

11262

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRIA EN CIENCIAS MÉDICAS
SEDE: INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

INFECCION POR *Streptococcus agalactiae* SEROTIPO III, AISLADOS DE
MUJERES EMBARAZADAS Y SU ASOCIACIÓN CON RUPTURA
PREMATURA DE MEMBRANAS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A:

DR JESÚS REYNA FIGUEROA

TUTOR: DR JOSE LUIS ARREDONDO GARCIA
COTUTOR: DR ENRIQUE SEGURA CERVANTES



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Jesús Reyna

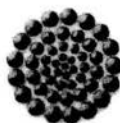
Aguero

FECHA: 1-Marzo-04

FIRMA: [Firma]



Este proyecto de investigación fue desarrollado en el Departamento de Infectología e Inmunología Perinatal del Instituto Nacional de Perinatología.



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de una beca-crédito. Esta nota se incluye en cumplimiento del artículo 36, inciso J del reglamento general del programa de becas-crédito para estudios de postgrado del CONACYT, emitido el 10 de marzo de 1998.

| INDICE | Página |
|----------------------------------|---------------|
| Resumen..... | 5 |
| Introducción..... | 8 |
| Justificación..... | 15 |
| Planteamiento del Problema..... | 16 |
| Pregunta de Investigación..... | 16 |
| Hipótesis..... | 16 |
| Objetivos..... | 16 |
| Diseño del estudio..... | 17 |
| Material y métodos..... | |
| Universo y muestra..... | 18 |
| Grupos de estudio..... | 18 |
| Criterios de inclusión..... | 18 |
| Criterios de exclusión..... | 18 |
| Tamaño de la muestra..... | 19 |
| Análisis estadístico..... | 19 |
| Definición de variables..... | 19 |
| Equipo y material necesario..... | 21 |
| Procedimientos..... | 21 |
| Descripción..... | 21 |
| Aspectos éticos..... | 27 |
| Resultados..... | 28 |
| Discusión..... | 38 |
| Conclusiones..... | 43 |
| Bibliografía..... | 44 |
| Anexos..... | 49 |

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco el apoyo y colaboración del Dr Javier Ortiz Ibarra, sin las cuales, este proyecto no hubiera sido posible

A los doctores José Luis Arredondo y Enrique Segura en la asesoría del proyecto.

A la química Magdalena Beltrán por su ayuda y tiempo dedicado en la parte operacional del trabajo.

A las químicas Graciela Villeda y Guadalupe Bermúdez, por su apoyo en la recolección e identificación de las cepas estudiadas.

RESUMEN

La ruptura prematura de membranas es un evento que se reporta en al menos el 15% de los embarazos; se presenta en forma súbita y favorece el desarrollo de complicaciones maternas y neonatales. Un número importante de estudios han propuesto diferentes teorías acerca de la etiología y fisiopatología para éste fenómeno, en ellos, los resultados proponen la naturaleza multifactorial del evento y ponderan en su presentación argumentos basados en hallazgos de tipo bioquímico y mecánico. Sin embargo el conocimiento definitivo de dichas características y de los fenómenos que la provocan continúa siendo desconocidos.

El componente infeccioso, es por mucho, uno de los principales argumentos estudiados para tratar de explicar la ruptura de membranas antes del inicio del trabajo de parto, es así cómo los *Mycoplasmas*, la *Chlamydia trachomatis* y el *Streptococcus agalactiae* (SGB), son los microorganismos que con mayor frecuencia se reportan en el análisis etiológico. En particular SGB es una bacteria grampositiva que se ha involucrado en una serie de padecimientos de índole perinatal, que ha provocado el interés en su estudio desde los años 60's, con la finalidad de crear mecanismos de prevención y tratamiento más efectivos. Una de las complicaciones a las que se le ha asociado durante el embarazo, es la ruptura prematura de membranas, aunque la variabilidad en los resultados de los estudios que tratan de asociarlo con la presencia de RPM, no permiten explicar el porqué, en pacientes colonizadas con SGB el desenlace no siempre es RPM.

Objetivos.

Establecer la fuerza de asociación entre la colonización genital de mujeres embarazadas con el serotipo III de SGB y la ruptura prematura de membranas en comparación con serotipos de SGB diferentes al III.

Material y métodos

Se realizó un estudio observacional mediante una cohorte retrospectiva en la se serotipificaron cepas de *Streptococcus agalactiae* coleccionadas en el departamento de microbiología correspondientes a mujeres embarazadas.

Después se revisaron los expedientes clínicos de las pacientes a las que correspondía el aislamiento.

Se definieron 2 grupos:

Expuestos. Pacientes en las que se documentó *S. agalactiae* serotipo III en cultivo de muestra cervical o urinaria.

No expuestos. Pacientes en las que se documentó *S. agalactiae* con serotipo Ia, Ib, II, IV, V ó VI, en cultivo de muestra cervical o urinaria.

El tamaño de la muestra se obtuvo calculando diferencia de proporciones del 20% entre expuestos y no expuestos, con una relación de 1 a 2. Se consideraron a estudiar 42 pacientes para el grupo de los expuestos y 84 para el de no expuestos.

El análisis estadístico se realizó mediante medidas de tendencia central y de dispersión. La comparación entre grupos de variables continuas se realizó a través de la prueba t de student. En el caso de variables categóricas la comparación se realizó a través de la prueba de Ji cuadrada o prueba exacta de Fisher, dependiendo de los valores esperados en las tablas de 2 x2.

Para estimar la fuerza de asociación se obtuvo el riesgo relativo con intervalos de confianza del 95% y ji cuadrada con corrección de Yates.

Las potenciales variables confusoras se incluyeron en un modelo de regresión logística múltiple.

Resultados

Se serotificaron un total de 134 cepas de SGB, aisladas de muestras procedentes de pacientes embarazadas, en donde la distribución de los serotipos encontrados mostró con mayor frecuencia al serotipo Ia, seguido por el serotipo III y el Ib. No se encontraron cepas de los serotipos VII y VIII.

En los expuestos se incluyeron 42 mujeres embarazadas, mientras que en los no expuestos se incluyeron 92 mujeres.

La media de edad gestacional, al momento del aislamiento bacteriano fue de 28.05 SDG \pm 7.2. En 113 (84.3%) de los casos los cultivos se tomaron antes de las 36 semanas de gestación y en 21 (15.7%) posterior a esta edad.

La ruptura prematura de membranas se documentó en 59 (44%) del total de los pacientes. En 126 pacientes expuestos (61.9%) se documentó RPM, mientras que en 33 pacientes no expuestos (35.8%) desarrollaron RPM RR 1.73, IC 95%, 1.20-2.40, $p < 0.008$ en el análisis bivariado, con un OR de 3.02, IC 95%, 1.4-6.5, $p = 0.005$, en el análisis multivariado La edad materna es un factor que predispone a RPM, con un riesgo de 2.8, IC 95%, 1.0-8.0, $p = 0.05$ de acuerdo al análisis multivariado

Conclusiones

El serotipo III al igual que la edad materna avanzada son dos factores que se asocian a RPM, con importancia clínica de acuerdo a los resultados encontrados. En nuestra población se puede hablar de la existencia de los serotipos IV, V y VI, que no habían sido descritos con anterioridad en nuestro medio.

INTRODUCCION

La ruptura prematura de membranas (RPM) se considera una complicación seria, tanto en embarazos pretérmino como en los de término, debido a la alta incidencia de partos con complicaciones, corioamniotitis, hemorragia post parto, endometritis e infección neonatal, que se presentan si no se maneja en forma apropiada. Es un evento súbito, no predecible, del cual se tiene un pobre entendimiento de las vías bioquímicas y mecánicas que la producen. (1)

Algunas de las teorías que buscan explicar los mecanismos de presentación de la RPM han sido planteadas por autores que mencionan la participación de citocinas proinflamatorias tales como interleucina 1 (IL-1) y el Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α) soportando la hipótesis que los tejidos de órganos reproductivos responden en forma exagerada a lo pro inflamatorios durante una infección intrauterina (2). También se ha propuesto la participación de metaloproteinasas (MMP) y sus inhibidores titulares en la RPM, los estudios realizados en modelos animales, presentan que durante el parto, las MMP se encuentran incrementadas en forma significativa en las membranas corioamnióticas.(3). La presentación de RPM se reporta entre el 5 al 15% de todos los embarazos. Aproximadamente del 1 al 4% ocurre antes de las 37 semanas y es el antecedente directo de aproximadamente 20 al 50% de los nacimientos pretérmino cuya mortalidad oscila del 75 al 80% de los casos. (1,4,5)

Mediante estudios epidemiológicos y clínicos, se han descrito múltiples factores, endógenos y exógenos, tanto maternos como fetales, que pudieran participar de alguna manera en el desarrollo de RPM (1,5,6) en los que se incluyen

1. Infecciones del aparato genital materno (vaginosis bacteriana, tricomoniasis, *Streptococcus agalactiae* (SGB), gonorrea, infecciones por *Chlamydia trachomatis*, infección por *Mycoplasmas*)
2. Tabaquismo y abuso de sustancias tóxicas.
3. Estado nutricional inadecuado
4. Coito.
5. Causas obstétricas (gestaciones múltiples, polihidramnios, incompetencia cervical, cirugías cervicales, sangrado gestacional y trauma antenatal),

