$). No obstante, aunque la CAV del serotipo III fue identificada en aislados de portadores (23 de los 46 aislados CAV), la mayoría fueron de origen cervicovaginal y se desconoce el estado clínico final de las pacientes y sus productos.

Se ha considerado que factores perinatales de alto riesgo participan en conjunto con la virulencia de EGB en el desarrollo de enfermedad (42). Estos factores de riesgo perinatal son frecuentes en países en desarrollo por las condiciones socioeconómicas que condicionan limitaciones en el cuidado perinatal y en la atención del nacimiento. Esto podría explicar la elevada letalidad reportada previamente en México.

Por otro lado, aunque en el presente estudio la mayoría de los aislados clasificados como CAV fueron del serotipo III (35/46, 76%), 11 de los 46 aislados (24%) fueron de serotipos diferentes al tipo III (cuatro del serotipo II, seis del serotipo I y uno fue no tipificable). En los estudios previos (15,16,18) la CAV de EGB fue identificada solo en aislados del serotipo III. Los resultados de este estudio sugieren que la CAV de EGB pudiera

no estar circunscrita al serotipo III y que aislados de alta virulencia pudieran ser encontrados en otros serotipos. Otra posible explicación a este hallazgo es que esta característica de inhibición del crecimiento a 40-42°C no es exclusiva de aislados CAV.

La distribución por serotipos en el presente estudio fue la siguiente: serotipo I, 43.9%; serotipo II, 13.7%; serotipo III, 29.6%; y no tipificables, 3.8%. En cambio, en un estudio previo en México, se encontró que el 66.6% era del serotipo I, el 12% del serotipo II, 3% del serotipo III y el 18.2% aislados no tipificables (10). Aunque en ambos estudios se observó el predominio del serotipo I, el porcentaje de aislados del serotipo III y no tipificables fue diferente. Esto podría deberse a las técnicas utilizadas para la serotipificación, ya que en este estudio se utilizó el método de aglutinación de látex, prueba que se realiza con células completas, mientras que en el estudio previo se utilizó la técnica de precipitación en tubo capilar con antígenos preparados por extracción ácida caliente de Lancefield. Se ha demostrado que con esa técnica se degradan algunos componentes ácido lábiles del polisacárido capsular, entre los cuales se encuentra el ácido siálico, el principal inmunodeterminante del antígeno de tipo (43,44). Es probable también que en la prevalencia de los serotipos de estos dos estudios verdaderamente haya cambios en su distribución a través del tiempo.

En el presente estudio se utilizó la incapacidad para crecer a altas temperaturas de la CAV de EGB para evaluar la prevalencia de esta clona en una muestra de aislados en México. Aunque la prevalencia encontrada fue mayor (13.4%) a la reportada en un estudio previo

(5.2%), la proporción de aislados CAV fue similar en casos de enfermedad y en portadores. Estos resultados parecen poner en duda la aparente elevada virulencia de la CAV de EGB, puesto que en el presente estudio esta clona fue identificada solo a través de una característica bioquímica no relacionada con virulencia y, además, no se evaluaron características directamente relacionadas con una mayor virulencia en los aislados. No obstante, como en estudios previos la evaluación de una colección de aislados en el presente, impidió controlar la modificación del efecto que pudieron haber condicionado diversos factores, tanto de la madre, del embarazo, del parto como del producto de la gestación, que se sabe incrementan la susceptibilidad del huésped a la infección o, bien, incrementan el tamaño del inóculo. Por otro lado, conocer solo el sitio de aislamiento y no el estado clínico de la madre y del producto de la gestación, ni tampoco el padecimiento que motivo la toma de la muestra de la cual EGB fue aislado, podría ser otro motivo por el cuál no se encontró diferencia en la distribución de aislados CAV entre portadores y enfermos. Cabe entonces la pregunta ¿los aislados identificados como CAV en el presente estudio no son altamente virulentos?. Este estudio no fue diseñado para evaluar la virulencia de estos aislados, sino para identificar la CAV de EGB utilizando una característica que se ha demostrado es exclusiva de la CAV. La CAV de EGB ha sido identificada en estudios previos a través de análisis de multilocus enzimático, RFLP y por su inhibición del crecimiento a altas temperaturas (15,16,18,35,38,39), y la concordancia entre estas pruebas en dichos estudios fue del 100%. Así, se ha propuesto la utilización de esta última característica como un método altamente sensible y específico para identificar aislados CAV. Por otro lado, se ha demostrado que los aislados CAV tienen características fenotípicas de alta virulencia que no tienen los aislados no clasificados en esta clona. Estas características han sido previamente descritas. Por todo lo anterior, la falta de asociación con enfermedad

