



112387

1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE MEDICINA

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

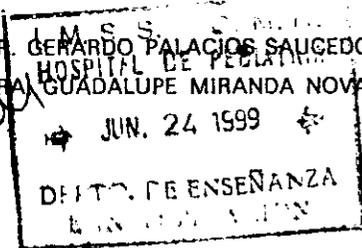
**"IDENTIFICACION DE LA CLONA DE ALTA VIRULENCIA
(CAV) DE ESTREPTOCOCCO DEL GRUPO B EN UNA MUESTRA
DE CEPAS MEXICANAS A TRAVES DEL ANALISIS DEL
POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS
DE RESTRICCION DEL DNA (RFLP) COMO UN METODO
ALTERNATIVO"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INFECTOLOGIA PEDIATRICA
P R E S E N T A :
DRA. ADRIANA CAJERO AVELAR



MEXICO, D. F.

TUTORES: DR. GERARDO PALACIOS SAUGEDO
HOSPITAL DE PEDIATRIA
DRA. GUADALUPE MIRANDA NOVALES



1999



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS:

Hay momentos en que me pregunte ¿qué sigue?, una duda muy sencilla y a la vez difícil de contestar, pero un aliento de amor a la vida siempre has sido tú que has guiado mis pasos por el camino de la sabiduría, justicia y de la verdad.. DIOS gracias de todo corazón porque siempre has estado a mi lado.

A mis padres J. de Jesús y Alicia por su cariño, apoyo y enseñanzas constantes. Gracias por TODO. Conforme he crecido han estado siempre conmigo, por lo que espero se sientan orgullosos de ver mi desarrollo como ser humano y en mi vida profesional, como lo estoy yo de ustedes.

A mis hermanos: Jesús, Hector, Aicia, Enrique, Gabriela y Emmanuel por su cariño y ayuda incondicional en todo momento.

A mis tios Luis y Gloria, y a mis primos por ser un respaldo muy importante en mi carrera, MIL GRACIAS. Nunca les podre agradecer lo suficiente.

Y aún cuando es muy difícil encontrar un apoyo desinteresado y cálido que en momentos claves se hace presente de una manera casi intangible y a la vez fuerte, pero del cual siempre estuve segura y no necesite verlo porque siempre lo senti, a ustedes mis amigos: Azucena, América, Eric y Gustavo.

Mi enorme gratitud a todo el personal del Laboratorio de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, de este hospital, en especial al M en C. Gerardo González, Dr. Javier Torres y a la química Carmen Fuentes por brindarme su amistad y por el apoyo recibido.

A mis pacientes: LOS NIÑOS, esas pequeñas cabecitas, que entre llantos y sonrisas me dieron fuerzas y fueron parte vital en mi enseñanza, y por los cuales estoy aquí. Gracias por ser un motivo tan importante en mi vida.

A mis maestros de Infectología por ser partícipes de mi formación profesional, en especial al Dr. Gerardo Palacios y Dr. Fortino Solórzano, por estar en todo momento al pendiente de la realización del presente trabajo.

RESUMEN

IDENTIFICACION DE LA CLONA DE ALTA VIRULENCIA (CAV) DE ESTREPTOCOCO DEL GRUPO B EN UNA MUESTRA DE CEPAS MEXICANAS A TRAVES DEL ANALISIS DEL POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCION DEL DNA (RFLP) COMO UN METODO ALTERNATIVO.

INTRODUCCION. Estreptococo del grupo B (EGB) es la causa más común de sepsis y meningitis neonatal en los Estados Unidos y otros países desarrollados. En México EGB ha sido considerado como una causa poco común de infecciones perinatales, sin embargo estudios recientes encontraron una tasa de colonización del 10.3% en mujeres embarazadas mexicanas y una tasa de infección neonatal de 1/1,500 recién nacidos vivos, con una letalidad mayor a la reportada en Estados Unidos.

Musser y colaboradores mediante electroforesis de multilocus enzimático de cepas de EGB, encontraron que cepas del tipo capsular III pertenecían a dos líneas filogenéticamente diferentes, las cuales diferían en su potencial patogénico. Debido a que la mayoría de las cepas de la división filogenética I habían sido obtenidas de casos de enfermedad invasiva, esta clona fue propuesta como de alta virulencia (CAV). Estudios posteriores encontraron que esta CAV presentaba varias características fenotípicas relacionadas con una virulencia elevada. Una característica única de esta clona es su incapacidad para crecer a 40°C en un medio químicamente definido, esta característica se debe a una fructuosa-1,6-bifosfato aldolasa (fba) mutante, cuyo gen ha sido aislado y clonado, y usado como sonda para identificar la CAV de EGB por RFLP.

OBJETIVO. Identificar la CAV de EGB en una muestra de cepas mexicanas a través de RFLP utilizando el gen de fba como sonda de hibridación.

METODOS. Cincuenta y siete cepas aisladas en México de EGB fueron inicialmente serotipificadas por extracción ácida caliente, extracción enzimática y precipitación en tubo capilar. Estas cepas fueron posteriormente clasificadas por análisis del RFLP utilizando como sonda de hibridación el fragmento de 3.5 kb conteniendo al gen fba. Se utilizaron como control CAV y No CAV las cepas 110 y 181 respectivamente, las cuales fueron previamente clasificadas a través de electroforesis de multilocus enzimático, RFLP y sus características de crecimiento a 40°C.

RESULTADOS. De las 57 cepas, 14 se obtuvieron de casos de enfermedad. En estas el serotipo III fue el más frecuente. Cuarenta y tres cepas (75.4%) fueron obtenidas de portadores, siendo el serotipo I el más frecuente (48.8%) en este grupo. Dos patrones de restricción fueron identificados. De las 14 cepas de enfermedad invasiva, tres del serotipo III tuvieron el patrón de RFLP de la CAV. Las once cepas aisladas de enfermedad invasiva restantes y todas las cepas de portador tuvieron el patrón de RFLP del control No CAV.

