

11262

10



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

- 1HOSPITAL DE INFECTOLOGIA CENTRO MEDICO LA RAZA IMSS
2DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGIA. HOSPITAL DE PEDIATRIA CMN SXXI IMSS
3DEPARTAMENTO DE EPIDEMIOLOGIA CLINICA HOSPITAL DE PEDIATRIA CMN SXXI IMSS
4DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA HOSPITAL DE PEDIATRIA CMN SXXI IMSS

EVALUACION DE LA VIRULENCIA DE LA "CLONA DE ALTA VIRULENCIA" DE STREPTOCOCCUS DEL GRUPO B DEL SEROTIPO III EN UN MODELO ANIMAL DE TRANSMISION VERTICAL

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS MEDICAS
P R E S E N T A :
DRA. AMALIA ESPARZA GARCIA

2TUTOR: DR. FORTINO SOLORZANO SANTOS
2COTUTOR: DR. GERARDO PALACIOS SAUCEDO
COLABORADORES: 3DR. JUAN MANUEL MEJIA
4DR. GUILLERMO RAMON GARCIA



MEXICO, D. F.

Handwritten signature

2001



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.

## INDICE GENERAL

## Páginas

	1
I Índice general	
II Diagrama de flujo, figuras y tablas	3
III Resumen	4
Antecedentes	5
Justificación	11
Planteamiento del problema	12
Hipótesis	12
Objetivo	12
Definición de variables	13
Material y métodos	16
1. Modelo experimental, embarazo, identificación de la muestra	16
2. Preparación del inóculo bacteriano y selección de la muestra	16
a) Aislamiento y crecimiento en Todd-Hewitt	
b) Estandarización de la suspensión bacteriana	
c) Preparación del inóculo bacteriano	
d) Selección de la muestra	
3. Administración del inóculo y toma de microhemocultivos en la rata.	18
4. Extracción de las crías mediante cesárea y cultivo de los órganos.	18
5. Aislamiento e identificación de SGB	19

Tamaño de la muestra	22
Análisis de los resultados	23
Aspectos éticos	23
Resultados	24
Discusión	27
Bibliografía	40

## FLUJOGRAMA, FOTOGRAFÍAS Y TABLAS

Flujograma del estudio	Página 21
Fotografías 1 y 2	Página 39
Tabla 1. Número de hemocultivos positivos con aislamiento de SGB en 14 ratas inoculadas por vía intraperitoneal con 2ml de una suspensión bacteriana con $1.8 \times 10^9$ ufc/ml de cepas CAV y No CAV del serotipo III.	Página 32
Tabla 2. Aislamiento de SGB en el total de cultivos *realizados a las crías de las ratas inoculadas por vía intraperitoneal con 2ml de una suspensión bacteriana con $1.8 \times 10^9$ ufc/ml de cepas CAV y No CAV del serotipo III.	Página 33
Tabla 3. Número de crías con aislamiento de SGB y número de óbitos en las ratas inoculadas por vía intraperitoneal con 2ml de una suspensión bacteriana de $1.8 \times 10^9$ ufc/ml de cepas CAV y No CAV del serotipo III.	Página 34
Tabla 4. Frecuencia de bacteriemias en las 14 ratas inoculadas por vía intraperitoneal con 2ml de una suspensión bacteriana con $1.8 \times 10^9$ ufc/ml de cepas CAV y No CAV del serotipo III y aislamiento de SGB en los cultivos de sangre, hígado, pulmón y cerebro de las crías.	Página 35
Tabla 5. Hemocultivos y cultivos con aislamiento de SGB* en los diferentes órganos de las crías de ratas inoculadas por vía intraperitoneal con 2ml de una suspensión bacteriana con $1.8 \times 10^9$ ufc/ml de cepas CAV y No CAV del serotipo III	Página 36
Tabla 6. Proporción de cultivos con aislamientos de SGB en sangre y en los diferentes tejidos evaluados (hígado, pulmón, y tejido del SNC) en las crías de las ratas inoculadas por vía intraperitoneal con 2ml de una suspensión bacteriana con $1.8 \times 10^9$ ufc/ml de cepas CAV y No CAV del serotipo III.	Página 37
Tabla 7. Proporción de órganos con aislamiento de SGB en las crías de ratas inoculadas por vía intraperitoneal con 2ml de una suspensión bacteriana con $1.8 \times 10^9$ ufc/ml de cepas CAV y No CAV del serotipo III.	Página 38

## **RESUMEN**

Diversos estudios han sugerido una clona de alta virulencia (CAV) del serotipo III como la responsable de la mayor morbimortalidad causada por SGB. Sin embargo tanto las cepas clasificadas como CAV y No CAV (No clonas de alta virulencia) del serotipo III se han aislado de recién nacidos con enfermedad invasiva, no existen estudios que hayan evaluado la virulencia de la CAV "in vivo".

**Objetivo.** Evaluar la virulencia de la CAV del serotipo III de SGB y comparar su virulencia de cepas No CAV.

**Métodos.** Se utilizó un modelo experimental de tres grupos para evaluar la transmisión vertical de tres cepas del serotipo III de SGB. Las cepas CAV 110 y No CAV 19 fueron aisladas de neonatos con meningitis. La cepa No CAV 181 fue aislada de un recién nacido asintomático. Las cepas se clasificaron como clona de alta virulencia por su incapacidad para crecer a 40°C y mediante el análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción del DNA (RFLP) Utilizando como sonda de hibridación el fragmento que contenía el gen para la fructuosa-1,6-bifosfato aldolasa. Ratas Sprague Dowley de dos meses fueron inoculadas a los 17-18 días de gestación con 2ml de  $1.8 \times 10^9$  ufc/ml de SGB en forma cegada y al azar. Se practicó cesárea a los 21-22 días de gestación. Las crías fueron sacrificadas inmediatamente. A cada cría se le tomo hemocultivo y un fragmento de hígado, pulmón y tejido cerebral para cultivo. Los resultados se analizaron por chi cuadrada.

**Resultados.** Fueron incluidas 124 crías de 14 ratas infectadas. El número de cultivos con recuperación de SGB fue mayor en las crías de ratas inoculadas con la cepa CAV 110 (144/184), a diferencia de las crías de ratas retadas con la cepa No CAV 19 (84/161) y No CAV 181 (82/146)( $p=0.0001$ ). La mayor frecuencia de hemocultivos positivos con SGB fue para las crías de las ratas infectadas con la CAV 110 (26/47)( $p=0.032$ ). La recuperación de SGB en los cultivos de hígado (41/46) ( $p=0.008$ ), pulmón (40/46) ( $p=0.04$ ), y cerebro (37/46)( $p<0.05$ ) fue mayor en las crías de ratas retadas con la CAV 110.

**Conclusiones.** La transmisión de SGB fue mayor entre las crías de las ratas inoculadas con la CAV 110, la cual sugiere que esta clona es más virulenta que las cepas clasificadas como No CAV.

## ANTECEDENTES :

A pesar de ser el agente etiológico más frecuente de sepsis y meningitis neonatal en países desarrollados, *Streptococcus* del grupo B (SGB) ha sido considerado como una causa poco frecuente de enfermedad perinatal en México<sup>1</sup>; sin embargo en estudios realizados en 1989 y 1990 se detectó una prevalencia de colonización del 10.3% en mujeres mexicanas embarazadas, una frecuencia de infección neonatal 1/1500 recién nacidos vivos, similar a la reportada en países desarrollados<sup>2</sup>, y una letalidad 5 a 7 veces mayor (38.5%) al promedio comunicado en dichos países<sup>3-5</sup>.

A diferencia de los Estados Unidos de América y Europa, donde el serotipo III es el más frecuente tanto en casos de enfermedad como en portadores, en México se ha descrito una baja prevalencia del serotipo III (3%) y una elevada frecuencia de cepas No Tipificables (18.2%)<sup>6</sup>.

Recientemente Palacios y col. evaluaron 28 cepas de SGB aisladas en México que fueron No tipificables por el método tradicional de Lancefield utilizando antígenos preparados por extracción ácida caliente. Cuando estas cepas fueron probadas con antígenos preparados por un método de extracción enzimática no ácida, 10 de las 23 fueron clasificadas en el serotipo III. Estos resultados sugieren que la prevalencia del serotipo III de SGB en México es mayor a lo que se había reportado con anterioridad<sup>2</sup>.