invasiva de aislados identificados como CAV en el presente estudio no descarta que tales aislados sean altamente virulentos. Si tales aislados son ulteriormente sometidos a pruebas que permitieran identificar que, efectivamente, no expresan las características relacionadas con virulencia anteriormente descritas, entonces los aislados identificados como CAV en el presente estudio, corresponderían solo a una Clona Mutante en el Gen de Aldolasa y no a una CAV. Actualmente el grupo de investigación de este estudio esta evaluando la virulencia de aislados identificados como CAV a través de un modelo animal de transmisión vertical.

Este estudio sugiere que la CAV a pesar de existir en México con una mayor prevalencia a la reportada no está asociada a los casos de enfermedad, así mismo no está circunscrita al serotipo III, por lo que la baja incidencia de enfermedad y la elevada letalidad reportada en México deber ser fuente de nuevas investigaciones.

CONCLUSIONES.

-Con este estudio se confirma que la clona de alta virulencia de EGB, identificada a través de su incapacidad para crecer a 42°C en FMC, existe en México.

-La prevalencia de la CAV de EGB en esta muestra fue de 13.4%, cifra 2.5 veces mayor al estudio previo publicado por Palacios y colaboradores.

-La CAV de EGB había sido identificada exclusivamente en aislados del serotipo III, en el presente estudio se identificó a esta clona CAV en aislados de otros serotipos (24%).

Es probable que la CAV no este circunscrita a aislados del serotipo III o que aislamientos de otros serotipos diferentes al tipo III sean altamente virulentos.

-A pesar de la presencia de CAV de EGB en México, no hubo asociación de la CAV del serotipo III de EGB con los casos de enfermedad

BIBLIOGRAFIA.

- 1.-Baker CJ, Edwards MS. Group B *Streptococcal* infections. En: Remington JS, Klein JO, ed. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 4th. Philadelphia: W.B Saunders company. 1995:980-1054.
- 2.-Payne RN, Burke AB, Day LD, Christenson DP, Thompson RT, Ferrieri P. Correlation of clinical and pathologic findings in early onset neonatal group B *Streptococcal* infection with disease severity and prediction of outcome. *Pediatr Infect Dis J* 1988;7:836-47.
- 3.-Blumberg HM, Stephens DS, Modansky M, Erwin M, et al. Invasive group B *Streptococcal* disease: The emergence of serotype V. *J Infect Dis* 1996; 173: 365-373.
- 4.-Solorzano-Santos F, Arredondo-García JL, Ortiz-Ibarra FJ, Díaz-Ramos RD, Cazares- Ortiz M, Echaniz-Aviles G. *Streptococcus* del grupo B en la etiología de la infección neonatal. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1990; 47:146-152.
- 5.-Baker CJ, Barrett FF. Group B *Streptococcal* infections in infants: The importance of the various serotypes. *JAMA* 1974;230:1158-1160.
- 6.-Wilkinson HW, Facklam RR, Wotham EC. Distribution by serological type of group B *Streptococci* isolated from a variety of clinical material over a five-year period with special reference to neonatal sepsis and meningitis. *Infect Immun* 1973;8:828-235.
- 7.-Dillon HC, Kahre S, Gray BM. Group B *Streptococcal* carriage and disease: A 6-year prospective study. *J Pediatr* 1987; 110:31-6.
- 8.-Anthony BF, Okada DM, Hobel CJ. Epidemiology of group B *Streptococcus*: Longitudinal observations during pregnancy. *J Infect Dis* 1978;137:524-530.