CONCLUSION. Tres cepas de EGB del serotipo III obtenidas de casos con enfermedad invasiva fueron clasificadas como CAV por su patrón de RFLP. Estas cepas corresponden a las tres previamente clasificadas como CAV por su incapacidad para crecer a 40°C. Los resultados de este estudio muestran una dicotomía filogenética entre cepas de EGB del serotipo III, como previamente ha sido reportado. Además, sostienen la existencia de la CAV y sugieren una baja prevalencia de la misma en México. El análisis de RFLP constituye un método alternativo que permite la identificación de la CAV de EGB.

ABSTRACT.

Identification of the High-Virulence Clone (HVC) of Group B Streptococci in Mexican Isolates by Analysis of DNA Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) as an alternative method.

INTRODUCTION. GBS (group B Streptococci) are the most common cause of neonatal invasive disease in the United States and other developed countries. Even though GBS are considered an uncommon cause of perinatal infections in Mexico, recent studies found vaginal colonization rates of 10% in pregnant women, and a neonatal infection rate of 1/1500 live births with a high case-fatality rate. Musser et al. by multi-locus enzyme electrophoresis of American isolates of GBS found that strains synthesizing type III polysaccharide belonged to two distantly related evolutionary lineages, with a different pathogenic potential. The phylogenetic division I, with a high degree of virulence, was responsible for most of the morbidity and mortality caused by type III GBS isolates, and was proposed to be an HVC of GBS. Other unique characteristic of the HVC was its inability to grow at 40°C in a chemically defined medium. This characteristic is due to a mutant high-temperature-sensitive fructose-1,6-biphosphate aldolase (*fb*a). The gene of this enzyme has been cloned and used as a probe in RFLP experiments. The inability to growth at 40°C of this clone and the probe containing *fb*a have been used as highly specific and sensitive markers to identify the HVC of GBS.

OBJECTIVE. Identify the HVC of GBS in a sample of Mexican isolates by RFLP.

METHODS. 57 Mexican GBS isolates were studied. Strains were serotyped by the capillary precipitin method using antigenic extracts prepared by the hot-HCl and an enzymatic procedure. All isolates were classified then by RFLP analysis. Serotype III strains 110 (HVC) and 181 (Not HVC) were used as controls. These isolates were previously classified by multi-locus enzyme electrophoresis, RFLP, and their growth characteristics at 40°C.

RESULTS. Fourteen strains (24.6%) were isolated from invasive disease cases, most of them were type III (64.3%). 43 isolates (75.4%) were from asymptomatic carriers, most were serotype I. Two RFLP patterns were identified. Three serotype III invasive strains had an identical RFLP pattern to that of the HVC. The other 11 invasive isolates and all the carrier ones had the RFLP pattern of the Non-HVC control.

CONCLUSIONS. Three isolates of GBS were classified as HVC by RFLP. The growth of these isolates was inhibited at 40°C in previous experiments. Our results demonstrate a phylogenetic dicotomy among type III isolates, as previously reported, and support the presence of the HVC in Mexico, but at a low prevalence. RFLP analysis is an alternative method to identification of the HVC of GBS.

ANTECEDENTES CIENTIFICOS.

Estreptococo del grupo B de Lancefield (EGB) es un diplococo facultativo grampositivo. En placas de agar sangre crece de manera característica como colonias grises planas, más o menos grandes, rodeadas por una zona estrecha beta-hemolítica de moderada intensidad. Algunas cepas humanas son no hemolíticas (menos del 1%) (1-4). EGB es fácilmente cultivado en diversos medios bacteriológicos y su aislamiento de ciertos sitios corporales puede ser mejorado al utilizar medios de cultivo líquidos suplementados con antibióticos. Aunque la identificación definitiva de EGB requiere la detección mediante pruebas serológicas del antígeno específico de grupo, varias pruebas de laboratorio han sido empleadas para su identificación presuntiva, como lo son la hidrólisis del hipurato de sodio, la incapacidad para hidrolizar bilis-esculina, la producción de pigmento durante su crecimiento anaerobio en ciertos medios y la prueba de CAMP. Esta última se basa en la producción del factor CAMP, una proteína termoestable extracelular, que, en la presencia de betalisisina de *Staphylococcus aureus* produce una hemólisis ampliada sobre la placa de agar sangre (4-5).

Aunque conocido desde su descripción por Nocard en 1880, EGB es reconocido como una causa de infecciones graves en la mujer embarazada y el recién nacido hasta mediados de este siglo. En el recién nacido dos entidades clínicas causadas por EGB han sido reconocidas: enfermedad de inicio temprano y enfermedad de inicio tardío. La enfermedad neonatal de inicio temprano ocurre en los primeros 5 a 7 días de vida, se presenta generalmente

con sepsis y neumonía, y es causada por cualquiera de los serotipos de EGB, con una letalidad del 55%. En cambio, en la enfermedad neonatal tardía los síntomas ocurren después de los 7 días de vida, la patología predominante es meningitis (85%), y predomina el serotipo III en más del 90% de los casos, con una letalidad del 23% (3, 6).