Los estudios iniciales demostraron dos comportamiento clínicos diferentes en la infección humana causada por el serotipo III del SGB. Se identificaron cepas de este serotipo que colonizaban el tracto genital de la mujer embarazada y causaban

meningitis en el recién nacido, y cepas que colonizaban a mujeres embarazadas cuyos recién nacidos permanecían asintomáticos<sup>7-10</sup>. Este comportamiento clínico diferente de la infección neonatal por SGB se atribuyó a la ausencia de anticuerpos transplacentarios específicos y a diferencias en la virulencia entre las cepas del serotipo III.

La observación de una variabilidad en la virulencia entre las cepas del serotipo III, dio lugar a la realización de investigaciones "in vitro" con el objeto de evaluar si existía una correlación entre el grado de síntesis y expresión de diferentes productos extracelulares y el desarrollo de enfermedad. Las cepas con una elevada síntesis de antígeno específico del tipo III, tanto adherido a la superficie de la célula como liberado al medio extracelular, eran más frecuentemente aisladas de casos con enfermedad. Sin embargo, una elevada síntesis de polisacárido capsular específico de tipo no se asoció a mayor letalidad<sup>10</sup>. La conclusión de este estudio fue que las características fenotípicas del serotipo III del SGB no permitían distinguir a las cepas con una mayor virulencia. Posteriormente, se llevaron a cabo estudios utilizando diversos métodos de biología molecular con el propósito de identificar diferencias entre las cepas del serotipo III. Estos estudios permitieron la identificación de las relaciones genéticas y de la estructura clonal de las poblaciones de SGB<sup>11</sup>.

A través de electroforesis de multilocus enzimático, Musser y col. evaluaron la relación genética de 128 cepas de SGB aisladas en los Estados Unidos de América. Identificaron 19 patrones electroforéticos en dos divisiones filogenéticas mayores. La división II incluía 18 patrones electroforéticos y cepas de todos los serotipos. En cambio, la división filogenética I estaba constituida por un solo patrón



electroforético que incluía 44 cepas, todas del serotipo III y la mayoría (80%) aisladas de casos de enfermedad. A esta división I se le llamó entonces Clona de Alta Virulencia (CAV)<sup>12</sup>.

En otros estudios de una o pocas cepas se identificaron algunas características que parecen ser únicas de cepas clasificadas como CAV. Entre estas características se encuentran la elevada producción de polisacárido capsular específico del tipo, ácido teicoico<sup>13-14</sup>, hialuronidasa y proteasa. Otras dos características únicas de las cepas CAV son la incapacidad para crecer a 40°C y en un medio con 200mM de fosfato<sup>14-16</sup>. La incapacidad de esta clona para crecer a 40°C se debe a una mutación en el gen de la fructuosa-1,6-bisfosfato aldolasa (fba), cuya actividad enzimática se reduce más del 75% a altas temperaturas. Tanto la incapacidad para crecer a 40°C como el gen de esta aldolasa han sido utilizados como marcadores altamente sensibles y específicos para identificar cepas CAV<sup>16</sup>.

Recientemente Hauge y col<sup>17</sup> evaluaron 23 características genéticas y fenotípicas en una colección de cepas danesas que incluía a seis cepas norteamericanas del estudio de Musser<sup>12</sup>. Seis divisiones filogenéticas mayores y una fuerte correlación entre las diferentes características evaluadas fueron identificadas, lo cual sugería una estructura clonal de la población. Además, como Musser y Helmig<sup>18</sup>, Hauge encontró que los aislados que expresaban el polisacárido de tipo III pertenecían a dos linajes evolutivamente distantes, sin embargo no encontraron diferencias en el potencial patogénico entre las dos divisiones<sup>17</sup>

A través del análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción del DNA (RFLP)<sup>19</sup> y de experimentos de cambios en la temperatura de

crecimiento<sup>20</sup>, Palacios y col. evaluaron 57 cepas mexicanas de SGB aisladas de pacientes con enfermedad y de sujetos asintomáticos. Utilizando un fragmento de DNA que contenía el gen de aldolasa (fba) como sonda de hibridación, se identificaron dos patrones de restricción dentro del serotipo III uno de los cuales correspondía al mismo patrón de una cepa control representativa de la CAV de Musser<sup>12</sup>. En este estudio tres cepas del serotipo III, aisladas de casos con enfermedad fueron identificadas como pertenecientes a la CAV<sup>19, 20</sup>.

En un estudio reciente realizado con enzimas de restricción y análisis de electroforesis en gel por campos pulsados se identificó un solo patrón de restricción en cepas del serotipo III de neonatos con sepsis y meningitis<sup>21</sup>. Los resultados de este estudio parecen apoyar la existencia de una clona única con una elevada virulencia como la propuesta por Musser.

A pesar de la utilización de diferentes pruebas de biología molecular con un alto poder de discriminación en diversos estudios, la CAV del serotipo III de SGB ha sido identificada solo por algunos investigadores<sup>12-21</sup>. Esto ha dado lugar a que se cuestione la existencia de esta clona de alta virulencia (CAV)<sup>17-18, 22-24</sup> y a que su identificación se considere como el resultado de muestreos sesgados, compuestos principalmente de cepas aisladas de pacientes con enfermedad<sup>12</sup>. Otra hipótesis ha propuesto que la mayoría de cepas aisladas de casos de enfermedad no se agrupan en una clona, sino en varias clonas del serotipo III, algunas de ellas con una mayor virulencia<sup>18</sup>. Estas clonas, por lo tanto, tendrían una distribución mundial y serían las responsables de la diferente incidencia de enfermedad por SGB que se observa en los distintos países<sup>18, 22-26</sup>. Sin embargo, estas investigaciones tienen limitaciones, ya que en ninguna de ellas se ha controlado el efecto de ciertos

factores perinatales que incrementan el riesgo del recién nacido para sufrir infección, ya sea al incrementar la susceptibilidad del huésped o el tamaño del inoculo <sup>11,18-17</sup>. Así, a pesar de los diferentes estudios realizados, no se ha confirmado si la CAV o un grupo pequeño de clonas con una mayor virulencia son las principales responsables de la patología perinatal causada por SGB del serotipo III <sup>9,17-18,22-23</sup>.

Para evaluar si existe diferencia en la virulencia entre las cepas clasificadas como CAV y No CAV, se utilizó un modelo de enfermedad perinatal de transmisión vertical en una cepa de rata gestante que en estado de preñez es susceptible al serotipo III de SGB<sup>27</sup>. El ratón y la rata embarazada es el modelo aceptado de transmisión vertical de sepsis neonatal por SGB. Dicho modelo ha permitido demostrar la transmisión transplacentaria, al presentar las crías la enfermedad e identificar al microorganismo en las primeras 24 horas de vida en los diferentes órganos, con hallazgos histológicos similares a los observados en los recién nacidos humanos<sup>27-28</sup> por lo que se ha considerado como un excelente modelo que asemeja a la enfermedad humana <sup>27-29</sup>

La enfermedad causada por el serotipo III en las crías del modelo de transmisión vertical depende de varios factores, como son la dosis del inoculo, el medio en que se diluye dicho inoculo y el volumen total a administrar <sup>28,30-32</sup>. Otros factores que influyen en el desarrollo de dicha enfermedad son la vía de administración y la condición inmunológica del huésped<sup>27, 28</sup>.

En los diversos estudios efectuados en modelos animales con SGB se ha encontrado una importante variabilidad en la dosis letal<sub>50</sub> (LD<sub>50</sub>). La muerte de las

crías ocurrió en dosis tan variables como 10 ufc y 4,500,000 ufc<sup>10,27-30</sup>. Esta variabilidad ha sido atribuida al medio utilizado para administrar el inóculo bacteriano. Cuando cepas del serotipo I y III aisladas de enfermedad fueron diluidas en caldo Todd-Hewitt la LD<sub>50</sub> fue baja; en cambio, esta dosis se incrementó cuando se utilizó solución salina normal como vehículo para la administración del inóculo<sup>32</sup>. En un modelo murino de transmisión vertical, Noel y col. causaron enfermedad en las crías al administrar dos mililitros de solución salina normal con 1.8x10<sup>9</sup> ufc/ml de una cepa del serotipo III. Esta dosis no fue letal para ninguna de las crías y SGB fue aislado de sangre, tejido cerebral, hígado y bazo en las crías. Debido a la variabilidad conocida en la DL<sub>50</sub> de SGB, se eligió la dosis empleada por Noel y col. de 1.8x10<sup>9</sup> ufc/ml en solución salina. Esta dosis aseguraba la producción de bacteriemias y enfermedad sin causar la muerte en las crías<sup>33</sup>.