- 9.-Collado ML, Kretschmer RR, Becker I, Guzmán A, Gallardo L, Lepe CM. Colonization of mexican pregnant women with group B *Streptococcus*. J Infect Dis 1981;143:134.
- 10.-Solorzano-Santos F, Echaniz-Aviles G, Conde-González CJ, Caldeón-Jaimes E, Arredondo-García JL, Beltran-Zuñiga M. Cervicovaginal infection with group B *Streptococci* among pregnant mexican women. J Infect Dis 1989;159:1003-1004.
- 11.-Solorzano-Santos F, Diaz-Ramos RD, Arredondo-García JL. Diseases caused by group B *Streptococcus* in México. Pediatr Infect Dis J 1990;9:66.
- 12.-Coldman G. Typing of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B). Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1988;7:226-231.
- 13.-Palacios SG, Eskew EK, Solorzano SF, Mattingly SJ. Decreased biosynthetic capacity of type-specific antigen accounts for the high prevalence of nontypable stains of group B *Streptococci* in México. J Clin Microbiol 1997;35:2923-2926.
- 14.-Caltenco SR. Seroprevalencia de anticuerpos contra *Streptococcus agalactiae* en mujeres mexicanas de 15-40 años de edad. Tesis, Universidad Nacional Autónoma del México, México, D.F. 1996.
- 15.-Helmig R, Uldbjerg N, Boris J, Kilian M. Clonal análisis of *Streptococcus agalactiae* isolated from infants with neonatal sepsis or meningitis and their mothers and from healthy pregnant women. J Infect Dis 1993;168:904-9.
- 16.-Quentin R, Huet H, Wang F, Geslin P, Goideau A, Selander R. Characterization of *Streptococcus agalactiae* stains by multilocus enzyme genotype and serotype: Identification of multiple virulent clone families that cause invasive neonatal disease. J Clin Microbiol 1995;33:2576-2581.
- 17.-Schuchat A and Wenger JD. Epidemiology of group B streptococcal disease. risk factors,

- prevention strategy and vaccine development. *Epidemiol Rev* 1994;16:374-402.
- 18.-Musser JM, Mattingly SJ, Quentin R, Goudeau A, Selander RK. Identification of a high-virulence clone of type III *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*) causing invasive neonatal disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:4731-4735.
- 19.-Zangwill KM, Schuchat A and Wenger JD. Group B streptococcal disease in the United States, 1990: report from a multistate active surveillance system. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1992;41(SS-6): 25-32.
- 20.-Bingen E, Denamur E, Lambert-Zechovsky N, Aujar Y, Brahimi N, Geslin P, Elion J. Analysis of DNA restriction fragment length polymorphism extends the evidence for breast milk transmission in *Streptococcus agalactiae* late-onset neonatal infection. *J Infect Dis* 1992; 165:569-73.
- 21.-Blumberg HM, Stepens DS, Licitra C, Pigott N, Facklam R, Swaminathan B, Wachsmuth IK. Molecular epidemiology of group B streptococcal infections: use of restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA and DNA restriction fragment length polymorphisms of ribosomal RNA genes (ribotyping). *J Infect Dis* 1992;166:574-579.
- 22.-Hauge M, Jespersgaard C, Poulsen K, Kilian M. Population structure of *Streptococcus agalactiae* reveals an association between specific evolutionary lineages and putative virulence factors but not disease. *Infect Immun* 1996; 64:919-25.
- 23.-Doran TI, Straus DC, Mattingly SJ. Extracellular antigens of serotype III group *Streptococci*. *Infect Immun* 1980;30:890-893.
- 24.-Doran TI, Straus DC and Mattingly SJ. Factors influencing release of type III antigens by group B *Streptococci*. *Infect Immun* 1981; 31:615-623.
- 25.-Milligan TW, Baker CJ, Straus DC, Mattingly SJ. Association of elevated levels of