6. Cambios barométricos
7. Muerte celular programada
8. Señales endocrinas fetales para el inicio del parto

Existe una fuerte asociación entre los procesos infecciosos y RPM, apoyada en las cifras encontradas por estudios clínicos prospectivos, que reportan que hasta un 39% de los pacientes con RPM, tienen diagnóstico clínico de corioamnionitis y el 71% de ellos tienen corroboración histopatológica de la infección. (5,6)

Muchas bacterias pueden producir ruptura e infección del amnios por inducción de proteasas, colagenasas y elastasas que degradan colágena y en ocasiones activan la cascada de las prostaglandinas (5). Todo ello resulta en la disminución del grosor y la elasticidad de las membranas, al menos en estudios *in vitro*. Las defensas de la mucosa materna pueden ser alteradas por los niveles altos de mucinasas y sialidasas presentes en la vagina de mujeres con infección vaginal. Estos factores pudieran facilitar el ataque y el ascenso de microorganismos dentro del cérvix, decidua y amniocorion. Otros constituyentes bioactivos encontrados son: butirato, succinato, diaminas, fosfolipasa A2 y C, alteraciones del pH y , enzimas proteolíticas que pueden alterar la homeostasis vaginal. Las citocinas, factor de necrosis tumoral alfa e interleucina 1-B son capaces de inducir síntesis de metaloproteasas y activación dentro de las células del corioamnios. A parte de la activación inflamatoria, los microorganismos pueden tener efectos directos sobre la integridad de las membranas.(1,4,5,7)

Streptococcus agalactiae es la designación específica para el *Streptococcus del grupo B* (SGB) de Lancefield, es un coco grampositivo, que puede ser cultivado en diferentes medios bacteriológicos y aislado como colonizador de diferentes sitios corporales como el aparato respiratorio, genital, urinario y gastrointestinal (5) Se clasifica en serotipos basándose en su polisacárido capsular y sobre su proteína C de superficie (antígeno). Los polisacáridos capsulares son antigenicamente distintos. Ellos son esenciales como factores de virulencia y antígenos protectores. (7)

Las colonias del SGB aisladas en el medio de cultivo sangre de carnero son de 3 a 4 mm de diámetro, produce zonas angostas de beta hemolisis, son gris blanquecinas, planas y mucoides. (8)

Su identificación definitiva requiere la detección del antígeno específico del grupo B común en todas las cepas, con el uso de antisuero hiperinmune.

Algunas pruebas de laboratorio se han utilizado para su identificación, incluyendo prueba de bacitracina, hidrólisis de hipurato, hidrólisis de bilis esculina y la prueba de CAMP. (9) Otros métodos utilizados para la identificación del SGB son: Contrainmunolectroforesis, coaglutinación, aglutinación en látex, inmunoensayo enzimático con anticuerpos monoclonales, inmunofluorescencia y reacción en cadena de la polimerasa (7)

El método original de Lancefield para la identificación serológica del carbohidrato antigénico del grupo B sigue siendo la mejor forma de identificación del SGB, aunque en años recientes, se han desarrollado nuevas técnicas, todos requieren de antisuero hiperinmune específico para identificar el antígeno del grupo B en la célula, en sobrenadantes de cultivos o extractos celulares. (9,10)

Desde hace 30 años diversos estudios han tenido el objetivo de serotipificar las cepas de SGB clasificándolas de acuerdo a la presencia de polisacárido capsular tipo-específico. En los 70's y principios de los 80's, los tipos Ia, Ib y III fueron los más comunes, más recientemente se han identificado 9 serotipos El Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII y VIII, emergiendo el serotipo V, como un causante significativo de sepsis neonatal (8,10,11)

La distribución de los serotipos depende de la zona geográfica a la que nos estemos refiriendo. La variabilidad en las frecuencias y porcentajes no permite que se puedan transpolar resultados de una población a otra. (Tabla 1)

Tabla 1. Distribución de serotipos de acuerdo al área geográfica estudiada.

| | SEROTIPO |
|----------------------------|----------------------------|
| <i>Nigeria</i> | III, Ib, Ic. |
| <i>Tailandia</i> | III, Ia y no tipificables |
| <i>India (Vellora)</i> | II Y Ib |
| <i>India (Nueva Delhi)</i> | II y III |
| <i>Europa</i> | IV |
| <i>Japón</i> | VII y VIII |
| <i>Estados Unidos</i> | III y V |
| <i>México</i> | Ia, Ia/c y no tipificables |

En nuestro país se han realizado algunos estudios con el fin de serotipificar las cepas de SGB tanto en mujeres embarazadas como en enfermedad invasiva neonatal de ellos Solórzano y colaboradores encontraron 10.3% de colonización cervicovaginal en mujeres embarazadas (12). Los serotipos Ia (24.2%) y Ia/c (33%) predominaron, con aislamiento raro del serotipo III (3%), 18.2% fueron no tipificables (13,14)

Recientemente Palacios y colaboradores en una muestra de 57 aislamientos procedentes de 43 neonatos y adultos asintomáticos, así como 14 neonatos y mujeres con enfermedad invasiva identificaron la siguiente distribución de serotipos del SGB: serotipo III 33.3%, tipo II 14%, tipo Ia 14%, Tipo Ib 17.5%, y tipo Ic 12.2% y no pudieron ser tipificadas 8.7%. Este estudio muestra que las cepas serotipo III se encuentran en un porcentaje mayor en México, a lo reportado anteriormente. (15)

En general, SGB se ha sido aislado del aparato genital y/o del aparato gastrointestinal bajo en mujeres embarazadas con una frecuencia de 5 a 40%, y cerca del 30% de ellas tienen infección asintomática en los Estados Unidos. Es el agente causal de infecciones maternas en cerca de 50 000 casos por año, con transmisión vertical al recién nacido del 29 al 72%. (16)

De las pacientes colonizadas con SGB el 40% tendrá RPM, contra 3.8% de las mujeres que no tienen aislamiento alguno. (16,17)

Los estudios acerca del SGB y el riesgo perinatal adverso abarcan desde los que concluyen que la colonización urinaria predispone a un mayor riesgo de presentar RPM y parto pretérmino y los que describen una marcada diferencia entre grupos raciales en cuanto al porcentaje de colonización siendo las mujeres asiáticas las de mas bajo porcentaje, caso contrario con las mujeres de raza negra que tiene los porcentajes más altos (16), hasta los que no encuentran diferencia en la incidencia de RPM en mujeres colonizadas en comparación a las no colonizadas (17-21) y los que encuentran algunos factores para mayor colonización con SGB en pacientes embarazadas como lo es la diabetes gestacional (22,23)

La propuesta de la relación entre la colonización por SGB y resultado gestacional adverso, como bajo peso al nacer o parto pretérmino, ruptura prematura de membranas y óbito fetal, no es un concepto nuevo (23). Desde 1961, autores como Hood y cols (24), describieron la relación entre la colonización del SGB genital y eventos perinatales adversos como el parto pretérmino (25). Pero el primer reporte de la relación entre ruptura prematura de membranas y SGB fue realizado por Reagan en 1981. (26) A partir de entonces diversos estudios se han realizado estableciendo en forma inconsistente dicha relación. Algunos de ellos sugieren que incluso la infección subclínica del canal del parto puede ser responsable de ruptura prematura de membranas (25,28)

Debido a la naturaleza multifactorial del evento, hasta el momento, no se han podido establecer asociaciones sólidas de estos con la presentación de RPM. Lo que condiciona que los estudios encaminados a conocer la asociación de RPM y colonización con SGB no sean lo suficientemente concluyentes.

Las explicaciones que fundamentan porque la colonización con SGB en vagina y recto de embarazadas en ocasiones causa alteraciones perinatales y en otras no y, porque en países como el nuestro el SGB no es una bacteria que se encuentre asociado en forma frecuente a infección neonatal y a ruptura prematura de membranas, se han basado en los siguientes factores, que parecen ser los determinantes más importantes para el desarrollo de enfermedad infecciosa (29,30,31)

1. El estado inmune del huésped
2. La cantidad del inoculo
3. Diferencias en la virulencia de cada cepa. Este aspecto es al que se ha dado mayor relevancia en cuanto a las características fisiopatogénicas del agente, es bien conocido que ciertos serotipos, (III y V), tienen características de virulencia mayores que el resto de los serotipos encontrados, al menos esto se ha concluido en infección invasiva y en meningitis neonatal. Estas características son:
 - a) La existencia de una clona de alta virulencia como la causante de morbilidad y mortalidad perinatal. (32,33)
 - b) El polisacárido capsular es también un factor esencial, su importancia ha sido comprobada en algunos ensayos para identificar su papel en la patogénesis. En este papel primario aparece como evasor de la respuesta fagocítica, ha sido extensivamente estudiado en particular en el serotipo III, el cual causa la mayoría de las infecciones invasivas. Dos proteínas de superficie alfa y beta han sido estudiadas con detalle ya que confieren protección inmune, sin embargo estas proteínas usualmente no se expresan en las cepas serotipo III. En la cápsula también se describe una proteína de superficie celular designada proteína Rib (resistance to proteases immunity; group B) que confiere protección inmune y es expresada por la mayoría de las cepas del serotipo III protegiendo incluso contra cepas de alta virulencia identificadas como clonas de serotipo III (32)
 - c) La beta hemolisina del SGB no parece ser esencial en la patogenicidad. (6, 32)
 - d) SGB produce colagenasas no específicas que se unen, invaden y cruzan las membranas corioamnioíticas

Los reportes coinciden en mencionar que el serotipo III es el que presenta mayor virulencia de acuerdo a las características mencionadas anteriormente, aunque como ya se puntualizó la frecuencia en los aislamientos de este serotipo depende del área geográfica investigada. Esta podría ser parte de la explicación del porque en nuestro país existe una frecuencia baja de complicaciones perinatales.