## JUSTIFICACIÓN:

En diversos estudios de epidemiología molecular se ha identificado una dicotomía filogenética y se ha propuesto la existencia de una CAV dentro del serotipo III de SGB. Esta CAV parece poseer características fenotípicas de alta virulencia; sin embargo, en algunos estudios no se ha demostrado que esta CAV este asociada con una mayor probabilidad de enfermedad en el humano, cepas del serotipo III son frecuentemente aisladas de portadores<sup>14-18</sup> y cepas del serotipo III clasificadas como No CAV también son aisladas de casos de enfermedad. Debido a esto, se consideró necesario evaluar in vivo la virulencia de la CAV en un modelo animal de transmisión vertical, y comparar dicha virulencia con la de cepas no clasificadas dentro de esta clona.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

¿Las cepas de SGB del serotipo III clasificadas como CAV\* presentan una mayor virulencia que las cepas del serotipo III No CAV\* al ser evaluadas en un modelo animal de enfermedad de transmisión vertical?

## **HIPOTESIS:**

La virulencia de las cepas del serotipo III de SGB clasificadas como CAV es superior a la de las cepas No CAV del serotipo III en un modelo animal de transmisión vertical.

## **OBJETIVO:**

Comparar en un modelo animal de transmisión vertical la virulencia de las cepas del serotipo III de SGB clasificadas como CAV y No CAV.

\*Identificadas a través de RFLP utilizando el gen de la fructuosa 1, 6 bifosfato aldolasa como sonda de hibridación y por su inhibición del crecimiento a 40°C.

## **DEFINICIÓN DE VARIABLES.**

### **Variable Independiente:**

#### **1. Clasificación como CAV o No CAV y origen clínico de las cepas en estudio.**

Las cepas utilizadas fueron clasificadas como CAV o No CAV a través de análisis de RFLP utilizando como sonda de hibridación el fragmento de DNA conteniendo el gen de aldolasa (fba)<sup>19-20</sup> y por sus características de crecimiento a 40°C en un medio químicamente definido<sup>15-16</sup>. En base a esto, dichas cepas fueron clasificadas como sigue:

##### **1a. Cepa clasificada como CAV del serotipo III y aislada de enfermedad.**

**Definición conceptual:** La clona de alta virulencia del serotipo III de SGB (CAV) incluye a toda cepa que tiene el mismo patrón electroforético - por multilocus enzimático<sup>12</sup> o por RFLP utilizando el gen fab como sonda de hibridación<sup>19-20</sup> - de las cepas de la división I de Musser y col.<sup>12</sup>, y toda cepa cuyo crecimiento es inhibido a 40°C en un medio químicamente definido<sup>15-16</sup>, y que además fue aislada de un caso de enfermedad invasiva.

**Definición operativa:** Cepa del serotipo III aislada de un caso de meningitis cuyo crecimiento es inhibido a 40°C en un medio definido químicamente<sup>15-16</sup> y que tiene el patrón electroforético por multilocus y RFLP utilizando el gen fab como sonda de hibridación<sup>19-20</sup> de las cepas de la división I de Musser y col.<sup>12</sup>

**Escala de medición:** Nominal

##### **1b. Cepa clasificada como No CAV del serotipo III y aislada de enfermedad.**

**Definición conceptual:** Cepa del serotipo III de SGB que corresponde a la división II de Musser por multilocus enzimático<sup>12</sup>, con un variado patrón electroforético, cuyo

crecimiento no es inhibido en un medio químicamente definido y a 40°C<sup>15-16</sup>, y es aislada de un caso de enfermedad invasiva.

**Definición operativa:** Cepa identificada como No CAV por RFLP utilizando el gen de la fructuosa-1,6-bifosfato aldolasa como sonda de hibridación<sup>19-20</sup>, cuyo crecimiento no es inhibido en un medio químicamente definido y a 40°C<sup>15-16</sup>, y es aislada de un paciente con meningitis.

**Escala de medición:** nominal.

**1c. Cepa clasificada como No CAV del serotipo III y aislada de portador.**

**Definición conceptual:** Cepa de SGB del serotipo III que fue aislada de un portador, clasificada dentro de la división II de Musser y col. por multilocus enzimático<sup>12</sup> o por RFLP utilizando el gen fab como sonda de hibridación<sup>19-20</sup> y cuyo crecimiento no es inhibido en medio químicamente definido y a 40°C<sup>15-16</sup>

**Definición operativa:** Cepa del serotipo III de SGB aislada de portador asintomático, identificada como No CAV por RFLP utilizando el fragmento de la fructuosa-1,6-bifosfato aldolasa como sonda de hibridación<sup>19-20</sup>, y cuyo crecimiento no es inhibido en un medio químicamente definido a 40°C.<sup>15-16</sup>

**Escala de medición:** nominal

**Variable dependiente:**

**Virulencia de las cepas:**

**Definición conceptual:** Es el grado en el que se expresa la patogenicidad<sup>34</sup> La patogenicidad y virulencia en ocasiones les dan el mismo significado, sin embargo



la virulencia esta más relacionado con la infecciosidad<sup>35</sup> la invasividad y la toxigenicidad del microorganismo<sup>36</sup>.

**Definición operativa:** La virulencia operativamente se definió como la magnitud o el grado de diseminación del microorganismo en los diferentes tejidos y en sangre de las crías de las ratas expuestas a cepas del serotipo III CAV y No CAV. Y fue evaluada por la frecuencia de aislamiento de SGB en los cultivos de los órganos (hígado, pulmón y tejido cerebral) y/o la demostración de bacteriemia en las crías.

**Escala de medición:** Nominal dicotómica (aislamiento positivo o negativo).

## **MATERIAL Y MÉTODOS:**

### **DISEÑO DEL ESTUDIO:**

Experimental de tres grupos.

### **LUGAR DONDE SE LLEVÓ A CABO EL ESTUDIO:**

Se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría, y en el Bioterio del CMN SXXI, IMSS.

#### **1. Modelo experimental, embarazo e identificación de las ratas preñadas:**

Ratas Sprague Dowley de 60 a 70 días de edad no preñadas fueron expuestas a apareamiento durante dos días<sup>37</sup>. Posteriormente las ratas fueron vigiladas durante 14 días, momento en el cual se llevó a cabo la selección de las ratas preñadas y su identificación a través del marcaje de la cola de números progresivos<sup>38</sup> con un marcador indeleble.

#### **2. Preparación del inóculo bacteriano y selección de la muestra:**

##### **a) Cepas bacterianas.**

Se utilizaron tres cepas del serotipo III de SGB aisladas de recién nacidos. La cepa CAV 110 aislada de un caso con meningitis y la cepa No CAV 181 aislada de portador<sup>12,19-20</sup> Estas cepas fueron proporcionadas por el Dr. S.J. Mattingly del departamento de microbiología de la Universidad de Ciencias de la Salud de San Antonio Texas. La cepa No CAV 19 del serotipo III de SGB fue aislada en el INPer

de un recién nacido con meningitis. Las cepas de referencia CAV y No CAV fueron previamente clasificadas a través de RFLP utilizando el gen de la fructuosa-1,6-bifosfato aldolasa como sonda de hibridación y mediante la inhibición de su crecimiento a 40°C por Palacios y col<sup>19-20</sup>

#### **b) Estandarización de la suspensión bacteriana y preparación del inóculo.**

De las cepas seleccionadas se tomaron tres colonias frescas aisladas en agar sangre, las cuales fueron suspendidas en 10 ml de caldo Todd-Hewitt (Difco, Detroit IM) e incubadas a 37°C durante la noche antes de su uso.