- extracellular neuraminidase with clinical isolates of type III group B *Streptococci*. *Infect Immun* 1978;21:738-46.
- 26.-Nealon TJ, Mattingly SJ. Association of elevated levels of cellular lipoteichoic acid of group B *Streptococci* with human neonatal disease. *Infect Immun* 1983;39:1243-1251.
- 27.-Levy NJ, Nicholson-Weller A, Baker CJ, et al. Potentiation of virulence by group B *Streptococcal* polysaccharides. *J Infect Dis* 1984;149:851-860.
- 28.-Shigeoka AO, Rote NS, Santos JL, et al. Assessment of the virulence factors of group B *Streptococci*: correlation with sialic acid content. *J Infect Dis* 1983;147:857-863.
- 29.-Pritchard DG, Lin B. Group B *Streptococcal* neuraminidase is actually a hyaluronidase. *Infect Immun* 1993;61:3234-3239
- 30.-Paoletti LC, Ross RA, Johnson KD. Cell growth rate regulates expression of group B *Streptococcus* type III capsular polysaccharide. *Infect Immun* 1996;64:1220-1226.
- 31.-Yeung MK, Mattingly SJ. Biosynthetic capacity for type-specific antigen synthesis determines the virulence of serotype III strains of group B *Streptococci*. *Infect Immun* 1984;44:217-221.
- 32.-Maurer JJ, Mattingly SJ. In vitro method to differentiate isolates of type III *Streptococcus agalactiae* from symptomatic and asymptomatic patients. *J Clin Microbiol* 1988;26:686-691.
- 33.-Terleckyj B, Willett NP, Shockman. Growth of several cariogenic strain of oral *Streptococci* in a chemically defined medium. *Infect Immun* 1975; 11:649-655.
- 34.-Milligan TW, Doran TI, Straus DC, Mattingly SJ. Growth and amino acid requirements of various strains of group B *Streptococci*. *J Clin Microbiol* 1978;7:28-33.
- 35.-Mattingly SJ, Maurer JJ, Eskew EK, Cox F. Identification of an high-virulence clone of serotype III *Streptococcus agalactiae* by growth characteristics at 40°C. *J Clin Microbiol*

- 1990;28:1676-1677.
- 36.-Mattingly SJ, Eskew KE. Temperature sensitivity of fructose-1,6-bisphosphate aldolase accounts for the inability of the high virulence clone of *Streptococcus agalactiae* to grow at 40°C. *Current Microbiology* 1993;26:147-150.
- 37.-Timmons BC, Lee LN, Eskew EK, LeBlanc DJ, Mattingly SJ. Molecular analysis of the high-virulence clone of group B *Streptococcus*. In Proceed 94 th Gen Meet Amer. Soc. Microbiol., Las Vegas, Abstract D-63. 1994:67
- 38.-Palacios GC, Eskew EK, Solorzano F, Mattingly SJ. Identification of the high-virulence clone of group B *Streptococci* in Mexican isolates by growth characteristics at 40°C. Aceptado para publicación en *Current Microbiology*.
- 39.-Palacios SG, Eskew EK, Timmons BC, Solorzano SF, Mattingly SJ. Molecular epidemiology of Mexican group B *Streptococcus* strain: search for the high virulence clone. Abstracts 37th. Interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy (ICAAC) Toronto: American society for microbiology 1997:341.
- 40.-Dawson-Saunders B, Trapp RG. *Bioestadística Médica. Manual Moderno*, 1993:49-184.
- 41.-Webster's family interactive encyclopedia, 1996. Helicon publishing Ltd.
- 42.- Schuchat A, Deaver-Robinson K, Plikaytis BD, Zangwill KM, et al. Multistate case-control study of maternal risk factors for neonatal group B *Streptococcal* disease. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:623-629.
- 43.-Lancefield RC. Serological differentiation of specific types of bovine hemolytic *Streptococci* (group B). *J Exp Med* 1934;61:335-349
- 44.-Swift HF, Wilson AT, Lancefield RC. Typing group A hemolytic *Streptococci* by precipitin reactions in capillary pipettes. *J Exp Med* 1943;78:127-33.

TABLA 1. CRECIMIENTO A 37°C y 42°C DE 344 AISLADOS MEXICANOS DE EGB EN UNIDADES DE DENSIDAD OPTICA (UDO).

AISLADOS	No. DE AISLADOS	CRECIMIENTO EN UDO (X±DS)	
		37°C	42°C
CAV	41	972.6±83.2	115.1±49.1
No CAV	276	985.8±91.1	920.9±89.8
CREC. LENTO:			
CAV	27	218.4±117.2	192.7±102.4
CAV	5	830.0± 34.6	228.0± 50.6
No CAV	22	580.8±157.6	570.8±113.5

* Diferencias estadísticamente significativas (p<0.05)

CAV: Clona de alta virulencia

No CAV: No clona de alta virulencia.