A pesar de que SGB es una bacteria a la que se le reconoce asociación con ruptura prematura de membranas, los diferentes estudios que han evaluado esta asociación realizados se refieren a la especie en general no habiéndose explorado extensamente la asociación particular de los serotipos, como se ha hecho en padecimientos como la enfermedad neonatal invasiva por SGB, en el que se reconoce al serotipo III, como causante de esta infección hasta en 90% de los casos, en comparación del resto de serotipos cuya participación es en conjunto del 10% (31,32)

En nuestro país se ha identificado al serotipo III, como el principal causante de infección neonatal invasiva (15) coincidiendo con la literatura internacional, en que este serotipo es el que tiene mayor virulencia que no son reconocidas en el resto de los serotipos (32)

JUSTIFICACIÓN

El concepto propuesto de la relación entre la colonización por SGB y RPM no es nuevo, En 1981 Regan (26) y colaboradores notaron relación entre la colonización por SGB del aparato genital y RPM. Sin embargo la coexistencia entre ser portador de esta bacteria y la RPM, ha sido inconsistente, las explicaciones son variadas, aunque la más sobresaliente y que no ha permitido definir en forma contundente la asociación de SGB con RPM es la capacidad insuficiente de muchos estudios para revisar efectos variables, como la densidad de colonización, o la presencia de otros factores de riesgo sobre el resultado del embarazo y en particular en el desarrollo de RPM.

Aunque el SGB es la principal causa de sepsis y meningitis neonatal en algunos países, usualmente coloniza el recto y vagina de las mujeres embarazadas sin consecuencias clínicas para ellas ni para el recién nacido. Se desconoce porqué algunas de estas mujeres desarrollan enfermedad perinatal (entre las que se considera a RPM) y otras permanecen asintomáticas.

Según algunos autores el resultado en sus estudios sugieren que diferencias en la virulencia de cepas de SGB pueden contribuir al desarrollo de enfermedad neonatal. Estas diferencias en la virulencia incluso se han reportado en otras bacterias.

La propuesta particular del trabajo, partiendo de la premisa anterior y considerando que no todas las mujeres embarazadas colonizadas con esta bacteria desarrollan RPM, nos hace plantear la posibilidad de identificar si alguno de los serotipos conocidos por su mayor potencial patogénico (en particular el serotipo III) tiene mayor fuerza de asociación con RPM comparado con el resto de los serotipos. Situación que hasta ahora no ha sido explorada de modo sistemático en la literatura.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Streptococcus agalactiae es uno de los microorganismos más importantes en el desarrollo de infecciones con repercusión perinatal, quizá la asociación más estudiada es la establecida con infección neonatal temprana, de las cuales la mayoría son causadas por el serotipo III.

Sin embargo ante la falta de información con respecto a la relación de la ruptura prematura de membranas y los serotipos específicos de SGB, se piensa que al igual que en enfermedad invasiva neonatal, el serotipo III sea el que con mayor frecuencia se asocie a la presentación de ruptura prematura de membranas, ya que como se mencionó anteriormente es el serotipo con mayores propiedades de virulencia las cuales son capaces de desencadenar manifestaciones infecciosas. Lo que explicaría porque, al igual que en enfermedad neonatal invasiva, no todas las embarazadas colonizadas por SGB presentan RPM.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Cuál es la fuerza de asociación de la colonización por SGB genital de mujeres embarazadas y ruptura prematura de membranas?

HIPOTESIS

La fuerza de asociación de la infección con SGB serotipo III en mujeres embarazadas y ruptura prematura de membranas, es mayor en comparación con la colonización materna por serotipos diferentes al III.

OBJETIVOS.

Establecer la fuerza de asociación entre la colonización genital de mujeres embarazadas con el serotipo III de SGB y la ruptura prematura de membranas en comparación con serotipos de SGB diferentes al III.

DISEÑO DEL ESTUDIO

El diseño planteado es el de cohorte de acuerdo a la direccionalidad del estudio, en la que buscamos de primera intención la causa, exposición o factor a estudiar (colonización materna por el serotipo III) y posteriormente evaluamos la presencia o no del efecto (RPM), y es retrospectivo por la dirección en la recolección de datos. (figura 1)

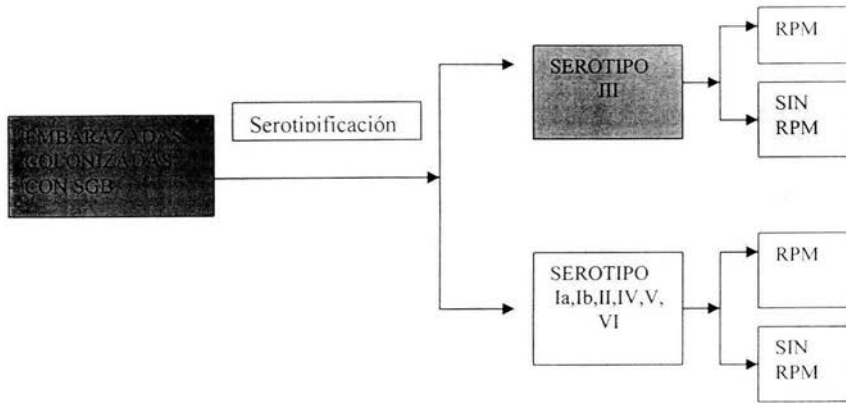


Figura 1. Direccionalidad del estudio.

MATERIAL Y METODOS.

UNIVERSO Y MUESTRA.

Se estudiaron las cepas de SGB coleccionadas en el cepario del laboratorio de microbiología del Departamento de Infectología del INPer, a partir del año 1990 a julio del 2003, que correspondieran a mujeres embarazadas. Y las cuales se serotipificaron para crear los grupos de estudio.

Posteriormente mediante la revisión de los registros del laboratorio, se obtuvo el nombre, número de registro médico, fecha y sitio del aislamiento del SGB; de donde se seleccionaron los pacientes cumplieran con los criterios de inclusión.

GRUPOS DE ESTUDIO

Después de la serotipificación se definieron dos grupos

Expuestos Pacientes en las que se documentó aislamiento de SGB serotipo III.

No expuestos Pacientes en las que se documentó SGB de cualquiera de los siguientes serotipos: Ia, Ib, II, IV, V y VI.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- a) Mujeres embarazadas
- b) Aislamiento de SGB de cultivo vaginal o urocultivo
- c) Con cultivo realizado durante el embarazo
- d) Resolución del embarazo en el INPer
- e) Con expediente clínico en archivo

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- a) Pacientes con diagnóstico dudoso de RPM o que se haya realizado el mismo únicamente por clínica.
- b) Antecedentes de intervención quirúrgica cervical, diagnóstico prenatal de malformaciones fetales.
- c) En las que se documentó el uso de antimicrobianos al menos 30 días antes de la resolución del embarazo.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se obtuvo calculando diferencia de proporciones entre dos poblaciones, con una relación de 1 caso considerado expuesto por 2 casos considerados no expuestos. Debido a que en la literatura no existen reportes que evalúen particularmente el porcentaje de colonización de cada serotipo de SGB, se tomó como alternativa el considerar como porcentaje de expuestos la cifra reportada de RPM en presencia de SGB, y considerar la cifra de no expuestos el porcentaje de RPM que se conoce cuando la paciente no está colonizada por SGB.

Enfermos expuestos: Pacientes con RPM colonizadas con SGB 30%.

Enfermos no expuestos: Pacientes con RPM sin colonización 10%.

Calculando una diferencia de proporciones entre ambas del 20%. Un intervalo de confianza del 95%, poder 80%, Fuerza de asociación de 3.

Se estableció la muestra en 42 expuestos y 84 no expuestos.

El cálculo del tamaño de muestra se corroboró mediante el programa estadístico Epi info. versión 6.04 CDC

Análisis Estadístico:

Se realizó mediante medidas de tendencia central y de dispersión de las diferentes variables epidemiológicas. La comparación entre grupos de variables continuas se realizó a través de la prueba t de student.

En el caso de variables categóricas la comparación se realizó a través de la prueba de Ji cuadrada o prueba exacta de Fisher, dependiendo de los valores esperados en las tablas de 2 x2.