Para la estandarización de la dosis bacteriana cada suspensión fue ajustada utilizando un espectrofotómetro (Spectronic 20 series Bausch, Lomb) hasta alcanzar la misma densidad óptica del tubo 6 de McFarland (1.2 unidades a una  $A_{650nm}$ ), lo cual corresponde a  $1.8 \times 10^9$  células/ml<sup>39</sup>. Estas suspensiones fueron centrifugadas a 1200 revoluciones por minuto durante 15 minutos a 4°C. El paquete bacteriano resultante fue lavado, centrifugado, y suspendido en solución salina estéril hasta alcanzar la densidad óptica mencionada. Cada suspensión fue colocada en hielo hasta su aplicación dentro de la primera hora de su preparación.

#### **c) Selección de la muestra.**

Se incluyeron las crías, obtenidas por cesárea o cuyo alumbramiento fue presenciado por el investigador, de 14 ratas inoculadas intraperitonealmente. Aunque no ocurrió ningún caso durante la realización del presente estudio, se consideraron como motivos de exclusión si las ratas hubieran sido inoculadas en tejidos subcutáneos o en un órgano o víscera, así como en casos de muerte por causa no infecciosa. Además, se eliminaron los óbitos cuando por el estado de

descomposición y/o maceración al nacimiento, era imposible realizar al menos un estudio parcial.

### **3. Administración del inóculo y toma de microhemocultivos seriados en la rata preñada:**

Para la estandarización del modelo experimental se inocularon un total de 23 ratas. El inóculo bacteriano se aplicó a las ratas preñadas en forma cegada y al azar dentro de la primera hora de su preparación. Una vez preparada la suspensión de las tres cepas en estudio, una tercera persona asignó un número de codificación a cada una de estas suspensiones, este número era desconocido por el investigador, y el orden en el que se administraron fue asignado al azar. Las ratas preñadas fueron inoculadas por vía intraperitoneal el día 17-18 de gestación. Previa asepsia y antisepsia del cuadrante inferior derecho del abdomen se inyectaron dos mililitros de la suspensión bacteriana mediante una aguja de insulina. La rata preñada fue colocada dentro de un contenedor para la toma de microhemocultivos<sup>40</sup> seriados a las 2, 24, 48 y 72 horas de haber sido inoculada<sup>33</sup> Previa asepsia y antisepsia de la cola se procedió a la amputación distal, con extracción de 0.2 ml de sangre para los microhemocultivos.

### **4. Extracción de las crías mediante cesárea y cultivo de los órganos de las crías:**

En el día 21-22 de gestación la rata preñada fue anestesiada con éter para efectuar la cesárea con extracción de todas las crías. Al terminar el procedimiento la rata fue sacrificada mediante la inhalación de éter. Las crías también fueron

sacrificadas en las primeras 24 horas de vida mediante inhalación de éter. Previa asepsia y antisepsia de la región torácica, se extrajeron 0.2 ml de sangre por punción intracardiaca para microhemocultivo. Se cortaron fragmentos de hígado y pulmón para cultivarse por duplicado. Los fragmentos de hígado y pulmón de las crías sacrificadas y de los óbitos fueron homogeneizados con 200 a 600  $\mu$ l de solución salina estéril, de los cuales 50  $\mu$ l se sembraron en agar sangre de carnero al 10% y 200  $\mu$ l fueron inoculados en tubos con cuatro ml de caldo Todd-Hewitt. Mediante una aguja del No. 25 se aspiró tejido cerebral de las crías con extracción de 0.2 ml y se inocularon en un tubo de microhemocultivo. Todos los procedimientos se efectuaron en una campana de flujo laminar.

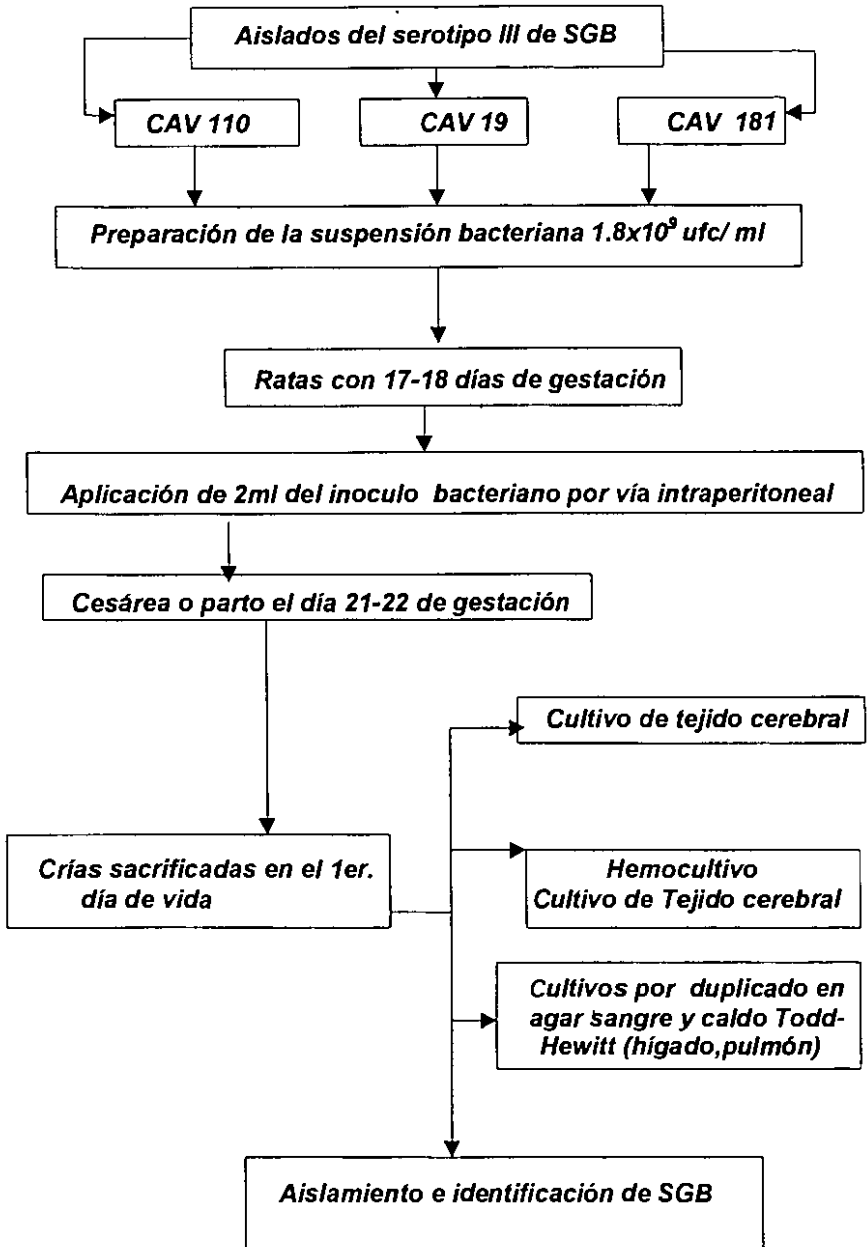
#### **5. Aislamiento e identificación de SGB en los homogeneizados de tejidos:**

Los cultivos de los órganos homogeneizados se incubaron a 37°C durante 18 horas. La lectura del crecimiento bacteriano se efectuó a las 24 horas para los cultivos en placa y a las 48 horas en los cultivos en caldo Todd-Hewitt. Se seleccionaron las placas de gelosa sangre con colonias sospechosas de SGB para su aislamiento e identificación. La placa con ausencia de crecimiento fue consignada como sin desarrollo (S/D). Los cultivos en caldo Todd-Hewitt con 48 horas de incubación fueron sembrados en placas de gelosa sangre. A las 24 horas de incubación a 37°C se efectuó la lectura de la placa y se llevó a cabo el aislamiento e identificación de las colonias sospechosas de SGB.

Los tubos de Todd-Hewitt de la siembra sin desarrollo bacteriano fueron incubados durante 10 días, momento en que una segunda siembra se efectuó en gelosa

sangre para detectar SGB. Una vez aisladas las colonias sospechosas de SGB se llevó a cabo la identificación a través de tinción de gram, prueba de catalasa, prueba de CAMP y aglutinación con látex<sup>41</sup>.