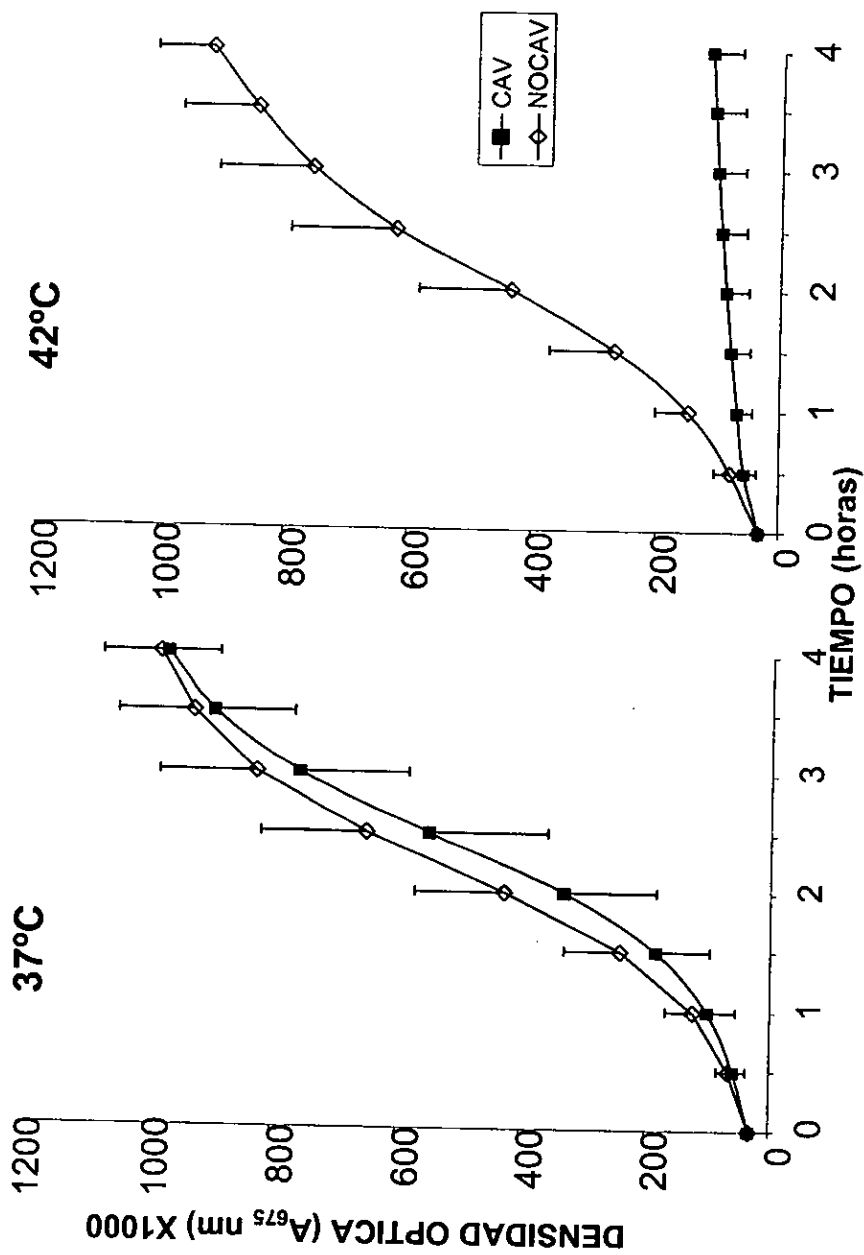


Figura 1. Crecimiento en medio FMC a 37 y 42°C de 317 aislados mexicanos de EGB. Los aislados con características de CAV (46), presentaron inhibición en la curva de crecimiento a 42°C.