Para estimar la fuerza de asociación se obtuvo el riesgo relativo con intervalos de confianza al 95% y ji cuadrada con corrección de Yates.

Las potenciales variables confusoras se incluyeron en un modelo de regresión logística múltiple para determinar el efecto que tiene cada una de ellas sobre la variable de desenlace.

6.2.8 VARIABLES

Independiente: *Serotipo de S. agalactiae*

Dependiente. Ruptura prematura de membranas

Confusoras:

- 1) Edad materna mayor o igual a 35 años.
- 2) Haber tomado el cultivo antes de la semana 36 de gestación
- 3) Enfermedades crónico degenerativas (Lupus, Enfermedad hipertensiva del embarazo, diabetes mellitus)
- 4) Presencia de otros microorganismos concomitantes en el cultivo.
- 5) No administrar tratamiento vs SGB

DEFINICIONES OPERATIVAS

Se definió ruptura prematura de membranas

Cuando en el expediente clínico se tuvieran registrados además de la exploración física positiva al menos uno de los siguientes criterios:

- 1) Papel nitrazina positivo: Que se pone azul en presencia de líquido amniótico alcalino
- 2) Cristalografía positiva. Colocando una muestra sobre un portaobjetos, secándola al aire y comprobando si cristaliza en helechito

Se definió serotipo cuando el preparado del microorganismo, reaccionó aglutinando con el antisuero específico en un tubo capilar único durante los primeros 30 minutos de realizada la prueba.

EQUIPO Y MATERIAL NECESARIO

RECURSOS HUMANOS Y MATERIALES.

En el presente estudio se utilizaron los siguientes recursos.

Humanos: Alumno de maestría, tutor y 2 asesores.

Materiales. Antiseros contra los diferentes serotipos, medios de cultivo agar sangre, panel para MicroScan de grampositivos, colorantes para tinción de Gram, aparato de MicroScan, microscopio, estufa para incubación, tubos secos, cloruro de sodio, plastilina, tubos capilares, asas bacteriológicas, porta objetos y cubre objetos, medio Todd Hewitt, ácido clorhídrico, púrpura de bromocresol, pepsina, peróxido de hidrógeno, tubos para centrifuga, conservador, tubos cónicos graduados, mechero de Bunsen, viales de 2 ml, gasas y papel.

7.7 PROCEDIMIENTOS A SEGUIR

a) Las cepas coleccionadas se manejaron de la siguiente manera

- 1) Descongelamiento
- 2) Resiembra en medio Agar sangre de carnero al 5%
- 3) Incubación a 37 grados en medio aeróbico durante 24-48 horas (figura 2 y 3)
- 4) Comprobar crecimiento en placa (figura 4)
- 5) Verificar hemólisis

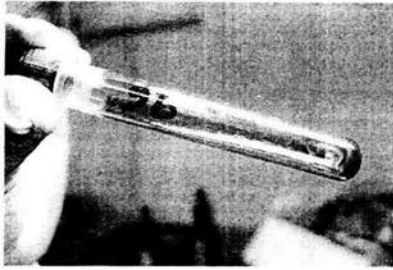
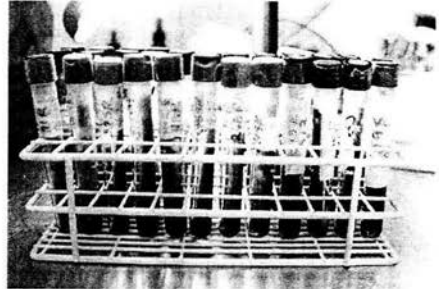


Figura 2 y 3 se observa el aislamiento de las colonias de SGB antes de la obtención antigénica



- 6) Tinción de Gram.
- 7) Prueba de la catalasa.
- 8) Hemólisis.

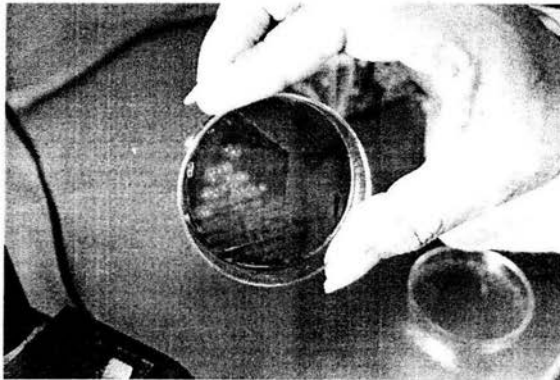


Figura 4. Se observa el crecimiento de la bacteria y la hemólisis tipo beta de las colonias de SGB

- 9) Identificación por medio de método automatizado. (figura 5-8)

PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACION AUTOMATIZADA DE
Streptococcus agalactiae

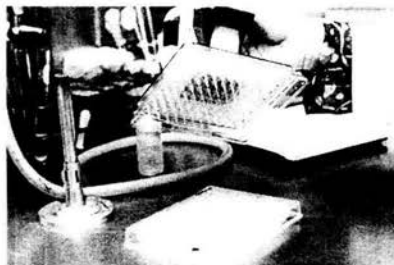


Fig 5 y 6 Inoculación de la bacteria (cepa pura) en paneles de identificación para bacterias grampositivas

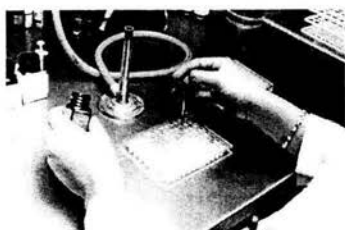


Fig 7 Aplicación de reactivos antes de la lectura



Fig 8 Lectura del panel por el método automatizado

Serotipificación una vez identificado como *Streptococcus agalactiae*, la serotipificación se realizó utilizando antisueros obtenidos de conejos (Figura 9 y 10), elaborados por el STATENS SERUM INSTITUT Dinamarca para los serotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII y VIII bajo el siguiente procedimiento:



Figura 9. Vial con antisuero contra el serotipo III



Figura 10. Lote de antisueros utilizados para la serotipificación de las cepas.
(9 serotipos)

Obtención del Extracto. (Antígeno completo), se realizó mediante la técnica descrita por Lancefield y Eagon (8) que consiste en:

- i) Cultivar cada cepa en 40 ml de caldo Todd Hewitt y realizar sedimentación por centrifugación.
- ii) Al paquete celular resultante se le agrega 0.8 ml de ácido clorhídrico (HCl) al 0.2%
- iii) Someter a ebullición en baño de agua por 10 minutos;
- iv) separándose el sobrenadante por centrifugación y decantándose en viales de 2 ml que contengan una gota de púrpura de bromocresol como indicador de pH, ajustándose este a 7.6 a 8.2 con hidróxido de sodio (Na OH) 1N y 0.2 N.
- v) Se adiciona posteriormente mertiholate a una concentración de 1: 10,000 como conservador. Refrigeración a -20 grados hasta su uso.

Precipitación.

- a) Se realiza en tubos capilares de vidrio con una longitud de 7.5 cm y diámetro de 1.5 mm. Se requieren aproximadamente 100 UI de antisuero y 50 UI del extracto antigénico.
- b) La técnica se estandariza con extractos de las cepas prototipo.
- c) Es necesario centrifugar los antisueros antes de su uso para evitar la presencia de precipitación inespecífica tempranamente.
- d) El capilar se carga en el primer antisuero hasta que la columna asciende 2 cm, se seca la parte externa con papel o gasa,
- e) Se adiciona un centímetro del antígeno, evitando burbujas de aire entre ellos.

- f) Por cambio de posición a la horizontal se coloca el líquido en el centro del tubo, sellándose el extremo de enterada con plastilina.
- g) Se coloca en posición vertical con el extremo sellado en la parte superior.
- h) El mismo procedimiento se realiza con los restantes antisueros.
- i) Mediante la observación reiterada de los capilares se detecta la zona nebulosa en la interfase antígeno anticuerpo (el precipitado), que se puede extender rápidamente a lo largo de toda la columna.
- j) El tiempo óptimo en que se encuentra la lectura de la precipitación es como máximo dos minutos, después de este lapso se observa con frecuencia el precipitado en dos o más tubos.
- k) Solo en los casos en que el precipitado se presenta tardíamente, pero dentro de los 30 minutos y fue el único, se considera positivo para el serotipo en cuestión.
- l) Se debe colocar un control positivo con antisuero del grupo en el cual todas deben ser positivas.

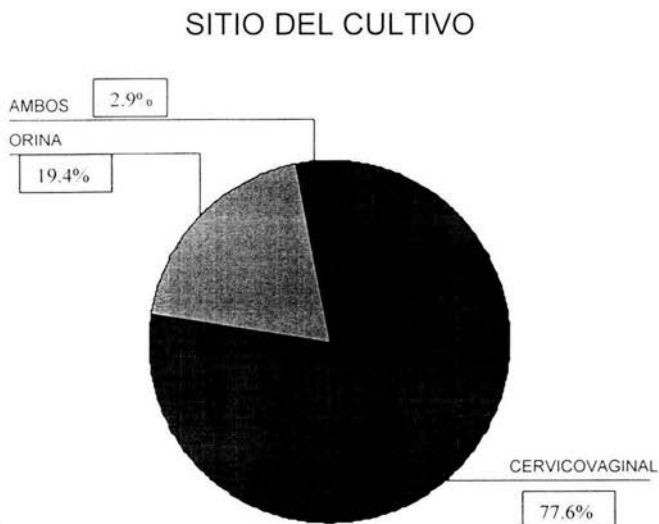
CONSIDERACIONES ETICAS

Debido a que el trabajo consintió en el manejo de cepas bacterianas ya aisladas y la revisión de expedientes clínicos y que el uso de antisueros y reactivos no son de aplicación en humanos, se consideró una investigación sin riesgo para pacientes, por lo que no se elaboró consentimiento informado. El protocolo de investigación fue aprobado y avalado por los comités de investigación y de ética del Instituto Nacional de Perinatología.