EGB coloniza recto y vagina de mujeres embarazadas, usualmente sin consecuencias clínicas para el neonato. Debido a que algunos individuos desarrollan enfermedad y otros permanecen asintomáticos, se ha sugerido que el estado inmunológico del recién nacido juega un papel importante. Sin embargo, varios estudios han sugerido que diferencias en la virulencia entre aislados de EGB pueden contribuir también al desarrollo de enfermedad. EGB elabora varios productos que han sido identificados como factores de virulencia, incluyendo entre estos hialuronidasa, nucleasa, proteasa, y ácido lipoteicoico (1, 7). No obstante, el antígeno polisacárido capsular específico de tipo, es el principal determinante de la virulencia de EGB, sobre todo el del serotipo III (7-8). Estudios recientes sugieren que el ácido siálico de la cápsula bacteriana es un mecanismo por medio del cual EGB tipo III puede inhibir la vía alterna del complemento (8, 9). El antígeno de tipo es un polisacárido capsular ligado al peptidoglicano de la pared celular, este compuesto de glucosa, galactosa, n- acetilglucosamina y ácido siálico, el cual constituye aproximadamente el 25% del antígeno tipo específico y es el principal inmunodeterminante de este antígeno (10).

Musser y colaboradores, mediante electroforesis de multilocus enzimático, encontraron que cepas de EGB sintetizadoras de polisacárido del tipo III provenían de dos líneas evolutivas distantes, con diferencia en su potencial

patogénico. La división filogenética I, con un elevado grado de virulencia y causante de una mayor morbi-mortalidad fue propuesta como CAV (11). Mattingly y col. y Palacios y col. identificaron la CAV a través de su incapacidad para crecer a 40°C en un medio químicamente definido (12-14). Esta última característica se debe a una enzima mutante - fructosa-1,6-bifosfato aldolasa- sensible a altas temperaturas. Esta característica ha sido usada como un marcador altamente sensible y específico para identificar a la CAV de EGB.

Aunque la serotipificación es el método tradicional para la clasificación de cepas de EGB, su poder de discriminación es bajo. Puesto que el serotipo III es el más frecuentemente aislado de casos de enfermedad, es aislado también en portadores, y otros serotipos causan enfermedad tanto en el recién nacido como en la mujer embarazada. Así, otros métodos alternativos han sido propuestos para la clasificación de aislados de EGB a nivel de subespecie. Recientemente las técnicas de electroforesis de multilocus enzimático, de digestión con endonucleasas de restricción de DNA genómico, de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del DNA y la electroforesis de campos pulsados han sido empleadas para la subtipificación molecular de EGB y correlacionar genotipos particulares con enfermedad (5, 15, 16). La selección de la enzima de restricción es fundamental en cuanto al poder de discriminación en el análisis de los patrones de restricción. Estudios previos encontraron que HhaI proporcionaba el mejor poder de discriminación entre 24 enzimas de restricción estudiadas en aislados de EGB, permitiendo la detección de diferencias entre cepas que no fueron vistas con otras endonucleasas (15), debido a que con HhaI se obtuvo menor número de

fragmentos de restricción y fragmentos de mayor peso molecular.

Con base en lo anterior, el objetivo del estudio fue identificar la clona de alta virulencia de EGB en una muestra de cepas aisladas en México a través del análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del DNA (RFLP) como un método alternativo que permite identificar a la CAV de EGB.

MATERIAL Y METODOS

Aislados bacterianos. Cincuenta y siete cepas de EGB obtenidas en México fueron estudiadas, 43 de niños y adultos portadores asintomáticos y 14 de niños y mujeres con enfermedad invasiva (sepsis, meningitis, neumonía, endometritis y absceso). Todas las cepas fueron inicialmente identificadas como EGB a través de los métodos bacteriológicos convencionales (tinción de gram, catalasa, hidrólisis de hipurato de sodio, hidrólisis de bilis-esculina negativa y prueba de CAMP positiva) y aglutinación de látex.

Medios de crecimiento. Todas las cepas fueron crecidas en caldo de Todd-Hewitt (Difco^R) y almacenadas en dicho medio a -70°C . Estos cultivos fueron descongelados y sembrados en placa de agar sangre de carnero e incubados a 37°C durante la noche antes de su uso.

Serotipificación de aislados. Las cepas fueron serotipificadas por el método de precipitación en tubo capilar con extractos antigénicos preparados de células completas por el método de extracción ácida caliente descrito por Lancefield previamente (17). Las cepas clasificadas como no tipificables por el método anterior pudieron ser tipificados mediante un procedimiento alternativo de extracción enzimática con N-acetylmuramidasa (mutanolisina) descrito previamente (10). Se emplearon antisueros hiperinmunes preparados en conejo a partir de las cepas de referencia Ia (090), Ib (H36B), II (18RS21)

y III (D136C).

Análisis del Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción del DNA:

A) Preparación de la sonda de hibridación:

1. Procedimiento para aislar el plásmido recombinante pKE1 de la cepa mutante de *E. coli* NP315.

Se siguió el protocolo del equipo comercial "Plasmid Purification" (QIAGEN[®]). Para preparar la sonda de hibridación, el plásmido pKE1 previamente clonado con el fragmento de DNA conteniendo el gen de aldolasa fue aislado de la cepa de *E. coli* NP315, la cual es mutante para este gen e incapaz para crecer a 40°C (18). Esta cepa NP315 fue inicialmente aislada a 37°C por 18 horas en medio 2X YT con agar al 1.5% adicionado con 50 ug/ml de Espectinomicina (un gen de resistencia a espectinomicina es el marcador de pKE1). Una colonia aislada de NP315 fue inoculada en 500 ml de medio 2X YT conteniendo 50 ug/ml de Espectinomicina e incubada a 37°C en agitación durante la noche. Un total de 300 ml de cultivo fue obtenido. Después de centrifugar a 8K por 15 minutos a 4°C, los paquetes celulares fueron lavados con 100 ml de TES (Tris 100 mM, EDTA 10 mM, NaCl 1 mM) y centrifugados nuevamente a 8K por 10 minutos a 4°C. Los paquetes fueron resuspendidos en 20 ml de buffer compuesto por Tris-HCl 50 mM, pH8.0, EDTA10 mM, y 100 ug/ml de Rnasa A. Se adicionaron 20 ml de buffer de lisis y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 20 ml de acetato de potasio 3M pH 7.5 y se incubó en hielo durante 30 minutos. Después de centrifugar a 20K por 30 minutos a 4°C, el sobrenadante fue nuevamente