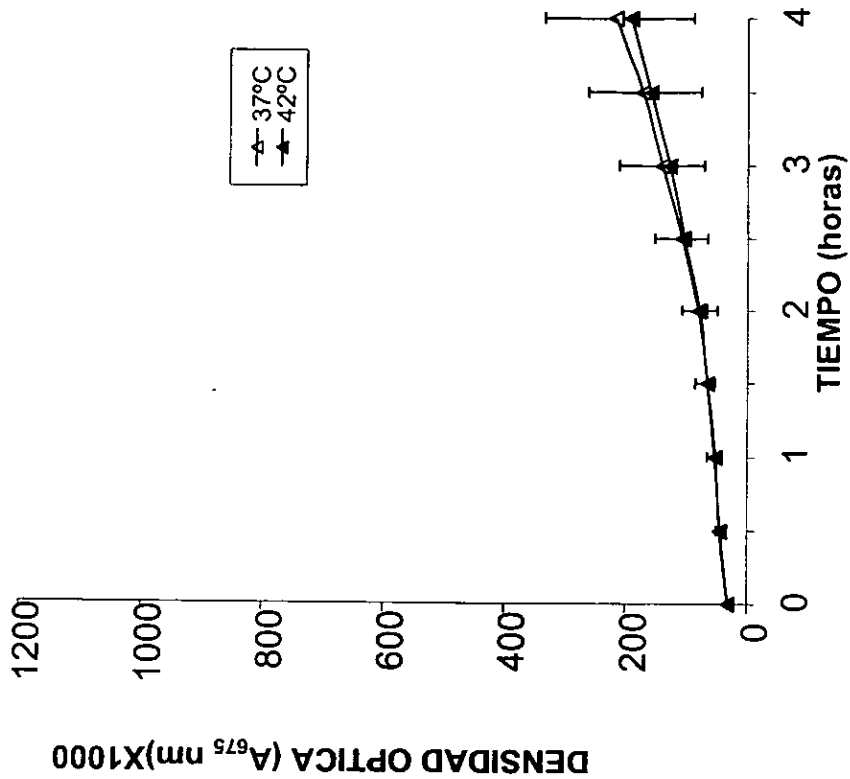


Figura 2. Crecimiento en FMC a 37 y 42°C de 27 aislados mexicanos de EGB con crecimiento lento.

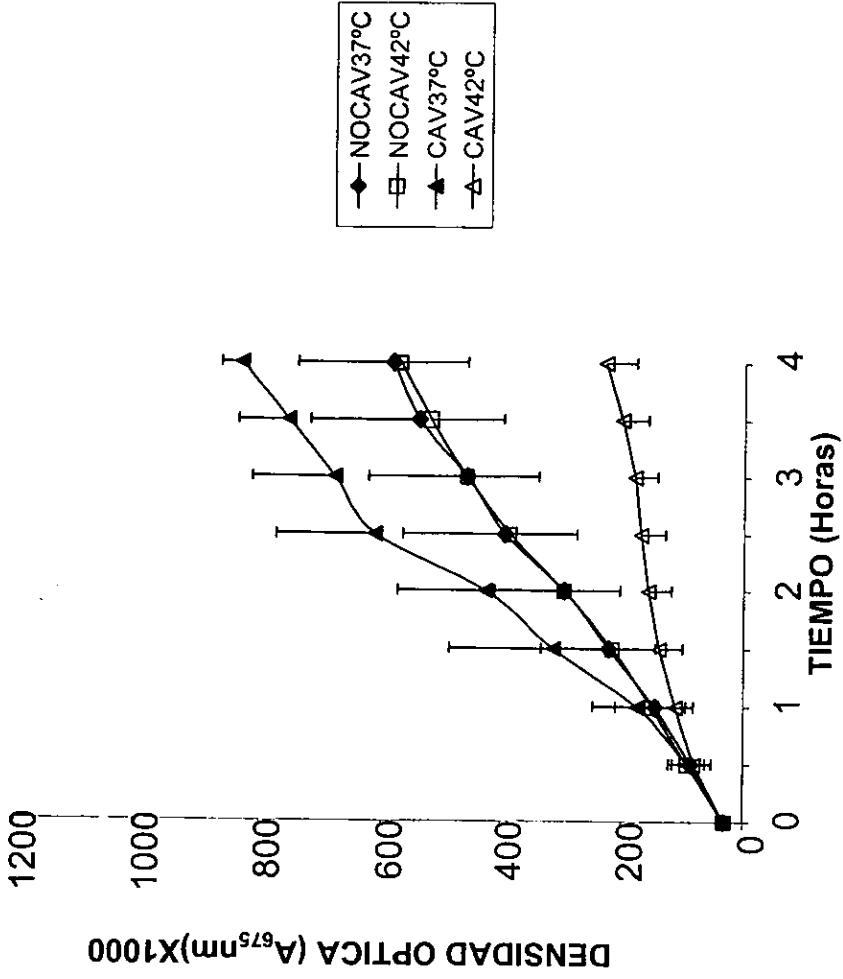


Figura 3. Crecimiento en medio FMC adicionado con caldo Todd-Hewitt a 37 y 42°C de 27 aislados mexicanos de EGB, que crecieron lentamente en medio FMC solo.