RESULTADOS

Se identificaron un total de 550 cultivos de SGB en el cepario del laboratorio de microbiología, de las cuales el 65% de ellas (276) correspondieron a bacterias aisladas de muestras clínicas de mujeres embarazadas. Un total de 134 pacientes (41.6%) cumplieron criterios de selección.

Las muestras obtenidas fueron: 104 cultivos vaginales, 26 cultivos urinarios y 4 tuvieron aislamiento en ambas muestras. (Gráfica 1)



Gráfica 1. Porcentaje de aislamientos en muestras clínicas de mujeres embarazadas.

La distribución de los serotipos encontrados mostró con mayor frecuencia al serotipo Ia, seguido por el serotipo III y el Ib. No se encontraron en esta muestra cepas de los serotipos VII y VIII.

En la tabla II se describe la frecuencia y porcentaje de aislamiento de acuerdo al serotipo encontrado. Mientras que algunas imágenes de la precipitación en capilar se observan en las figuras 11-12.

Tabla II distribución de los serotipos

| | Frecuencia | % |
|--------------|-------------------|--------------|
| <i>NT</i> | 02 | 1.5 |
| <i>1A</i> | 51 | 38.1 |
| <i>1B</i> | 20 | 14.9 |
| <i>II</i> | 08 | 6.0 |
| <i>III</i> | 43 | 32.1 |
| <i>IV</i> | 01 | 0.7 |
| <i>V</i> | 04 | 3.0 |
| <i>VI</i> | 05 | 3.7 |
| <i>VII</i> | 00 | 0.0 |
| <i>VIII</i> | 00 | 0.0 |
| Total | 134 | 100.0 |

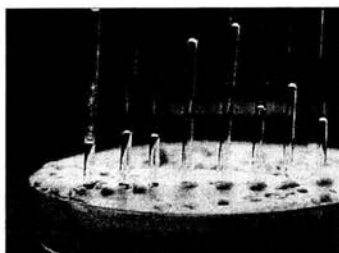


Figura 11 Precipitación con el antisuero contra el serotipo Ia



Figura 12 Precipitación con el antisuero contra el serotipo III

Al realizar la asignación de grupos, en el número 1 se incluyeron 42 mujeres embarazadas, mientras que en el grupo 2 se incluyeron 92.

El promedio de la edad materna fue de 25.7 años, con rango de 14 a 40 años, 68 de ellas (50.7%) fueron primigestas, 35 (25.4%) secundigestas, y 32 (23.8%) con tres gestas ó más. La tabla III muestra las características demográficas de la población en estudio, sin encontrarse diferencia significativa de las variables entre ambos grupos.

Tabla III Características demográficas de la población en estudio.

| Características | Expuestos n = 42 | No expuestos n= 92 | p |
|------------------------|---------------------|-----------------------|------|
| Edad (años) | 25.9±7.5 | 25.6±7.1 | 0.3 |
| <u>No. gestaciones</u> | | | |
| 1 | 21(50%) | 47(51.1%) | 0.5 |
| 2 ó más | 21(50%) | 45(49.9%) | |
| <u>No. Partos</u> | | | |
| 0 | 26(61.9%) | 43(46.7%) | 0.1 |
| 1 | 12(28.6%) | 27(29.3%) | |
| 2 ó más | 4 (9.5%) | 22(23.9%) | |
| <u>No. Abortos</u> | | | |
| 0 | 25(59.5%) | 71(77.2%) | 0.08 |
| 1 | 10(23.8%) | 13(14.1%) | |
| 2 ó más | 7(16.7%) | 8(8.7%) | |
| <u>No. cesáreas</u> | | | |
| 0 | 16(38.1%) | 36(39.1%) | 0.6 |
| 1 | 23(54.8%) | 45(48.9%) | |
| 2 ó más | 3(7.1%) | 11(12.0%) | |
| <u>No. Obitos</u> | | | |
| 0 | 39(92.9%) | 88(95.7%) | 0.5 |
| 1 | 3 (7.1%) | 4(4.3%) | |
| 2 ó más | 0 | 0 | |

La media de edad gestacional, al momento del aislamiento bacteriano fue de 28.05 SDG ± 7.2. En 113 (84.3%) de los casos los cultivos se tomaron antes de las 36 semanas de gestación y en 21 (15.7%) se tomaron de la semana 36 en adelante.

Tomando en cuenta la presencia o no de ruptura prematura de membranas 75 pacientes (56%) no la presentaron, mientras que 59 (44%) se diagnosticó RPM. En el grupo I un total de 26 pacientes (61.9%) se documentó RPM, mientras que en el grupo II, en 33 pacientes (35.8%) se documentó RPM.

De las 59 pacientes consideradas con RPM, en 39 (66%) se realizó el diagnóstico mediante papel nitrazina y 20 (34%) mediante cristalografía (Tabla IV)

Tabla IV Cantidad de pacientes en relación con el grupo encontrado

| | Sin ruptura | Con ruptura | Total |
|-----------------|--------------------|--------------------|--------------|
| Grupo I | 16 | 26 | 42 |
| Grupo II | 59 | 33 | 92 |
| Total | 75 | 59 | 134 |

Otros microorganismos encontrados (tabla V-VII) en forma concomitante con SGB fueron: Hongos (*Candida spp* 22), Bacterias (*G. vaginalis* 22, *E.coli* 1) Parásitos (*Trichomonas vaginalis* 2. Mientras que 11 pacientes tuvieron diagnóstico de infección concomitante con los siguientes microorganismos: Virus (Virus del papiloma humano 5, Virus de la inmunodeficiencia humana 1, Citomegalovirus 1, Parvovirus B19 1, Virus del herpes simple 2, *Toxoplasma gondii* 1).

Tabla V, Microorganismos aislados encontrados concomitantemente con SGB

| | Frecuencia | % |
|------------------|-------------------|----------|
| Ninguno | 85 | 63.4 |
| Hongos | 16 | 11.9 |
| Virus | 6 | 4.5 |
| Bacterias | 16 | 11.9 |
| Parásitos | 2 | 1.5 |
| Dos o más | 9 | 6.7 |
| Total | 134 | 100.0 |

Tabla VI Distribución de los microorganismos encontrados de acuerdo a los grupos.

| Microorganismos | Grupo I | Grupo II | Total |
|------------------------|----------------|-----------------|--------------|
| <i>Ninguno</i> | 32 | 53 | 85 |
| <i>Hongos</i> | 01 | 15 | 16 |
| <i>Virus</i> | 03 | 03 | 06 |
| <i>Bacterias</i> | 05 | 11 | 16 |
| <i>Parásitos</i> | 00 | 02 | 02 |
| <i>Dos ó más</i> | 01 | 08 | 09 |
| Total | 42 | 92 | 134 |

Tabla VII Microorganismos en relación a RPM

| Microorganismos | RPM | NO RPM | Total |
|------------------------|------------|---------------|--------------|
| <i>Ninguno</i> | 40 | 45 | 85 |
| <i>Hongos</i> | 07 | 09 | 16 |
| <i>Virus</i> | 03 | 03 | 06 |
| <i>Bacterias</i> | 06 | 10 | 16 |
| <i>Parásitos</i> | 00 | 02 | 02 |
| <i>Dos ó más</i> | 03 | 06 | 09 |
| Total | 59 | 75 | 134 |

El uso de antimicrobianos en las pacientes se distribuyó de la siguiente manera: 51(38.1%) no recibió tratamiento alguno, En el resto de los pacientes se indicaron 110 antimicrobianos, 25 se administraron ampicilina como quimioprofilaxis intraparto, a 39 se administró ampicilina durante la consulta prenatal por aislamiento de SGB y 46 se administraron por otra causa durante las consultas prenatales (clindamicina 21, ketoconazol 13, aciclovir 1, miconazol 2, gentamicina 2, macrodantina 3, penicilina sódica cristalina 1, cefalotina 1, cefazolina 1, antiretrovirales 1) (Tabla VIII-X)

Tabla VIII Distribución de RPM y de grupos, en relación a las indicaciones para el uso de antimicrobianos

| TRATAMIENTO | RPM | | SEROTIPO III | |
|--------------------|------------|-----------|---------------------|-----------|
| | <i>SI</i> | <i>NO</i> | <i>SI</i> | <i>NO</i> |
| <i>Ninguno</i> | 16 | 35 | 17 | 34 |
| <i>Profilaxis</i> | 06 | 07 | 03 | 10 |
| <i>Aislamiento</i> | 21 | 20 | 11 | 30 |
| <i>Ambos</i> | 13 | 04 | 08 | 09 |
| <i>Otra causa</i> | 03 | 09 | 03 | 09 |