centrifugado a 20K por 15 minutos a 4°C, y el DNA fue precipitado al agregar 0.7 volúmenes de isopropanol. La mezcla anterior fue centrifugada a 15K por 30 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante. El botón de DNA fue resuspendido en 500 ul de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) pH 7.0 y se agregó buffer de equilibrio para obtener un volumen final de 5 ml. La columna conteniendo la resina de intercambio aniónico fue equilibrada con 4 ml de buffer de equilibrio. Posteriormente la mezcla conteniendo el DNA fue vaciada en el interior de dicha columna permitiendo su entrada a la resina por flujo de gravedad. Se realizó el lavado de la columna en dos ocasiones y se agregaron 5ml de buffer de elución. Luego 0.7 volúmenes de isopropanol fueron adicionados al DNA eluido para la precipitación del mismo. Posteriormente se centrifugó a 15K por 30 minutos a 4°C. El paquete conteniendo el DNA fue lavado con etanol al 70% y centrifugado a 15K por 10 minutos. Una vez que el botón de DNA se secó a temperatura ambiente por 5-10 minutos, fue resuspendido en 1000 ul de TE, pH 8.0 (19).

2. Digestión del plásmido recombinante pKE1 y electroforesis de los fragmentos de restricción del plásmido.

El plásmido pKE1 extraído fue entonces digerido con EcoRI y PstI y los fragmentos digeridos fueron separados por electroforesis.

3. Elución del gel de electroforesis del fragmento de 3.5 kb conteniendo el gen de aldolasa.

El fragmento de DNA conteniendo el gen de aldolasa fue eluido del gel siguiendo el protocolo del equipo comercial "Agarose gel DNA extraction kit" (Boehringer Mannheim^R).

4. Síntesis de la sonda de hibridación y procedimiento de marcaje con digoxigenina:

Una vez cluido, 1 ug de DNA fue redissuelto en agua y desnaturalizado en "baño María" a 100°C durante 10 minutos y enfriado en hielo. El DNA desnaturalizado fue incubado con 4 ul de dUTP marcado con digoxigenina (DIG high prime DNA labeling and detection starter kit II, Boehringer-Mannheim^R) durante 20 horas a 37°C. La reacción de marcaje fue detenida al agregar 2 ul de EDTA 0.2M, pH 8.0.

B) Procedimiento CTAB (Cetyl trimethyl bromuro de amonio) para el aislamiento del DNA cromosómico de los aislados en estudio:

1. Aislamiento de cepas en placas de agar sangre.

En cada experimento se usaron colonias frescas aisladas en placas de agar sangre de carnero al 5% incubadas a 37°C durante la noche. Una colonia aislada fue crecida en 10 ml de caldo Todd-Hewitt (Difco^R) (THB) a 37°C durante la noche. Cinco a 10 ml de este cultivo inicial fueron transferidos a 100 ml de THB adicionado con 1 ml de glucosa 1 M y 2 ml de Treonina 0.5 M precalentado durante la noche. La densidad óptica inicial a una absorbancia de 660 nm fue de 0.05 - 0.10. En "baño María" a 37°C se siguió el crecimiento hasta alcanzar una densidad óptica de 0.50 unidades. Los botones celulares lavados con 50 ml de NaPO₄ 10Mm, y fueron incubados con lisozima y *N*-acetilmuramidasa (mutanolisina) a 37°C durante 1 hora. Los botones celulares digeridos fueron incubados con proteínasa K. Posteriormente incubados a 65°C por 20 minutos adicionando 1.8 ml de NaCl 5M y 1.5 ml de una solución de CTAB/NaCl (CTAB 10%, NaCl 0.7 M). Un paso de extracción gentil fue seguido a la adición de un volumen

igual de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1 v:v). Después de centrifugación a 6K durante 10 minutos, el sobrenadante acuoso fue recuperado. El DNA fue precipitado por la adición y mezcla de un volumen igual de isopropanol. Después de ser transferido a 5 ml de etanol al 70%, el DNA fue centrifugado y secado al medio ambiente. El botón de DNA se resuspendió en 4 ml de TES (25,5,250) por agitación durante la noche. La suspensión de DNA fue incubada con RNAasa a una concentración final de 0.2 mg/ml por 1 hora a 37°C. El DNA fue nuevamente precipitado con etanol y finalmente disuelto en 1 ml de TE (10,1). La concentración de DNA en la suspensión fue medida por espectrofotometría.

C) Análisis del Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción del DNA.

1. Digestión del DNA genómico.

El DNA fue digerido por separado con 10 U/ml de HhaI y EcoRI (Boehringer Mannheim^R) durante 1 hora a 37°C en "baño María". Los fragmentos de DNA fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Después de su desnaturalización el DNA fue transferido a una membrana de nylon por el procedimiento Southern. Después de su desnaturalización la sonda fue adicionada al buffer de hibridación precalentado a 65°C (5-25 ng/ml). La membrana conteniendo el DNA digerido fue incubada durante la noche a 65°C con 2.5 ml por cada 100 cm² de membrana del buffer de hibridación conteniendo la sonda. La membrana fue posteriormente lavada con SSC 2X, SDS 0.1% y SSC 0.5%, SDS 0.1% por 5 y 15 minutos a temperatura ambiente y 68°C respectivamente bajo agitación constante. Las sondas hibridadas fueron detectadas utilizando

fragmentos Fab antidigoxigenina conjugados a fosfatasa alcalina y visualizadas utilizando el sustrato quimioluminiscente CSPD (dioxetano) por autoradiografía.