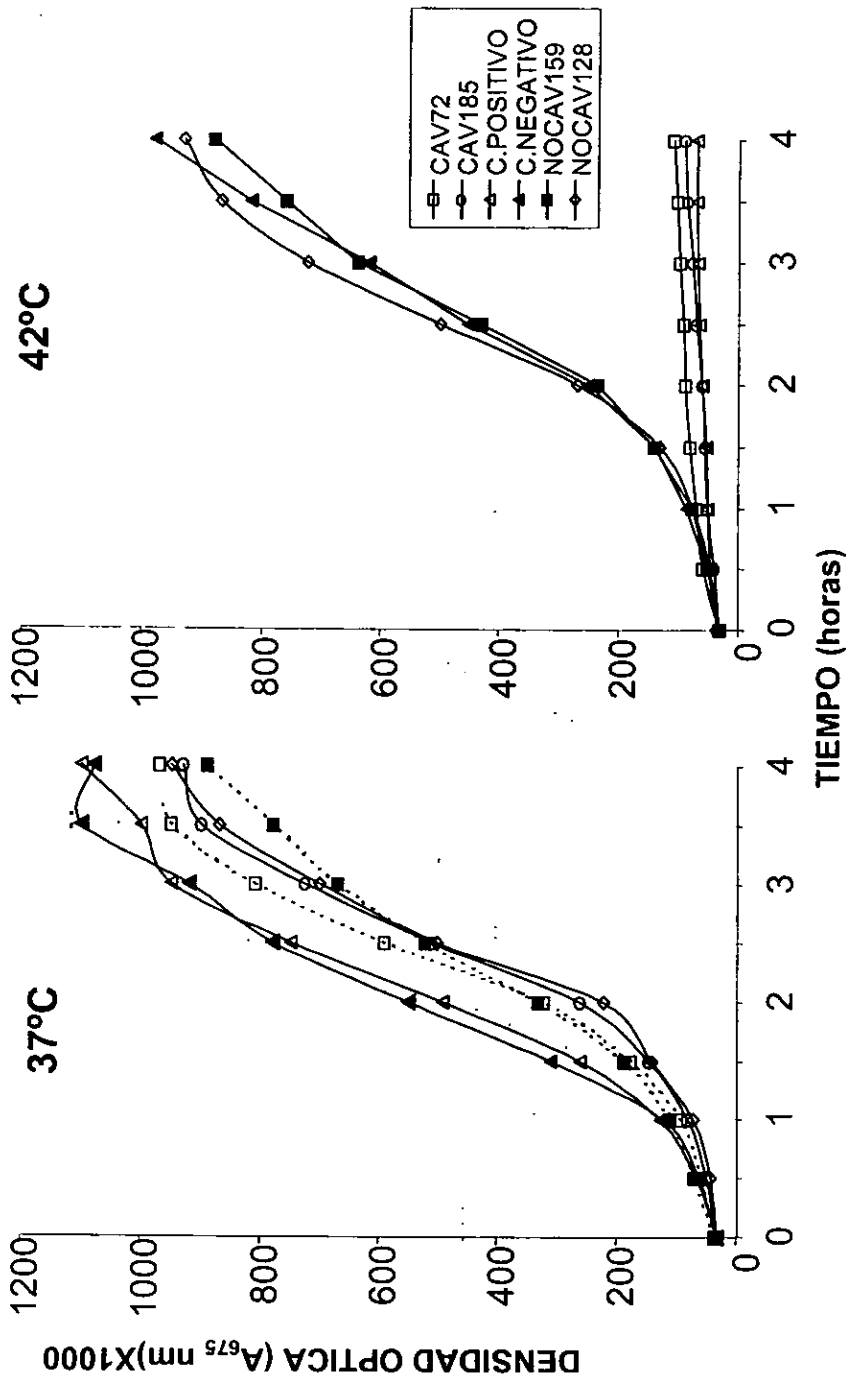


Figura 4. Crecimiento en medio FMC a 37 y 42°C de 4 aislados mexicanos de EGB, dos clasificadas como CAV y dos No CAV. El control positivo 110 y control negativo 181 corresponden a la división I y II de Musser respectivamente (18).