TABLA IX PRESENCIA DE RPM DE ACUERDO AL GRUPO DE ANTIBIOTICOS

| ANTIBIOTICO | RPM | |
|-----------------------|------------|-----------|
| | <i>SI</i> | <i>NO</i> |
| <i>Ninguno</i> | 16 | 34 |
| <i>Betalactámicos</i> | 27 | 18 |
| <i>Otros</i> | 08 | 19 |
| <i>Combinación</i> | 08 | 04 |
| <i>Total</i> | 59 | 75 |

Tabla X

TABLA X DISTRIBUCION DE ANTIBIOTICOS DE ACUERDO AL SEROTIPO

| ANTIBIOTICO | SEROTIPO | |
|-----------------------|----------|------|
| | III | OTRO |
| <i>Ninguno</i> | 16 | 34 |
| <i>Betalactámicos</i> | 17 | 28 |
| <i>Otros</i> | 5 | 22 |
| <i>Combinación</i> | 4 | 08 |
| <i>Total</i> | 42 | 92 |

En 88 (65.7%) pacientes no se encontró ninguna enfermedad concomitante, en 18 (13.4%) se documentaron enfermedades crónico degenerativas (diabetes mellitus 8, LES 3, toxicomanías (cocaína) 2, varices esofágicas 1, cardiopatía reumática 1, síndrome depresivo 1, síndrome antifosfolipido 1, hipertensión arterial 1)

En 7 (5.2%) se encontró como enfermedad ginecológica miomatosis uterina y en 21 (15.7%) enfermedades de tipo obstétrico (Enfermedad hipertensiva inducida por el embarazo 8, oligohidramnios 1, diabetes gestacional 6, Rh negativo no isoimmunizada 1, incompetencia istmo-cervical 1, corioamnioitis 1, fiebre puerperal 3). (tabla XI-XIII)

Tabla XI . Enfermedades concomitantes en pacientes colonizadas

| | <i>Ninguna</i> | <i>Crónico Degenerativas</i> | <i>Ginecológicas</i> | <i>Obstétricas</i> | <i>Total</i> |
|-----------------|----------------|------------------------------|----------------------|--------------------|--------------|
| <i>Grupo I</i> | 28 | 7 | 3 | 4 | 42 |
| <i>Grupo II</i> | 60 | 11 | 4 | 17 | 92 |
| <i>Total</i> | 88 | 18 | 7 | 21 | 134 |

TABLA XII Rpm y Enfermedad crónico degenerativa

| <i>ENFERMEDAD</i> | <i>RPM</i> | | <i>total</i> |
|------------------------------|------------|-----------|--------------|
| | <i>SI</i> | <i>NO</i> | |
| <i>Ninguna</i> | 39 | 49 | 88 |
| <i>Crónico-degenerativas</i> | 07 | 11 | 18 |
| <i>Ginecológicas</i> | 03 | 04 | 07 |
| <i>Obstétricas</i> | 10 | 11 | 21 |
| <i>Total</i> | 59 | 75 | 134 |

TABLA XIII Enfermedad concomitante y serotipo

| <i>ENFERMEDAD</i> | <i>serotipo III</i> | | <i>total</i> |
|------------------------------|---------------------|-----------|--------------|
| | <i>SI</i> | <i>NO</i> | |
| <i>Ninguna</i> | 28 | 60 | 88 |
| <i>Crónico-degenerativas</i> | 07 | 11 | 18 |
| <i>Ginecológicas</i> | 03 | 04 | 07 |
| <i>Obstétricas</i> | 04 | 17 | 21 |
| <i>Total</i> | 42 | 92 | 134 |

Al analizar mediante el análisis univariado de los potenciales factores de riesgo tales como edad materna, la semana de gestación al momento del aislamiento, el sitio del cultivo, el serotipo, la presencia de otros microorganismos diferentes a SGB, el uso de antimicrobianos en el tratamiento de SGB y la presencia de enfermedades maternas, se encontró significancia en la presencia de serotipo III y en la edad materna avanzada. Mismos que se incluyeron en un modelo de regresión logística multivariado (tabla XIV).

Tabla XIV Analisis univariado de los factores de riesgo encontrados en relación a RPM

| Factor | RPM | | RR | IC | p |
|------------------------------|-----|----|------|-----------|-------|
| | si | no | | | |
| <u>Edad materna</u> | | | | | |
| >35 años | 11 | 6 | 1.58 | 1.04-2.38 | 0.11 |
| <35 años | 48 | 69 | | | |
| <u>SDG al Dx*</u> | | | | | |
| < 36 | 54 | 69 | 0.90 | 0.49-1.90 | 0.5 |
| >36 | 5 | 6 | | | |
| <u>Sitio Cultivo</u> | | | | | |
| Cervicovaginal | 48 | 58 | 1.15 | 0.70-1.91 | 0.7 |
| Otro sitio | 11 | 17 | | | |
| <u>Serotipo</u> | | | | | |
| III | 26 | 16 | 1.73 | 1.20-2.40 | 0.008 |
| Otro serotipo | 33 | 59 | | | |
| <u>Otros Microorganismos</u> | | | | | |
| Otro microorganismo | 19 | 29 | 0.85 | 0.56-1.29 | 0.5 |
| Ninguno | 40 | 46 | | | |
| <u>Tx vs SGB</u> | | | | | |
| No | 21 | 46 | 0.55 | 0.37-0.83 | 0.005 |
| Si | 38 | 29 | | | |
| <u>Enfermedades maternas</u> | | | | | |
| Con enfermedad | 20 | 26 | 0.98 | 0.65-1.47 | 0.9 |
| Sin enfermedad | 39 | 49 | | | |

| Regresión logística multivariada de los factores significativos para RPM | | | | |
|--|------|------|---------|-------|
| Factor | Wald | OR | IC | p= |
| Serotipo III | 8.01 | 3.02 | 1.4-6.5 | 0.005 |
| Edad materna | 4.13 | 2.80 | 1.0-8.0 | 0.05 |

9. DISCUSIÓN

Estudios previos evalúan la asociación de la colonización de SGB en mujeres embarazadas con la RPM; Fue Regan en 1981 (26) quien la describe por primera vez, al establecer que los porcentajes de RPM en pacientes embarazadas colonizadas por SGB eran mayores a los encontrados en mujeres embarazadas en las que no se documentó colonización (15% vs. 3%), posterior a el, otros como Moller (25) encontraron incrementos en las cifras de RPM hasta en un 20% en comparación con pacientes no colonizadas. . Otros como Kubota (20) no encontraron diferencias.

La explicación dada por la variabilidad en los resultados, es la dificultad para controlar un número importante de factores que pueden impactar sobre la interpretación de los mismos, como son: la colonización intermitente y la dificultad para definir con certeza la erradicación del SGB posterior al uso de antibióticos (20). Por lo que desde hace algunos años, maniobras tales como el uso de antimicrobianos, se consideran útiles únicamente en situaciones especiales (Ej. El uso de quimioprofilaxis contra SGB periparto, que permite disminuir la carga bacteriana de SGB materna en aparato genitourinario, y permite prevenir la enfermedad neonatal temprana). Pero no para la generalidad de las situaciones (Ej. prevención de RPM, prevención de parto pretérmino) (35-39)

La mención de factores, como el uso de antimicrobianos en el embarazo, muchos de ellos con actividad antimicrobiana contra SGB , y la certeza de la existencia o no del SGB al momento de la RPM o al momento de la resolución del embarazo, son en si, dos de las principales cuestiones para la credibilidad del estudio que realizamos.

El explicar como influyen estas dos variables en los resultados es difícil, quizá algunos argumentos a favor de nuestro estudio serían dados por reportes que mencionan que el realizar cultivos durante el embarazo es imperfecto, debido a que podemos o no aislarlo independientemente del uso de antimicrobianos. (34-40) En la actualidad es aceptado que es extremadamente difícil o imposible erradicar SGB de las mucosas (40,41), especialmente del intestino bajo, y la

recolonización vaginal después de un curso de antibióticos es extremadamente común, como inicialmente lo reportó Hall y cols. (38)

El manejo de la ruptura prematura de membranas antes de su presentación, cuando está asociada a cultivos cervicales positivos para SGB, es muy difícil. Tanto así, que las recomendaciones de organismos como la CDC, no reconocen la utilidad del tratamiento antimicrobiano, en la prevención, ya que no modifica el curso, ni el porcentaje de presentación(40,42).. Estudios prospectivos de un estudio multicentrico entre los que se incluyeron 14 000 mujeres de entre 23 y 26 semanas de gestación, se compararon las tasas de prematuridad, RPM y septicemia neonatal entre mujeres positivas para SGB y las negativas, entre las que recibieron antimicrobianos eficaces, las tasas de las variables a estudiar fueron esencialmente idénticas a la de mujeres sin colonización. (22) Estos argumentos apoyan que el uso de antimicrobianos, aún teniendo actividad contra el SGB no modifican el porcentaje de presentación de RPM y que aunque puede ser un factor que modifique de alguna manera los resultados, esta es mínima.