2. Identificación de aislados CAV por su patrón de RFLP. El patrón de RFLP de los aislados de EGB en estudio fue comparado. Las cepas 110 (CAV) y 181 (No CAV) fueron usadas como controles (la cepa 110, serotipo III aislada de un neonato con meningitis y representativa de la CAV [división I de Musser]; la cepa 181 también serotipo III aislada de portador y representativa de la división II de Musser [11]). Los aislados con un patrón de RFLP idéntico al del control 110 fueron considerados como CAV.

RESULTADOS

Distribución de serotipos. De las 57 cepas Mexicanas de EGB evaluadas, 25 (43.9%) fueron del serotipo I, seguido por el III (33.3%). Cinco cepas fueron no tipificables (NT). Catorce cepas (24.6%) correspondieron a casos de enfermedad, de estas el serotipo III fue el más frecuente (64.3%), seguido por el I (28.6%) y en menor porcentaje el II (7.1%). Cuarenta y tres cepas (75.4%) correspondieron a casos de portador, con la siguiente distribución de serotipos: I (48.8%), III (23.3%), II (16.3%), y NT (11.6%) (Tabla 1).

Análisis del patrón de RFLP. Después de la digestión del DNA con HhaI y EcoRI y de hibridación con la sonda fba (sonda conteniendo el gen de aldolasa), los aislados de enfermedad invasiva mostraron dos patrones de restricción diferentes. Tres aislados invasivos del serotipo III (aislados 49, 59 y 62) tuvieron un patrón de restricción idéntico al de la cepa control 110 (serotipo III aislado de un niño con meningitis, y representativo de la CAV de la división I de Musser). Las otras once cepas de enfermedad invasiva, así como todas las cepas de portadores mostraron un patrón de RFLP idéntico al de la cepa control 181 (serotipo III aislado de portador, y representativo de la división II de Musser) (Fig. 1).

La figura 1 muestra el patrón de RFLP de algunos de las cepas estudiadas. El patrón de RFLP de las cepas 35, 43, 45 y 47 (estado de portador), y el de las cepas 56, 57, 60 y 61 (casos de enfermedad invasiva), fue idéntico al de la cepa 181 (control No CAV); en tanto que las cepas 49, 59 y 62

correspondientes al serotipo III y que fueron obtenidas de casos de enfermedad invasiva, mostraron un patrón idéntico al del aislado 110 (control CAV).

Las tres cepas identificadas como CAV por su patrón de RFLP en el presente estudio, corresponden a las tres cepas identificadas como CAV por su incapacidad para crecer a 40°C en un estudio previo (12). En dicho estudio las otras once cepas de enfermedad invasiva y todos las cepas de portadores presentaron una curva de crecimiento similar a la del control No CAV (no afectada por el incremento a 40°C en la temperatura de crecimiento). Los resultados de dicho estudio corresponden a los encontrados en el presente, ya que un solo patrón de restricción fue identificado en los aislados de portador, los cuales pudieron ser distinguidos de aislados CAV a través de dicho patrón; con una concordancia perfecta con el método de inhibición del crecimiento a 40°C.

En diez de los once pacientes cuyas cepas fueron obtenidas de enfermedad invasiva y que fueron clasificadas como No CAV por su patrón de RFLP, se encontró al menos un factor de alto riesgo perinatal, los cuales incrementan la susceptibilidad del huésped a la infección, tales como prematuridad (6/11), hipoxia fetal (6/11), infección materna o fiebre periparto (6/11), infección intraamniótica (4/11), ruptura prematura de membranas (3/11), o parto distócico (2/11). En cambio, en solo una de las tres cepas invasivas clasificadas como CAV por RFLP hubo un factor único de riesgo (parto prematuro).

DISCUSION.

Estreptococo del grupo B (EGB) es la causa más común de sepsis neonatal en países desarrollados, donde el serotipo III es el más frecuente. En cambio, en México el serotipo predominante es el Ia y Ia/c, con un bajo porcentaje del serotipo III y una elevada frecuencia de aislados no tipificables (NT). La aparente baja incidencia de enfermedad invasiva neonatal por EGB en México se había atribuido a esta distribución de serotipos. Sin embargo, un estudio reciente demostró que la mayoría de cepas NT son pobres productoras de antígeno específico de tipo, el cual no puede ser detectado por los métodos de serotipificación estándar. Así, la utilización de métodos que permiten la purificación y una mayor concentración de dicho antígeno, permite clasificar serologicamente a aislados que son NT por el método tradicional de precipitación en tubo capilar utilizando extractos ácidos calientes (10). Los resultados de dicho estudio sugieren una mayor participación del serotipo III en México a lo que previamente se había reportado. En el presente estudio, el serotipo más frecuente entre las cepas de casos con enfermedad invasiva fue el tipo III (64.3%); en tanto que el serotipo más frecuente en casos de portador fue el I (48.8%). Aunque el serotipo III es el más frecuentemente asociado con enfermedad invasiva, es también aislado en estado de portador y, además, otros serotipos son también aislados de casos de enfermedad. Debido a lo anterior, varios métodos de biología molecular han sido usados para subtipificar cepas de EGB y evaluar su asociación con el desarrollo de enfermedad (11, 20-26).

Ellis y colaboradores examinaron aislamientos de EGB por aglutinación en látex y análisis con endonucleasas de restricción (AER). Los fragmentos obtenidos fueron separados por electroforesis por campos pulsados. En uno de los hospitales incluidos, un hospital de obstetricia, la mayoría de los aislados fueron obtenidos de casos de infección neonatal, fueron del serotipo III y presentaban un patrón electroforético predominante. Además, el análisis de los patrones de restricción de los pares de aislados madre-hijo mostró patrones comunes. Los resultados de ese estudio demostraron la transmisión horizontal de EGB y sugieren que un número limitado de clonas del serotipo III tienen un potencial patogénico incrementado (27).