**Flujograma del estudio.**



## TAMAÑO DE LA MUESTRA:

Para la estimación del tamaño de muestra se utilizó el nomograma para variables cualitativas, donde el nivel de significancia  $\alpha$  fue de 0.05 y  $\beta$  de 0.20<sup>42</sup>. Para este cálculo se utilizaron las cepas CAV 110, aislada de un RN con meningitis, y No CAV 181 aislada de un neonato portador. Se asignó como grupo experimental a las crías retadas con la cepa CAV 110, ya que se presuponía una mayor virulencia en esta cepa. La virulencia de las cepas No CAV 19 y 181 se consideró que era comparable, por tal motivo independientemente de su origen clínico se asignó a las crías del grupo de la cepa 181 aislada de portador y clasificada como No CAV como grupo control. No obstante que se esperaba que con 3 ratas preñadas por grupo se completaría el tamaño de muestra, se realizó un estudio piloto con seis ratas preñadas para calcular el efecto esperado, y al mismo tiempo se iniciaron los experimentos. La muestra del estudio piloto se perdió por el canibalismo que presentan las ratas cuando sus crías nacen enfermas. Los experimentos ya iniciados se continuaron, y se efectuó un punto de corte en la muestra al contabilizar 23 ratas preñadas inoculadas, sin embargo solo reunieron criterios de inclusión 124 crías de 14 ratas. La recuperación de SGB en los cultivos de tejido cerebral de las crías retadas con la CAV 110 fue de 80.4%, y en las crías infectadas con la cepa No CAV 181 de 57.8%. Los porcentajes de aislamiento de SGB en los cultivos de tejido cerebral de las crías expuestas se llevaron al nomograma para calcular el número de crías en cada grupo, y se obtuvo, una "n" de 17 crías para cada grupo. Tomando en cuenta que se contaba con los resultados



de las 124 crías de las 14 ratas incluidas se decidió superar la “n” calculada de 17 crías.

### **ANALISIS DE RESULTADOS:**

La proporción de aislamientos con SGB en los cultivos de los órganos y en los hemocultivos de las crías infectadas con las cepas CAV110, No CAV 19 y No CAV 181 fue comparada por chi cuadrada<sup>43-44</sup>.

Mediante estadística descriptiva se reportaran los resultados de las ratas preñadas.

### **ASPECTOS ETICOS:**

De acuerdo con la Ley General de Salud de México, se cumplió con las medidas establecidas de seguridad para el cuidado y manejo de los animales, con apego a los artículos 122 y 123 referentes al empleo de procedimientos que aseguren la muerte de los animales de experimentación sin sufrimiento<sup>45</sup>.

## **RESULTADOS**

Una vez que fue estandarizada la suspensión bacteriana se inoculó a 23 ratas preñadas. De esta muestra fueron eliminadas siete ratas debido a que el parto no fue presenciado por el investigador. Otras dos ratas tuvieron que eliminarse, el motivo en una rata fue la presencia de un parto distócico secundario a un periodo expulsivo prolongado de tres horas que causó la muerte de todas las crías. La segunda rata muere al tercer día de la aplicación del inóculo bacteriano. La causa de muerte fue hemorragia pulmonar, sepsis y neumonía por SGB. Se identificaron cocos gram positivos en los alvéolos pulmonares, y se aisló SGB en dos hemocultivos.

De las 14 ratas preñadas que fueron incluidas, se les practicó cesárea a once ratas y el parto fue presenciado en tres.

Se incluyeron 126 crías de 14 ratas infectadas con alguna de las tres cepas del serotipo III probadas (Tabla 1). El grupo expuesto a la cepa CAV 110 incluyó 47 crías. Los grupos retados con cepas No CAV incluyeron 42 crías para el grupo expuesto a la cepa No CAV 19 y 37 crías hubo para el grupo retado con la cepa No CAV 181(Tabla 2).

Debido al estado de descomposición que presentaron 14 óbitos (Tabla 3), no fue posible tomar todos los cultivos por duplicado de hígado y pulmón en las crías. Hubo dos óbitos de las ratas 38 y 35 respectivamente que por el avanzado estado de descomposición no fue posible tomar ningún cultivo.

Un total de 561 cultivos positivos en las crías se registraron: 124 cultivos positivos con SGB fueron registrados respectivamente en los cultivos de sangre y

de tejido cerebral de las crías. De los cultivos realizados por duplicado en caldo Todd-Hewitt y gelosa sangre a las crías, SGB se aisló en 154 cultivos de hígado y en 159 cultivos de pulmón.

Se identificaron 149/184 cultivos positivos con SGB en el grupo de crías de ratas expuestas a la cepa CAV 110 (Tabla 2). El número de cultivos positivos en este grupo fue de significación estadística ( $p = 0.0000001$ ) (Tabla 2), a diferencia de las crías de ratas inoculadas con cepas No CAV 19 (82/161) y No CAV 181 (82/146).

Al comparar la frecuencia de hemocultivos positivos en las crías de ratas retadas con la cepa CAV 110 (26/46) con el número de hemocultivos de las crías expuestas a las cepas No CAV 181 (12/37) y No CAV 19 (13/41), la proporción de aislamientos de SGB fue mayor para las crías expuestas a la cepa CAV 110 ( $p = 0.02$ ) (Tabla 5). Además las crías de ratas que fueron inoculadas con la CAV 110 presentaron una mayor frecuencia de aislamiento de SGB en los cultivos de tejido cerebral (37/46), a diferencia de las crías de ratas retadas con las cepas No CAV 19 (21/41) y 181 (22/37) ( $p < 0.05$ ) (Tabla 5).

Una elevada frecuencia de cultivos positivos con SGB se observó en el hígado de las crías de ratas infectadas con la cepa CAV 110 (41/46) ( $p = 0.005$ ) (Tabla 5).

Al comparar el aislamiento de SGB en los cultivos de pulmón entre las crías de las ratas infectadas con las cepas CAV 110 (40/46) y No CAV 181 (24/36) y No CAV 19 (25/39), un mayor número de cultivos positivos fueron recuperados en el grupo expuesto con la CAV 110 ( $p = 0.03$ ) (Tabla 5). En la figura I. se muestran dos microfotografías de la cría número 46 de una rata inoculada con la CAV 110, donde se identifican cocos gram positivos en los cortes de tejido hepático y pulmonar

teñidos con tinción de gram. Mediante la tinción de hematoxilina y eosina se observó la ausencia de reacción inflamatoria en los tejidos que presentaban los abscesos.

Por otro lado, se observó una recuperación similar de SGB en hemocultivos y en los cultivos de los diferentes órganos evaluados en las crías de las ratas infectadas con las cepas No CAV 19 y 181 ( $p=NS$ ).

La recuperación de SGB en los cuatro sitios anatómicos estudiados en las crías de ratas expuestas a alguna de las cepas CAV y No CAV, fue mayor en las crías infectadas con la cepa CAV 110 (46% 21/46), en cambio este porcentaje fue menor para las crías de ratas retadas con las cepas No CAV 19 (9/41, 22%) y 181 (7/37, 19%)(Tabla 6).

Un diferente grado de recuperación de SGB en los cuatro sitios evaluados en las crías expuestas a las cepas CAV 110 y NO CAV 19 y 181 del serotipo III se observó mediante el análisis inferencial de los resultados ( $\chi^2$  cuadrada = 23.6), y apoyó la hipótesis de una mayor virulencia para la CAV 110 ( $H_a \square H_o$ ) (Tabla 6.).

Al comparar la presencia de uno o más cultivos positivos para SGB en cualquiera de los órganos estudiados, las crías de ratas expuestas con la CAV 110 presentaron más de un aislamiento positivo en 45 de 46 crías ( $p=0.009$ ). Esta proporción fue menor entre las crías de las ratas infectadas con las cepas No CAV 19 (31/41) y 181 (31/37)(Tabla 7). De esta manera, el número de crías con ausencia de aislamiento en todos los cultivos fue del 2% (1/46) en las crías retadas con la CAV 110, para las crías de ratas retadas con la cepa No CAV 19 fue del 24 % (10/41) y en las crías expuestas con la cepa No CAV 181 no hubo crecimiento en 16%(6/37)(Tabla 7).