El objetivo del estudio fue conocer el riesgo que tiene una paciente embarazada colonizada con el serotipo III de SGB, en comparación con las que están colonizadas por un serotipo diferente al III ya que a pesar de la serie de estudios encontrados, ninguno de ellos explora la asociación particular de los serotipos con RPM, por lo que los resultados que encontramos no se pueden comparar con otros similares, la significancia encontrada nos hace suponer que efectivamente el serotipo III, por ser el de mayor virulencia, tiene una mayor fuerza de asociación con RPM que el resto de los serotipos (riesgo de 3). Aunque se debe establecer, que la edad materna avanzada también resultó un factor en el análisis multivariado con significancia (riesgo de 2), el resto de las variables que consideramos confusoras, fueron estadísticamente no significativas.

Los argumentos que pueden soportar nuestra hipótesis y por consecuencia la realización del estudio, a pesar de que en la literatura no existen reportes similares son los siguientes: Aunque el SGB es la principal causa de complicaciones infecciosas en el ámbito perinatal, en algunos países, es bien conocido que no en todos los casos de colonización en recto y/o vagina de las mujeres embarazadas

existen consecuencias clínicas para ella ni para el recién nacido. Se desconoce porque algunas de estas pacientes presentan complicaciones (en las que se incluye RPM) y porqué otras cursan el embarazo sin problema alguno.

A pesar de que clásicamente se conoce a la RPM como una entidad de causas múltiples (multifactorial), en las que se incluyen alteraciones inmunológicas, enzimáticas, traumáticas e inflamatorias, son los procesos de índole infeccioso los descritos en forma constante en la literatura médica, es así como micoplasmas, Chlamydia y SGB fisiopatológicamente son capaces de influir en la respuesta inmunológica, la acción enzimática y la respuesta inflamatoria. (4,5)

La explicación infecciosa y particularmente por SGB, sin embargo, no ha sido constante en los resultados publicados. Aparentemente esos estudios sugieren que existen diferencias en la virulencia de las cepas de SGB que pueden contribuir al desarrollo de enfermedad. (7, 43)

Muchos investigadores han evaluado el grado de infiltración inflamatoria y han tratado de correlacionarse con los hallazgos clínicos. SGB provoca pequeñas reacciones inflamatorias, pero que pueden producir enfermedades severas tanto en la madre como en el recién nacido. Aparentemente SGB penetra más fácilmente las membranas placentarias que otras bacterias, como las coniformes y el gonococo. Aparentemente la intensidad de la inflamación está en relación con las características de virulencia del SGB. Lo que provoca, según algunos autores, que al penetrar en las membranas el SGB virulento, aumente la respuesta inflamatoria, ocasionando la ruptura de las mismas en primer lugar y después la amnioititis. (7,43,44)

Algunas diferencias conocidas que hacen al serotipo III el más virulento, en estudios realizados con cepas de pacientes con infección invasiva y meningitis neonatal son:

La existencia de una clona de alta virulencia como la causante de morbilidad y mortalidad perinatal. (29-31)

El polisacárido capsular que ha sido comprobada en algunos ensayos para identificar su papel en la patogénesis, como evasor de la respuesta fagocítica. ha sido extensivamente estudiado en particular en el serotipo III, el cual causa la

mayoría de las infecciones invasivas. Dos proteínas de superficie alfa y beta que han sido estudiadas con detalle ya que confieren protección inmune, sin embargo estas proteínas usualmente no se expresan en las cepas serotipo III. (43,44)

Los reportes coinciden en mencionar que el serotipo III es el que presenta mayor virulencia de acuerdo a las características mencionadas anteriormente, aunque como ya se puntualizó la frecuencia en los aislamientos de este serotipo depende del área geográfica investigada, sin ser constante en dichas regiones. En países como el nuestro esta podría ser parte de la explicación del porque existe una frecuencia baja de complicaciones perinatales, en las que se incluye ruptura prematura de membranas secundarias a la infección con esta bacteria.

Otro punto de interés en el estudio, debido a que en la actualidad la clasificación del SGB por medio de tipos capsulares ha desprendido nuevos serotipos que están siendo reconocidos a nivel mundial, como los serotipos como el VI, VII y VIII, que se han aislado de muestras clínicas de pacientes, dando así un cambio epidemiológico, en lo que hasta hace algunos años no se conocía. En nuestro país reportes de serotipificación realizadas ubican al serotipo Ia, como el más frecuente, aunque las cifras de serotipo III han sido variable de un estudio a otro independientemente de la forma de extraer el antígeno capsular. (12,13, 15, 32-33)

Particularmente en la muestra estudiada, encontramos serotipos Ia, Ib, II, III, IV, V y VI, no encontramos serotipos VII y VIII. La novedad en este caso es el aislamiento del serotipo IV, V y VI, que no habían sido descritos en nuestro país. Existen antecedentes en México de serotipificación, incluso en el mismo Instituto Nacional de Perinatología, donde Solórzano y colaboradores reportan haber encontrado serotipos Ia, Ia/c, Ib/c, II, raramente serotipo III, y hasta un 18.2% de cepas no tipificables. (13). Explicando la diferencia de los aislamientos con los de otros países por la baja frecuencia de infección causada por este microorganismo en nuestro país (13,14,15). En estos estudios llama la atención el alto porcentaje de cepas no tipificables, ya que en estudios como el de Walsch (11) la reporta en 1%. En nuestra muestra aunque no es representativa para considerarla un dato que epidemiológicamente deba ser tomado en cuenta, por no ser el objetivo del

estudio, la cifra de cepas no tipificables en porcentaje es del 1.5% similar al estudio referido con anterioridad. Obviamente se debe considerar que la población fue seleccionada y como mencionamos, no es representativa de la población mexicana.

Sin embargo consideramos valioso, la descripción de el serotipo IV, V y VI en nuestra población.

CONCLUSIONES

El serotipo III al igual que la edad materna avanzada son dos factores que se asocian a RPM, con importancia clínica de acuerdo a los resultados encontrados. Esto no significa que el aislamiento de un serotipo diferente al III, deba ignorarse, para las recomendaciones de profilaxis vigentes por el CDC. A pesar que diferentes estudios han evaluado que no existe diferencia entre el manejo antimicrobiano contra SGB en relación a la disminución en la presentación de RPM, probablemente un estudio que evalué el tratamiento al existir el serotipo III sea interesante, o incluso el evaluar tratamientos profilácticos a largo plazo como ya algunos autores lo han propuesto específicamente cuando existe el serotipo III puedan ser opciones al tratar de disminuir la incidencia de RPM en presencia de SGB.

Por otra parte es interesante describir que en nuestra población se puede hablar de la existencia de los serotipos IV, V y VI, que no habían sido descritos con anterioridad en nuestro medio

BIBLIOGRAFIA.

1. Mercer MB, Lewis R. Preterm labor and preterm premature rupture of membranes. *Infect Dis Clin North Am.* 1997; 11: 177-201
2. Hernandez GC, Monzon BF, Jiménez ZL, Ahued A R, Arechavaleta VF, Strauss JF. In- vitro secretion of proinflammatory cytokines by human amniochorion carrying hyper-responsive gene polymorphisms o tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. *Mol Hum Reprod.* 2003; 9: 625-9
3. Meraz CN, MolinaDG, Vadillo OF. Sequential changes of extracellular matriz metalloproteins in pregnancy and labor in the rat chorio-allantois. *Rev Invest Clin* 2003; 55: 36-42
4. French IJ, McGregor AJ. The pathobiology of premature rupture of membranes, seminars in Perinatology 1996; 20: 344-368
5. Polzin WJ, Brady K. The etiology of premature rupture of the membranes. *Clin Obst Gynecol* 1998;41:810-6.
6. Gomez R, Romero R, Edwin SS, David C. Pathogenesis of preterm labor and preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection. *Infect Dis Clin North Am.* 1997; 11:135-175
7. Baker CJ, and Edwards MS. 1995. Group B streptococcal infections, p. 980-1054. In J S Remington and J O Klein (ed), *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, 4th ed. W.B. Saunders, Philadelphia, Fa.
8. Koneman WE, Allen DS , Dowell VR, Janda MW, Somers HM, Winn CW. *Diagnostico Microbiológico texto y atlas color 3ra edición . editorial panamericana México.*1998
9. Ying F, Ling C, Clemens DJ, Azimi HP, Reagan AJ, Weisman EL, Philips BJ, Roads GG, Clark P, Brenner AR, Ferrieri P. Capsular Polysaccharide Types of Group B Streptococcal isolates from Neonates with Early- Onset Systemic Infection.
10. Hickman EM, Rench AM, Ferrieri P, Baker JC. Changing Epidemiology of Group B Streptococcal Colonization. *Pediatrics* 1999;104: 203-209.