Varios estudios de genética poblacional han intentado identificar una clona de alta virulencia en varias colecciones de cepas de EGB obtenidas de diferentes países. A través de análisis con endonucleasas de restricción de DNA cromosomal y ribotipificación, Blumberg y col. (15) clasificaron 76 aislados de EGB encontrando 4 ribotipos entre las cepas invasivas del serotipo III. Esto sugería heterogeneidad genética en la muestra y propusieron que dichos aislados podían no pertenecer a una clona única. Sin embargo, en un estudio de 118 cepas obtenidas en Dinamarca (28), y en otro de 276 aisladas de Francia (29), la evaluación de los genotipos cromosomales por electroforesis de multilocus enzimático, demostró una dicotomía filogenética dentro del serotipo III. En el análisis dendrográfico de estas cepas dos divisiones filogenéticas primarias fueron encontradas. Aunque las dos divisiones incluían aislados del serotipo III, una de ellas contenía casi todas las cepas invasivas, en cambio la otra incluía exclusivamente cepas obtenida de mujeres embarazadas sanas. Por otro lado, a pesar de que los aislados del serotipo III

mostraron la mayor diversidad genética, la mayoría de dichas cepas quedaron agrupadas en un número limitado de tipos electroforéticos. Estos resultados sostenían la estructura clonal de las poblaciones de EGB estudiadas y la existencia de diferencias entre clonas. Además, estos autores demostraron la existencia de un número ilimitado de "clonas de portador" del serotipo III y otros serotipos, y un número restringido de clonas que causan infección invasiva y que parecen ser de distribución mundial. Sin embargo, más recientemente Hauge y col. (26) evaluaron 23 características genéticas y fenotípicas (incluyendo los 11 loci metabólicos que Musser estudió), en la colección de cepas danesas de Helmig, incluyendo 6 cepas norteamericanas del estudio de Musser, seis divisiones filogenéticas mayores y una correlación fuerte entre las diferentes características evaluadas fueron identificadas, lo cual sugería una estructura clonal de la población. Además, como Musser y Helmig, Hauge encontró que las cepas que expresaban el polisacárido de tipo III pertenecían a dos linajes evolutivos distantes de clonas. No obstante, Hauge y col. no encontraron diferencias en el potencial patogénico entre estas divisiones. Sin embargo, cabe señalar que el número de cepas evaluadas fue pequeño comparado con el número de variables que ellos analizaron y, por otro lado, no controlaron los factores de alto riesgo perinatal que pudieron haber incrementado el potencial patogénico de tales aislamientos. De esta manera, a pesar de los estudios anteriores la relación entre infección y la estructura genética de las poblaciones de EGB continúa sin ser aclarada.

En el presente estudio se realizó el análisis de RFLP de una muestra seleccionada de cepas aisladas en México. La sonda utilizada para hibridación en dichos experimentos fue preparada con el gen que codifica para la enzima

fructuosa-1,6-bifosfato aldolasa, la cual es la responsable de la incapacidad para crecer a 40°C en la CAV y parece ser una característica única de esta clona (13-14). Aunque dicho gen solo corresponde a un marcador genético y no está relacionado con factores de virulencia, tanto la incapacidad para crecer a 40°C como la sonda conteniendo este gen de aldolasa han sido utilizados como marcadores altamente sensibles y específicos para identificar aislados pertenecientes a la CAV (División filogenética I de Musser) (12-13). El patrón de RFLP de 57 cepas de EGB obtenidas en México fue comparado con el patrón de la cepas 110 (CAV) y 181 (No CAV) usadas como controles. Del total de aislamientos, 43 fueron obtenidos de niños o adultos portadores asintomáticos, y 14 de niños o mujeres con enfermedad invasiva (sepsis, meningitis, neumonía, endometritis y absceso).

El patrón de RFLP de tres de las 14 cepas de enfermedad invasiva fue idéntico al patrón de la cepa control 110, por lo que fue clasificado como CAV. Estos tres fueron del serotipo III. El patrón de los once restantes y el de todos las cepas de portadores correspondió al patrón de la cepa control No CAV. Así, dos patrones de restricción fueron identificados en la muestra estudiada; uno de estos patrones exclusivo de cepas del serotipo III CAV. Este resultado es consistente con la dicotomía filogenética previamente reportada para aislados de dicho serotipo (11). Además, los resultados del presente estudio concuerdan con los obtenidos en un estudio previo, en el que la misma muestra de aislados fue evaluada a través de experimentos de cambio en la temperatura de crecimiento. Las tres cepas que fueron identificadas como CAV por RFLP en el presente estudio, corresponden a las tres cepas clasificadas como CAV por su inhibición para crecer a 40°C (12). Aunque esta

concordancia era esperada, ya que el gen utilizado para preparar la sonda de hibridación corresponde al gen que codifica para la aldolasa responsable de la incapacidad para crecer a dicha temperatura, el hallazgo de dicha inhibición y de un patrón de restricción único idénticos a los de la cepa 110 utilizada como control CAV, sugieren que dichas cepas pertenecen a la división filogenética I de Musser y col. (11).