TABLA 2. ORIGEN CLINICO DE AISLADOS DE EGB DEL SEROTIPO III Y SU ASOCIACION CON LA CAV.

ORIGEN CLINICO	Total No. (%)	Serotipo III No. (%)	CAV No. (%)	Serotipo III-CAV No. (%)
Cervicovaginal	187 (54.4)	51 (27.2)	25 (13.4)	20 (10.7)
Urocultivo	66 (19.2)	21 (31.8)	7 (10.6)	4 (6.1)
Espermocultivo	19 (5.5)	6 (31.6)	3 (15.8)	3 (15.8)
Hemocultivo	19 (5.5)	6 (31.6)	3 (15.8)	3 (15.8)
LCR	12 (3.5)	5 (41.6)	4 (33.3)	2 (16.6)
E. Faríngeo	4 (1.2)	1 (25.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Absceso	3 (0.9)	3(100.0)	1 (33.3)	1 (33.3)
P. catéter	2 (0.6)	1 (50.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Asp. Bronquial	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Desconocido	31 (9.0)	8 (25.8)	3 (96.8)	2 (6.4)
Total	344 (100.0)	102 (29.6)	46 (13.4)	35 (10.7)

CAV: Clona de alta virulencia de EGB

TABLA 3. ASOCIACION ENTRE AISLADOS DE EGB DE PORTADORES Y DE CASOS DE ENFERMEDAD CON EL SEROTIPO III Y LA CAV.

	TOTAL No. (%)	Serotipo III No. (%)	CAV No. (%)	Serotipo III-CAV No. (%)
PORTADOR	210 (67)	58 (27.6)	28 (13.3)	23 (10.9)
ENFERMEDAD	103 (33)	46 (44.6)	15 (14.6)	10 (9.7)
TOTAL	<u>313 (100)</u>	<u>104 (33.2)</u>	<u>43 (13.7)</u>	<u>33 (10.54)</u>

CAV: clona de alta virulencia de EGB.

TABLA 4. DISTRIBUCION DEL ORIGEN CLINICO Y SEROTIPO DE 344 AISLADOS CAV Y No CAV DE EGB.

ORIGEN CLINICO	Serotipo I		Serotipo II		Serotipo III		No tipificables		Desconocido.		TOTAL (%)
	CAV	No CAV	CAV	No CAV	CAV	No CAV	CAV	No CAV	CAV	No CAV	
Cervicovaginal			4	30	20	31	1	8		18	187 (54.4)
Urocultivo	3	30	4	4	4	17		1		7	66 (19.2)
Espermocultivo		11			3	3		1		1	19 (5.5)
Hemocultivo		10		2	3	3		1			19 (5.5)
LCR	2	4		1	2	3					12 (3.5)
E. Faringeo		2				1				1	4 (1.2)
Absceso					1	2					3 (0.9)
Punta Catéter		1				1					2 (0.6)
Aspirado Bronquial		1									1 (0.3)
Desconocido	1	11		6	2	6		1		4	31 (9.0)
TOTAL (%)	6 (1.7)	145 (42.2)	4 (1.2)	43 (12.5)	35 (10.2)	67 (19.5)	1 (0.3)	12 (3.5)		31 (9.0)	344 (100)

CAV: Clona de alta virulencia

No CAV: No clona de alta virulencia

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

TABLA 5. SEROTIPOS DE 313 AISLADOS MEXICANOS DE EGB CLASIFICADOS COMO CAV Y No CAV, DE ACUERDO A SU ORIGEN CLÍNICO (DE ENFERMEDAD O DE PORTADORES).

SEROTIPO	<u>AISLADOS CAV</u>		<u>AISLADOS No CAV</u>		TOTAL
	Enfermedad	Portador	Enfermedad	Portador	
I	5		46	88	139
II		4	7	30	41
III	10	23	26	35	94
NT		1	2	9	12
desconocido			7	20	27
TOTAL	<u>15</u>	<u>28</u>	<u>88</u>	<u>182</u>	<u>313</u>

CAV: Clona de alta virulencia

No CAV: No clona de alta virulencia