## DISCUSIÓN:

El SGB se puede encontrar como comensal en recto y vagina de mujeres embarazadas, dicha colonización por lo común no tiene consecuencias clínicas para el recién nacido. Se desconoce porque algunos de los neonatos y madres colonizados desarrollan enfermedad y, en cambio, otros permanecen asintomáticos. Aunque se ha demostrado que el estado inmune de las madres colonizadas tiene un papel importante al proveer protección pasiva a sus recién nacidos<sup>3</sup>, los resultados de varios estudios sugieren diferencias en la virulencia de las cepas de SGB, que pueden contribuir al desarrollo de enfermedad neonatal<sup>9-10,12-18,22</sup>. Varios estudios sugieren la existencia de cepas de una clona única o de un número limitado de clones que podrían explicar la mayoría de la morbilidad y mortalidad causada por SGB<sup>9-10,12-18</sup>. En un estudio de 118 cepas aisladas en Dinamarca<sup>17</sup> y en otro con 276 cepas francesas<sup>9</sup>, la evaluación de los genotipos cromosomales por electroforesis de multilocus enzimático demostró una dicotomía filogenética dentro del serotipo III, en el análisis dendrográfico de Musser dos divisiones filogenéticas primarias fueron encontradas. Las dos divisiones incluían cepas del serotipo III, una contenía exclusivamente a las cepas aisladas de enfermedad, en cambio la otra división incluía cepas aisladas de mujeres embarazadas portadoras asintomáticas<sup>12</sup>. Además, la mayoría de las cepas del serotipo III quedaron agrupadas en un número limitado de patrones electroforéticos. Este estudio ha sugerido la existencia de una estructura clonal en las poblaciones de SGB con una virulencia distinta entre las clones. Otros autores demostraron, también, la existencia de un número ilimitado de "clonas de portador" del serotipo III y de otros serotipos y, en cambio, un número

restringido de clonas que causan enfermedad, las cuales parecen ser de distribución mundial<sup>9,17-18,24</sup>.

Aunque algunas investigaciones apoyan la existencia de una CAV dentro del serotipo III de SGB<sup>12,21</sup>, no existe ningún estudio que haya evaluado de manera directa la virulencia de esta CAV "in vivo", y se desconoce si la CAV posee la virulencia necesaria para causar enfermedad en el recién nacido, y si dicha virulencia es mayor a la de las cepas que no pertenecen a dicha clona.

La utilización del modelo animal en el presente estudio proporcionó varias ventajas, como son la reproducción fiel de la enfermedad neonatal de transmisión vertical por SGB<sup>29-31</sup> y la posibilidad de controlar algunos aspectos relacionados con la dosis infectante y el tiempo de exposición al microorganismo, al sacrificar a las crías en las primeras 24 horas de vida. Todo esto, permitió la comparación objetiva de la virulencia de cepas del serotipo III clasificadas como CAV y No CAV. Por otro lado, se seleccionaron los órganos que son infectados con mayor frecuencia en los recién nacidos humanos y en las crías de modelos animales con enfermedad congénita por SGB<sup>28-32</sup>.

Debido a que la sepsis y la neumonía son las manifestaciones más frecuentes en el neonato con infección temprana por SGB<sup>3</sup>, se tomaron cultivos de sangre y tejido pulmonar de las crías. Además, se evaluó al hígado de las crías debido a que en los estudios de transmisión vertical este órgano es infectado frecuentemente<sup>30-32</sup>.

Considerando que las cepas CAV 110 y No CAV 19 fueron aisladas de recién nacidos con meningitis, era esperada una elevada probabilidad de que ambas cepas causaran meningitis en las crías; sin embargo, el mayor número de

aislamientos de SGB en los cultivos de tejido nervioso se observó en las crías expuestas a la cepa CAV 110. Este hallazgo parece sugerir un tropismo diferente para infectar al tejido cerebral entre los aislados clasificados como CAV y No CAV.

Pese a que el modelo animal de transmisión vertical favorece la infección hepática a través de la ruta transplacentaria<sup>30</sup>, una mayor frecuencia de aislamientos de SGB en los cultivos de hígado fue observada en el grupo de crías de las ratas expuestas a la cepa CAV 110.

A pesar de que la ruta más probable de transmisión en el modelo animal fue la hematogena transplacentaria, las crías de las ratas inoculadas con la cepa CAV 110 presentaron una mayor frecuencia de aislamiento de SGB en pulmón, lo que está en relación directa con el mayor número de aislamientos en sangre en las crías expuestas a la cepa CAV.

Si bien la cepa No CAV 181 fue aislada de portador y parece poseer una menor virulencia con respecto a la CAV 110, es probable que la enfermedad en las ratas y en sus crías infectadas con la cepa No CAV 181, se debió a la ruta de administración utilizada. La ruta intraperitoneal permitió la evasión de diversos mecanismos de defensa localizados en las mucosas y el acceso directo al medio interno de las ratas inoculadas. Esto puede explicar porque las dos cepas No CAV estudiadas tuvieron una virulencia similar; en cambio dicha virulencia fue inferior a la de la cepa CAV 110.

A pesar de la administración intraperitoneal y del control de algunos factores de riesgo perinatal descritos en la infección humana, el modelo animal utilizado permite sugerir que la cepa clasificada como CAV parece poseer una mayor virulencia que las cepas No CAV.

En este modelo, la CAV fue identificada por su incapacidad para crecer a 40°C y por RFLP<sup>15-16,19-20</sup> utilizando como sonda de hibridación al gen de aldolasa. Estas dos características han sido utilizadas como marcadores altamente sensibles y específicos para identificar a las cepas CAV, como fueron definidas por Musser y col. y por Mattingly y col.<sup>12-16</sup> las cuales han sido generalmente aisladas de casos de enfermedad. En el presente estudio, la cepa CAV 110, representativa de la división filogenética I de Musser, mostró una mayor virulencia en el modelo animal que las cepas representativas de la división filogénica II del mismo autor, aisladas tanto de portador como de enfermedad, lo cual apoya in vivo una mayor virulencia en la clínica para la CAV del serotipo III. Sin embargo, es necesario realizar estudios que permitan evaluar si el gen mutante de la fructuosa-1,6-bifosfato aldolasa está relacionado o no con la virulencia de la CAV, o bien, si otros genes que codifican factores de virulencia localizados "río arriba" y/o "río abajo" están relacionados con el gen de dicha aldolasa, y si mutaciones en estos últimos genes son los responsables de la mayor virulencia de la CAV.

Los resultados observados sugieren una mayor virulencia para la cepa CAV del serotipo III, y proporcionan elementos para explicar la falta de éxito de la quimioprofilaxis materna durante el parto en ausencia de factores de riesgo perinatales. La quimioprofilaxis utilizada en USA y Europa parece haber favorecido una mayor proporción de casos de enfermedad tardía en neonatos de término<sup>26,46</sup> Es en este grupo de pacientes en los que ciertos factores de riesgo perinatal, los cuales pueden incrementar la susceptibilidad del huésped para sufrir enfermedad, están generalmente ausentes. En estos casos se ha sugerido una mayor virulencia del microorganismo como causa de dicha enfermedad.



Otro aspecto que tampoco tiene respuesta aún, es el observado en países subdesarrollados. Aunque los porcentajes de colonización por SGB en las mujeres embarazadas de estos países son similares a la reportada en USA y Europa, registran una tasa de infección y enfermedad neonatal por SGB baja. Se ha sugerido la existencia de clonas de SGB con una "menor virulencia" en estos países<sup>26</sup>. Sin embargo, no hay una correlación entre la menor virulencia y la mayor letalidad neonatal registrada en algunos de estos países. Así, aunque esta mayor letalidad puede ser explicada por otros factores, tales como las características de las poblaciones estudiadas, existe la posibilidad de que dicha letalidad pueda ser atribuida a la presencia de una o más clonas virulentas de SGB.