Como en el estudio de Palacios y col. (12), un número significativo de casos de enfermedad (11/14) fueron causados por cepas no clasificadas como CAV por RFLP. Ya que la mayoría de los casos de enfermedad causados por cepas que no pertenecen a la CAV tuvieron factores de alto riesgo perinatal, es probable que dichos factores hayan incrementado el potencial patogénico de aislados que son de baja virulencia. Factores como parto prematuro, ruptura prematura de las membranas fetales, hipoxia fetal y parto distócico, pueden incrementar el potencial invasivo de microorganismos saprofiticos que colonizan el canal del parto. Esto puede ser debido a la ruptura de las barreras mucosas en contra de la infección, al incremento del inóculo bacteriano o a una depresión en la respuesta inmune del huésped. La mayoría de los casos de nuestro estudio tuvieron este tipo de factores de riesgo. Por otro lado, el hecho de que las tres cepas clasificadas como CAV, tanto por su incapacidad para crecer a 40°C como por su patrón de RFLP, fueron obtenidos de casos de enfermedad invasiva y no tuvieron factores de alto riesgo perinatal significativos, sugiere que dichos aislados son de alta virulencia.

Los resultados del presente estudio confirman la existencia de la CAV en México y sugieren que una baja prevalencia de la misma podría ser la responsable de la baja incidencia de enfermedad neonatal debida a EGB en

este país. Además, también sugieren que un número importante de casos de enfermedad son causados por aislados No CAV, probablemente debido a la participación de otros factores de alto riesgo perinatal. Además, muestran que el análisis de RFLP constituye un método alternativo para la evaluación de la relación genética y la diversidad de los aislados dentro de un serotipo y/o diferentes serotipos de EGB, y que este método tiene un valor potencial para el estudio de la epidemiología de EGB.

CONCLUSIONES.

En casos de enfermedad invasiva el serotipo predominante fue el III, lo cual concuerda a lo reportado en países desarrollados. En el presente estudio dos patrones de restricción fueron observados para el serotipo III, lo cual es consistente con la dicotomía filogenética reportada previamente por Musser, donde aislados correspondientes a la división filogenética I presentan un elevado grado de virulencia y son los causantes de una mayor morbi-morbilidad. Por otra parte un número significativo de casos de enfermedad invasiva fueron causados por cepas clasificadas como No CAV, por lo que es probable la participación de factores de riesgo adicionales que incrementan la susceptibilidad del huésped para el desarrollo de enfermedad.

El análisis de RFLP constituye un método alternativo para identificar la CAV de EGB, con una concordancia perfecta con el método de inhibición del crecimiento a 40°C. Por lo que RFLP tiene un valor potencial en estudios epidemiológicos de la enfermedad perinatal causada por EGBG.

BIBLIOGRAFIA.

1. Baker CJ, Edwards MS. Group B streptococcal infections. In: Remington JS, Klein JO, ed. Infectious diseases of fetus and newborn infant. 4^a. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995:980-1054.
2. Roe MH, Todd JK, Favara BE. Non-hemolytic group B streptococcal infections. *J Pediatr* 1976;89:75-97.
3. Anthony BF. Group B streptococcal infections. In: Feigin RD, Cherry JD, ed. Textbook of pediatric infectious diseases. 3^a. Ed. Vol II. Philadelphia: W.B. Saunder, 1992:1305-1316.
4. Solórzano SF, Echaniz AG, Calderón JE, Conde GC, Castellanos CR. Identificación rápida del estreptococo del grupo B. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1987;44:344-348.
5. Mason EO, Wong P, Barrett FF. Evaluation of four methods for detection of group B streptococcal colonization. *J Clin Microbiol* 1976;4:429-431.
6. Baker JC, Barrett FF. Group B streptococcal infections in infants. *JAMA* 1974;230:1158-1160.
7. Shigeoka OA, Rote SN, Santos IJ, Hill RH. Assessment of the virulence factors of group B Streptococci: correlation with sialic acid content. *J Infect Dis* 1983;147:857-863.
8. Doran IT, Mattingly JS. Association of type- and group-specific antigens with the cell wall of serotype III group B *Streptococcus*. *Infect Immun* 1982;36:1115-1122.

9. Martin RT, Ruzinski TJ, Rubens EC, Chi YE, Wilson BC. The effect of type-specific polysaccharide capsule on the clearance of group B streptococci from the lungs of infant and adult rats. *J Infect Dis* 1992;165:306-314.
10. Palacios SG, Eskew EK, Solórzano SF, Mattingly SJ. Decreased capacity for type specific antigen synthesis accounts for high prevalence for nontypeable strains of group B streptococci in Mexico. *J Clin Microbiol* 1997;35:2923-2926.
11. Musser MJ, Mattingly JS, Quentin R, Goudeau A, Selander KR. Identification of a high-virulence clone of type III *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*) causing invasive neonatal disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:47341-4735
12. Palacios SG, Eskew KE, Solórzano SF, Mattingly JS. Identification of the high-virulence clone of group B streptococci in Mexican isolates by growth characteristics at 40°C. *Curr Microbiol* 1999;38:126-131.
13. Mattingly SJ, Maurer JJ, Eskew EK, Cox F. Identification of a high-virulence clone of serotype III *Streptococcus agalactiae* by growth characteristics at 40°C. *J Clin Microbiol* 1990;28:1676-1677.
14. Mattingly SJ, Eskew KE. Temperature sensitivity of fructose-1,6-biphosphate aldolase accounts for the inability of the high virulence clone of *Streptococcus agalactiae* to grow at 40°C. *Curr Microbiol* 1993;26:147-150.
15. Blumberg MH, Stephens SD, Licitra C, Licitra C, Pigott N, Facklam R, Swaminathan B, Wachsmuth K. 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.
16. Gordillo ME, Singh KV, Baker CJ, Murray BE. Typing of group B Streptococci: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and conventional electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1993;31:1430-1434.
 17. Lancefield RC. Serological differentiation of specific types of bovine hemolytic Streptococci (group B). *J Exp Med* 1934;61:335-349.
 18. Timmons BC, Lee LN, Eskew EK, LeBlanc DJ, Mattingly SJ. Molecular analysis of the high-virulence clone of group B *Streptococcus*. Abstracts of the annual meeting of the American society for microbiology 1994:67.
 19. Davis L, Kuehl M, Battey J. In: Plasmid construction from purified vector and insert fragments, ed. Basic methods in molecular biology. 2a ed. Ed. Appleton & Lange, 1994:277-87.
 20. Mawn JA, Simpson AJ, Hearo SR. Detection of the protein gene among group B streptococci using PCR. *J Clin Pathol* 1993;46:633-636.
 21. Kaufhold A, Podbielski A, Horaud T, Ferrieri P. Identical genes confer high-level resistance to gentamicin upon *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, and *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:1215-1218.
 22. Green PA, Singh KV, Murray BE, Baker CJ. Recurrent group B streptococcal infections in infants: clinical and microbiologic aspects. *J Pediatr* 1994;125:931-938.
 23. Tikkanen K, Hayrinen J, Peikonen S, Finne J. Immunoblot analysis of bacterial polysaccharides: application to the type-specific polysaccharides

- of *Streptococcus suis* and *Streptococcus agalactiae*. J Immunol Methods 1995;187:233-244.
24. Lachenauer CS, Madoft LC. A prospective surface protein from type V group B streptococci shares N-terminal sequence homology with the alpha C protein. Infect Immun 1996;64:4255-4260.
 25. Trager JD, Martin JM, Barbadora K, Green M, Wald FR. Probable community acquisition of group B *Streptococcus* in an infant with late-onset disease: demonstration using field inversion gel electrophoresis. Arch Pediatr Adolesc Med 1996;150:766-768.
 26. 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;64:919-925.
 27. Ellis S, Kotiw M, and Garland SM. Restriction endonuclease analysis of group B streptococcal isolates from two distinct geographical regions. J Hosp Infect 1996;33:279-287.
 28. Helmig R, Uldberg N, Boris J, Kilian M. Clonal analysis of *Streptococcus agalactiae* isolated from infants with neonatal sepsis or meningitis and their mothers and from healthy pregnant women. J Infect Dis 1993;168:904-909.
 29. Quentin R, Huet H, Wang F, Geslin P, Goudeau A, Selander RK. Characterization of *Streptococcus agalactiae* by multilocus enzyme genotype and serotype: identification of multiple virulent clone families that cause invasive neonatal disease. J Clin Microbiol.1995;33:2576-2581.

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

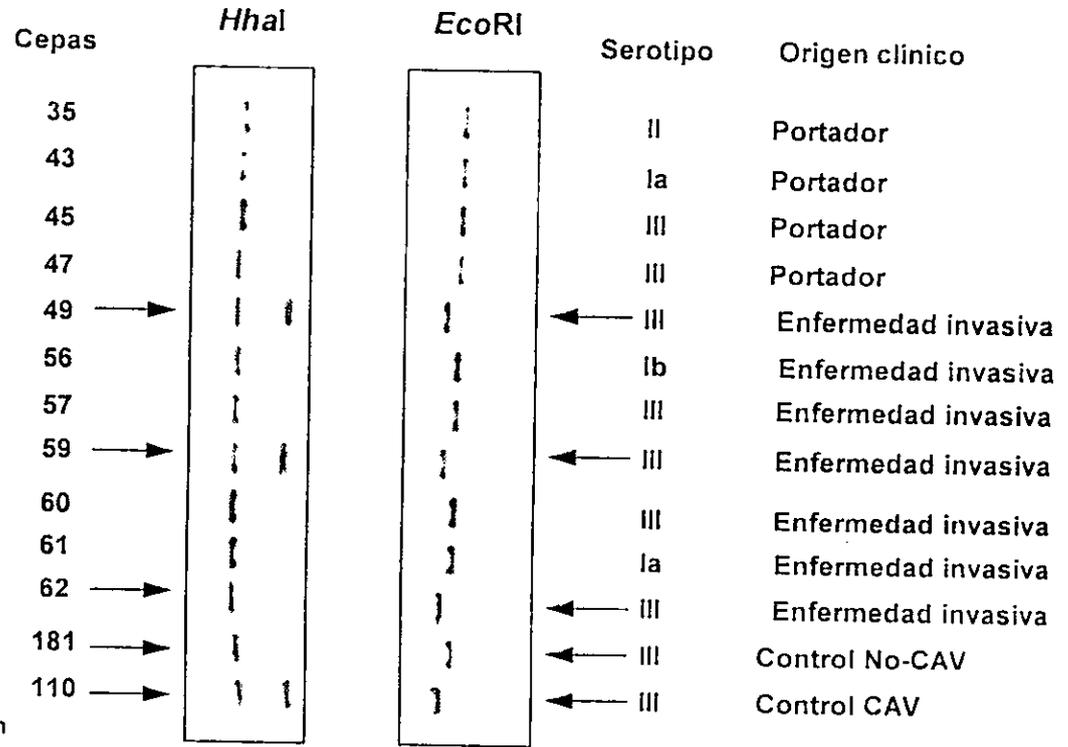
ANEXOS

TABLA 1. Distribución de serotipos de 57 cepas mexicanas de EGB.

Serotipo	Número de cepas		
	Cepas de Portador	Cepas de Enfermedad Invasiva	Total
III	10	9	19
II	7	1	8
Ia	6	2	8
Ib	8	2	10
Ic	7	0	7
NT*	5	0	5
Total	43	14	57

* No tipificable

FIGURA 1. Patrón de RFLP después de hibridación con la sonda fba* de algunas cepas Mexicanas de SGB



* Sonda conteniendo el gen de aldolasa
 CAV: Clona de alta virulencia