**Tabla 1. Número de hemocultivos con aislamiento de SGB en 14 ratas inoculadas por vía intraperitoneal con 2 ml de una suspensión con  $1.8 \times 10^9$  ufc/ml de cepas CAV y No CAV del serotipo III.**

Cepa Inoculada	Número de Ratas Preñadas	Positivos/ Total(%)	(%)
		Hemocultivos	Mortalidad
CAV 110	4	14/18 (87.5)	0
No CAV 19	5	9/20 (45)	0
No CAV 181	5	11/22 (50)	0

Cepas CAV y No CAV: clasificadas por su inhibición para crecer a 40° C y por RFLP

**Tabla 2. Aislamientos de SGB en el total de cultivos \*realizados a las crías de las ratas inoculadas por vía intraperitoneal con 2ml de una suspensión bacteriana con  $1.8 \times 10^9$  ufc/ml de cepas CAV y No CAV del serotipo III**

Cepa inoculada	Origen clínico	Número de Ratas preñadas	Número de Crías	Cultivos de las crías Positivos/Total (%)
<sup>a</sup> CAV 110	Enfermedad	4	47	144 /184 (78%)
<sup>b</sup> No CAV 19	Enfermedad	5	42	82/ 161 (51%)
<sup>c</sup> No CAV 181	Portador	5	37	82/ 146 (56%)

\*Hemocultivos, cultivos de pulmón, hígado, y cerebro

Cepas CAV y No CAV: clasificadas por su inhibición para crecer a 40° C y por RFLP/

<sup>a,b,c</sup> p <0.001

<sup>a,b</sup> p <0.001

<sup>a,c</sup> p <0.001

**Tabla 3. Número de ratas preñadas inoculadas por vía intraperitoneal con 2ml de una suspensión bacteriana con  $1.8 \times 10^9$  ufc/ml de cepas CAV y No CAV del serotipo III. Número de óbitos y de crías infectadas con SGB de las ratas preñadas que fueron expuestas.**

Cepa inoculada	Número de ratas preñadas inoculadas	Número de crías con aislamiento de SGB/ Total de crías	Número de óbitos/ total de crías
<sup>a</sup> CAV 110	4	46/ 47	<sup>a</sup> 5/47
<sup>b</sup> No CAV 19	5	30/42	<sup>b</sup> 8/42
<sup>c</sup> No CAV 181	5	32/37	<sup>c</sup> 3/37

Cepas CAV y No CAV: clasificadas por su inhibición para crecer a 40° C y por RFLP

<sup>a,b,c</sup> p=0.40

<sup>a,b</sup> p=0.37

<sup>a,c</sup> p=0.72

**Tabla 4. Frecuencia de bacteriemias por SGB en las 14 ratas inoculadas por vía intraperitoneal con 2ml de una suspensión bacteriana con  $1.8 \times 10^9$  ufc/ml de cepas CAV y No CAV del serotipo III y aislamiento de SGB en los cultivos de sangre, hígado, pulmón y cerebro de las crías.**

Cepa Inoculada	Número de rata	Aislamiento de SGB en las crías y ratas					
		Ratas Preñadas		Cultivos Positivos/Total			
		Sangre	Crías				
CAV		Sangre	Tejido cerebral	Pulmón	Hígado		
110	29	4/4	4/14	8/14	13/14	13/14	
110	32	4/4	6/10	8/10	9/10	8/10	
110	*38	4/4	*11/12	11/12	12/12	12/12	
110	46	2/4	5/10	10/10	6/10	8/10	
<b>No CAV</b>							
19	28	2/4	2/4	4/4	4/4	3/4	
19	23	1/4	0/9	1/9	2/9	1/9	
19	*35	3/4	*7/11	11/11	10/11	10/11	
19	40	2/4	4/6	3/6	6/6	5/6	
19	34	1/4	0/11	2/11	3/9	6/10	
<b>No CAV</b>							
181	45	2/4	2/5	4/5	3/5	3/5	
181	36	3/4	4/8	5/8	6/8	7/8	
181	30	3/4	4/11	11/11	9/10	8/10	
181	24	0/4	0/5	0/5	0/5	0/5	
181	41	3/4	2/8	2/8	7/8	5/8	

Cepas CAV y No CAV: clasificadas por su inhibición para crecer a 40° C y por RFLP  
 \* La camada de la rata 38 fue de 13 crías y la de la rata 35 de 12, pero cada una presentó un óbito cuyo estado de descomposición no permitió la toma de ningún cultivo.

**Tabla 5. Hemocultivos y cultivos con aislamiento de SGB\* en los diferentes órganos de las crías de ratas inoculadas por la vía intraperitoneal con 2ml de una suspensión bacteriana con  $1.8 \times 10^9$  ufc/ml de cepas CAV y No CAV del serotipo III**

Cepa inoculada	Hemocultivos	<sup>†</sup> Tejido cerebral	<sup>**</sup> Hígado	<sup>**</sup> Pulmón
<sup>a</sup> CAV 110 enfermedad	26/46	37/46	41/46	40/46
<sup>b</sup> No CAV 19 enfermedad	13/41	21/41	25/40	25/39
<sup>c</sup> No CAV 181 portador	12/37	22/37	23/37	24/36
<sup>***</sup> a vs b vs c	P=0.027	p=0.013	p=0.005	p=0.031
<sup>***</sup> a vs b	P=0.020	p=0.003	p=0.003	p=0.013
<sup>***</sup> a vs c	p=0.028	p=0.036	p=0.003	p=0.027

CAV y No CAV: fueron clasificadas por su inhibición para crecer a 40° C y por RFLP

<sup>\*</sup>Cultivos positivos / Total de cultivos

<sup>\*\*</sup>Cultivos de hígado y pulmón en caldo Todd-Hewitt

<sup>\*\*\*</sup> análisis por jii cuadrada

**Tabla 6. Proporción de cultivos con aislamiento de SGB en sangre y en los diferentes tejidos evaluados (hígado, pulmón, y tejido cerebral) en las crías de ratas inoculadas por vía intraperitoneal con 2ml de una suspensión bacteriana con  $1.8 \times 10^9$  ufc/ml de cepas CAV y No CAV del serotipo III**

<b>Número de hemocultivos y cultivos de los diferentes órganos con aislamiento de SGB (%)</b>					
<b>Cepa inoculada Total de crías)</b>	<b>Ninguno</b>	<b>Uno</b>	<b>Dos</b>	<b>Tres</b>	<b>Cuatro</b>
<b>CAV 110 (46)</b>	<b>1 (2%)</b>	<b>1 (2%)</b>	<b>8 (17%)</b>	<b>15 (33%)</b>	<b>21(46%)</b>
<b>No CAV 19 (41)</b>	<b>10 (24%)</b>	<b>4(10%)</b>	<b>4 (10%)</b>	<b>14 (34%)</b>	<b>9(22%)</b>
<b>No CAV 181 (37)</b>	<b>6 (16%)</b>	<b>2(5%)</b>	<b>13(35%)</b>	<b>9(24%)</b>	<b>7(19%)</b>

CAV y No CAV: fueron clasificadas por su inhibición para crecer a 40° C y por RFLP  
 $J_i$  cuadrada = 23.66  $\delta f = 8$   $\alpha = 0.05$  valor crítico 3.35.

**Tabla 7. Proporción de órganos con aislamiento de SGB en las crías de ratas inoculadas por vía intraperitoneal con 2ml de una suspensión bacteriana con  $1.8 \times 10^9$  ufc/ml de cepas CAV y No CAV del serotipo III**

Cepa inoculada origen clínico	Número de órganos con aislamiento de SGB(%)	
	Uno o más órganos	Ningún órgano
<sup>a</sup> CAV Enfermedad	45 (98%)	1 (2%)
<sup>b</sup> No CAV Enfermedad	31 (76%)	10 (24%)
<sup>c</sup> No CAV Portador	31 (83%)	6 (16%)

CAV y No CAV: fueron clasificadas por su inhibición para crecer a 40° C y por RFLP  
Al efectuar la prueba de ji cuadrada:

<sup>a</sup> vs <sup>b</sup> vs <sup>c</sup> p=0.009

<sup>a</sup> vs <sup>b</sup> p=0.001

<sup>a</sup> vs <sup>c</sup> p=0.022

<sup>b</sup> vs <sup>c</sup> p= 0.372





**Figura 1.** Corte de pulmón de una cría de una rata inoculada con 2ml de  $1.8 \times 10^9$  ufc de la cepa CAV 110 en donde se identifica absceso en el intersticio formado por cocos gram positivos. No se observa reacción inflamatoria (Brow Hopps 1000x).

**Figura 2.** Tejido hepático teñido con la tinción Brow Hopps de una cría de una rata inoculada con la CAV 110. Se observan cocos gram positivos en el parénquima por debajo de la cápsula (1000x).



## BIBLIOGRAFIA

1. 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
2. Solorzano-Santos F, Arredondo García J, Ortiz-Ibarra F, Diaz- Ramos R, 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.
3. Baker CJ, Edwards MS. Group B streptococcal infections. En: Remington JS, Klein JO, ed. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 4ª ed. Philadelphia: W.B. Saunders 1995:742-811.
4. 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 1989;7:836-835.
5. Walsh AJ, Hutchins S. Group B streptococcal disease: its importance in the developing world and prospect for prevention with vaccines. Pediatr Infect Dis 1989;8:271-277.
6. Palacios S.G, Eskew EK, Solorzano SF, Mattingly SJ. Decreased capacity for type specific antigen synthesis accounts for high prevalence of nontypeable strains of group B streptococci in mexico. J Clin Microbiol 1997;35:2923-2926.
7. Givner MD, Baker CJ. The prevention and treatment of neonatal group B streptococcal infections. En: Advances pediatric infectious disease. Year book Medical Publishers 1988:365-390.
8. Campbell JR, Baker CJ. Vaccines for group B streptococcus. Semn Pediatr

infect Dis 1991;2:213-216.

9. Quentin R, Huet H, Wang F, Geslin P, Goudeau A, Selander R. Characterization of *Streptococcus agalactiae* strains by multilocus enzyme genotype and serotype: identification of multiple virulent clone families that cause invasive neonatal disease. J Clin Microbiol 1995;33:2576 -2581.

10. Durham DL, Mattingly J, Doran TL, Milligan TW, Straus DC. Correlation between the production of extracellular substances by type in a mouse model . Infect Immun 1981;34:448-454.

11. Dennig WD, Baker JC, Troup JN, Tompkins SL. Restriccion endonucleasa analysis of human and bovine group B streptococci for epidemiologic study. J Clin Microbiol 1989;27:1352-1356.

12. 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 1989;86:4731-4735.

13 Nealon TJ, Mattingly SJ. Association of elevated levels of celular lipoteichoic acid of group B streptococci with human neonatal disease. Infect Immun 1983;39: 1243-1251.

14. Maurer JJ, Mattingly SJ. In vitro to diferentiate isolates of type III *Streptococcus agalactiae* from symptomatic and asymptomatic patients. J Clin Microbiol 1988;26: 686-691.

15. Mattingly SJ, Maurer JJ, Eskew EK, Cox F. Identification of a high clone of serotype III *Streptococcus agalactiae* growth characteristic at 40°C . J Clin Microbiol 1990;28:1676-1677.

16. Mattingly SJ, Eskew EK . Temperature sensitivity of fructose-1,6-biphosphato aldolase accounts for the inability of the high-virulence clone of *Streptococcus agalactiae* to grow at 40°C Current Microbiol 1993;26:147-150.
17. Hauge M, Jespersgard 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.
18. Helmig R, Ulbjerg, 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.
19. Palacios SG, Eskew EK, Timos BC, Solórzano SF, Mattingly JS. Molecular epidemiology of group B searching for the high virulence clone, En: Abstracts of 37<sup>th</sup> Interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy an annual meeting of the society for microbiology, 1997:341
20. Palacios SG, Eskew EK, 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.
21. Ellis S, Kotiw M, Garland SM. Restriction endonuclease analysis of group B streptococcal isolates from two distinct geographical regions. J Hosp Inf 1996;33: 279-287.
22. Chatellier S, Huet H, Kenzi S, Rosenau A, Geslin P, Quentin R. Genetic diversity of rRNA operons of unrelated *Streptococcus agalactiae* strains isolated from cerebrospinal fluid of neonates suffering from meningitis. J Clin Microbiol 1996;34: 2741-2747.

23. Takahashi S, Adderson EE, Nagano Y, Nagano N, Briesacher MR, Brhnsack JF. Identification of a highly encapsulated, genetically related group of invasive type III group B streptococci. *J Infect Dis* 1998;177:116-119.
24. Rolland K, Marois C, Siquier V, Cattier B, Quentin R. Genetic features of *Streptococcus agalactiae* strains causing severe neonatal infections, as revealed by pulsed-field gel electrophoresis and hylb gene analysis. *J Clin Microbiol* 1999;37:1892-1898.
25. Stoll JB, Schuchat A. Maternal carriage of group B streptococci in developing countries. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:499-503.
26. Zaleznik DF, Rench MA, Hillier S, Krhon MA, Platt R, Lee MT. Invasive disease due to group B streptococcus in pregnant women and neonates from diverse population groups. *Clin Infect Dis* 1999;30:276-281.
27. Furtado D. Experimental group B infections in mice: hematogenous virulence and mucosal colonization. *Infect Immun* 1976;13:1315-1320.
28. Ferrieri P, Burke B, Nelson J. Production of bacteremia and meningitis in infant rats with group B streptococcal serotypes. *Infect Immun* 1980;27:1023-1032.
29. Wennerstrom DE, Schutt RW. Adult mice as a model for early onset group B streptococcal disease. *Infect Immun* 1978;19:741-744.
30. Poutrel B, Dore J. Virulence of human and bovine isolates of group B streptococci (types Ia and III) in experimental pregnant mouse models. *Infect Immun* 1985;47:94-97.
31. Rodewald AK, Onderdonk AB, Warren HB, Kasper DL. Neonatal mouse

- model of group B streptococcal infection. *J Infect Dis* 1992;166:635- 639.
32. Baltimore SR, Kasper LD, Vecchitto J. Mouse protection test for group B *Streptococcus* type III. *J Infect Dis* 1979;140:81-88
33. Noel GJ, Santos JI, Vitale JJ. Newborn sepsis following antepartum group B Streptococcal maternal infection in rats. *Pediatr Res* 1985;19:297-299.
34. Molina-López J, Manjarrez-Hernández A, Cravioto-Quintana A. Patogenicidad bacteriana. *Rev Fac Med UNAM* 1998;41:115-120
35. Kok Menno, Pechère JC. Nature and pathogenicity of micro-organisms En: Armstrong D, Cohen J, ed. *Infectious diseases*. 1ª ed. London Mosby. 1999:1.1-1.26
36. Jawetz E, Melnick J, Adelberg E, Brooks GF, Butel J, Ornston LN. Patogenia de la infección bacteriana En: *Microbiología médica 15ª edición en español*. México Manual Moderno. 1996: 151-162.
37. Whittingham G, Wood JM. Reproductive physiology. En: *The mouse in biomedical research volume III*: San Diego California . Academic press 1980: 154-158
38. Kraus LA. Research methodology . En: *The laboratory rat volume II*. : San Diego California . Academic press 1980:2-28.
39. Lennette HE, Balows A, Hausler JW, Shadomi JH. *Manual of clinical microbiology*. 5ª ed. Whashington: American society for microbiology 1991:1026
40. Solorzano-Santos F, Miranda-Navales MG, Leños-Miranda B, Diaz-Ponce H, Palacios-Saucedo G. A blood micro-culture system for the diagnosis of bacteremia in pediatric patients. *Scand J Infect Dis* 1998;30:481-483.
41. Facklam RR, Carey RB. Streptococci and aerococci En: Lennette HE, Balows

- A, Hausler JW, Shadomi JH. Manual of clinical microbiology. 4<sup>o</sup>. ed. Whashington: American society for microbiology 1985:154-174.
42. Young JM, Bresnitz EA, Strom BL . Sample size nomograms for interpreting negative clinical studies . Ann Int Med 1993;99:248-251.
43. Dawson SB, Trapp RG. Basic and clinical biostatisties. Norwalk, Connecticut. Appleton & Langue 1990:142-160.
44. Downie NM, Heath RW. Métodos estadísticos aplicados. México. Harla S.A. de C.V, 1986:229-250.
45. Ley general de salud. Ley de salud para el distrito federal y disposiciones complementarias . Décima tercera edición México: Editorial Porrúa 1996:430-431.
46. Boyer MK, Gotoff PS. Alternative algorithms for prevention of perinatal group B streptococcal infections. Pediatr Infect Dis 1998;17:973-979.