11. Walsh AJ, Hutchins S. Group B streptococcal disease: its importance in the developing world and prospect for prevention with vaccines. *Pediatr Infect Dis J*. 1989; 8: 271-276.
12. Narcio RM, Solórzano SF, Arredondo GJ, Calderón JE, Beltrán ZM. Etiología de la Infección cervicovaginal en pacientes embarazadas y no embarazadas. *Ginec Obst Mex* 1989; 57: 41-46.
13. Solórzano SF, Echaniz AG, Conde GC, Calderón JE, Arredondo GJ, Beltrán ZM. Cervicovaginal infection with Group B Streptococci Among Pregnant Mexican women. *J Infect Dis* 1989; 159: 1003-4
14. Solorzano SF, Diaz RR, Arredondo G J, Diseases caused by group B Streptococcus in México. *Ped Infect Dis J* 1990; 9: 66
15. Palacios CG, Eskew KE, Solorzano SF, Mattingly JS. 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
16. McKenna DS, Iams JD. Group B Streptococcal infections. *Semin Perinatol*, 1998; 22:267-76
17. Allardice JG, Basjett TF, Seshia MM, Bowman N, Maladrewics R. Perinatal group B streptococcal colonization and infection. *Am J Obstet Gynecol* 1982;142:617-620
18. Hastings MJ, Easmon CS, Neill J, Bloxham B, Rivers RP. Group B streptococcal colonization and the outcome of pregnancy. *J Infect* 1986;12:23-9.
19. Badri MS, Zawaneh S, Cruz AC. Rectal colonization with group B Streptococcus: relation to vaginal colonization of pregnant women. *J Infect Dis* 1977;135:308-312.
20. Kubota T. Relationship between maternal group B streptococcal colonization and pregnancy outcome. *Obstet Gynecol* 1998;92:926-30

21. Miller J, Hill G, Welt S, Pupkin M. Bacterial colonization of amniotic fluid in the presence of ruptured membranes Am J Obstet Gynecol 1980; 137: 451-8
22. Baker C. Infecciones por Estreptococo del grupo B. Clin Perinatol, 1997;1: 59-71
23. Ramos E, Gaudier F, Hearing RL, Del Valle OG, Jenkins S, Briones D. Group B Streptococcus Colonization in Pregnant Diabetic Women. Obstet Gynecol 1997; 89:257-60
24. Hood M, Janney A, Dameron G, Beta hemolytic Streptococcus Group B associated with problems of the perinatal period. Am J Obstet Gynecol 1961; 82:809
25. Moller M, Thomsen AC, Borch K, Dinesen K, Zdravkovic M. Rupture of fetal membranes and premature delivery associated with group B streptococci in urine of pregnant women. Lancet 1984 14;2:69-70
26. Regan JA, Chao S, James LS: Premature rupture of membranes preterm delivery, and group B streptococcal colonization of mothers. Am J Obstet Gynecol, 1981; 141: 184-186.
27. Belady PH, Farkouh LJ, Gibs RS. Infección intraamniótica y rotura prematura de membranas. Clin Perinatol 1997;1: 43-57
28. Broekhuizen F, Gilman M, Hamilton P, Amniocentesis for Gram Stain and Culture in preterm Premature Rupture of the membranes. Obstet Gynecol 1985, 66:316-21.
29. Campbell RJ, Hillier LS, Krohn AM, Ferrieri P, Zaleznik D, Baker JC Group B Streptococcal colonization and serotype-specific Immunity in Pregnant women at delivery. Obstet Gynecol 2000; 96: 498-503.
30. Helmig R, Ulbjerg, Borins J, Kilian M. Clonal analysis of Streptococcus agalactiae Isolated from Infants with Neonatal Sepsis or Meningitis and their Mothers and from Healthy Pregnant Women. JID 1993;168:904-909
31. Lin B, Hollingshead SK, Coligan JE, Egan ML, Baker JR, Pritchard DG Cloning and expression of the gene for group B streptococcal hyaluronate lyase. J Biol Chem 1994 2;269:30113-6

32. Mattingly SJ, Maurer JJ, Eskew EK, Cox F. Identification of a high-virulence clone of serotype III *Streptococcus agalactiae* by growth characteristics at 40 degrees C. *J Clin Microbiol* 1990 Jul;28:1676-7
33. Feng YC, Clemens DJ, Azimi HP, Regan JA. Capsular polysaccharide Types of Group B Streptococcal Isolates from neonates with Early-Onset Systemic infection. *JID* 1998;177:790-2
34. Lachenauer CS, Kasper DL, Shimada J, Ichiman Y, Ohtsuka H, Kaku M et al. Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. *J Infect Dis* 1999; 179:1030-3
35. Yancey MK, Schuchat A, Brown LK, Lee VV, Markenson GR. The accuracy of late antenatal screening cultures in predicting genital streptococcal B group colonization at delivery. *Obstet Gynecol* 1996; 88: 811-15
36. Regan JA, Klebanoff MA, Nugent RP. Colonization with group B streptococci in pregnancy and adverse outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1354
37. Bromberger P, Lawrence MJ, Braun D, Saunders B, Contreras R, Petitti D. The influence of intrapartum antibiotics on the clinical spectrum of early-onset group B streptococcal infection in term infants. *Pediatrics* 2000; 106: 244-250.
38. Hall RT, Barnes W, Krishnan L. Antibiotic treatment of parturient women colonized with group B streptococci. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 124:630-634.
39. Newton RE, Clark M. Group B *Streptococcus* and Preterm Rupture of Membranes. *Obstet Gynecol*. 1988: 71;198-202
40. Morbidity and Mortality Weekly Report. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease, Revised Guidelines from CDC. 2002;51:RR11
41. Boyer KM, Gadzala CA, Kelly PD, Burd LI, Gotoff SP. Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B streptococcal early-onset diseases. II Predictive value of prenatal cultures. *J infect Dis* 1983; 148:802-809
42. Paredes A, Wong P, Yow MD Failure of penicillin to eradicate the carrier state of group B *Streptococcus* in infants. *J pediatr* 1976;89:191-193

43. Schuchat A. Group B streptococcus. Lancet 1999; 353:51-56
44. Hillier S, Group B strep can definitely invade the placental membranes En Benirschke K, Pathology of the Human Placenta 3rd edition, New York 1996.

ANEXOS

ANEXO 1

TINCIÓN DE GRAM.

para comprobar presencia de cocos grampositivos

- a) Se hace un Frotis delgado del material a estudiar y se deja secar al aire.
- b) Se fija el material en porta objeto pasándolo 3 o 4 veces a través de la llama de un mechero de Bunsen de modo que el material no sea lavado durante el procedimiento de la tinción.
- c) Se coloca el frotis sobre un soporte para tinción y se cubre la superficie de cristal violeta.
- d) Después de 1 minuto de exposición al cristal violeta se lava totalmente con agua destilada
- e) Se cubre el frotis con solución de yodo de Gram durante 1 minuto. Se lava nuevamente con agua
- f) Se sostiene el frotis entre los dedos pulgar e índice y se cubre la superficie con unas gotas de decolorante de alcohol y acetona, hasta que no se desprenda más cristal violeta. Habitualmente tarda 10 segundos o menos
- g) Se lava con agua corriente y se coloca otra vez el preparado sobre el soporte para tinción. Se cubre la superficie con contra tinción de safranina durante 1 minuto. Se lava con agua corriente.
- h) Se coloca el preparado en una posición vertical dejando que drene el exceso de agua y el frotis se seque.
- i) Se examina el frotis teñido con aceite de inmersión con el objetivo 100x, del microscopio. Las bacterias grampositivas se tiñen de color azul y las gram negativas de color rojo-rosado.

ANEXO 2

PRUEBA DE LA CATALASA. Para comprobar negatividad de la prueba

- j) Introducción. La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua. Desde el punto de vista químico es una hemoproteína similar en estructura a la hemoglobina, excepto en que los 4 átomos de hierro en la molécula están en forma oxidada (Fe^{+++}) en lugar de reducida (Fe^{++}) Salvo Los estreptococos, la mayor parte de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad catalasa. La mayoría de las bacterias anaerobias descomponen el H_2O_2 , lo hacen mediante peroxidasa, en forma semejante a la catalasa, excepto que cada molécula tiene un solo ion férrico.
- k) Principio. El peróxido de hidrógeno es uno de los productos oxidativas finales en el metabolismo aeróbico de los carbohidratos. Si se acumula, el peróxido de hidrógeno es letal para las células bacterianas. La catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La prueba de la catalasa, realizada por los métodos del porta objeto o en tubo, por lo común se emplea para diferenciar bacilos gram positivos de las micobacterias, y estafilococos de estreptococos
- l) Procedimiento. Transferir células desde el centro de una colonia bien aislada a la superficie de un porta objeto de vidrio con una aguja de inoculación o un aplicador de punta ahusada. Agregar una o dos gotas del peróxido de hidrógeno al 3%.
- m) Interpretación. La rápida aparición y sostenida producción de burbuja de gas o efervescencia, constituyen un resultado positivo.

ANEXO 3

Hemólisis. En el caso de *Streptococcus* del grupo B se refiere la presencia de beta hemólisis, la cual, se observa como un halo blanquecino alrededor de las colonias bacterianas, en el medio Agar sangre de carnero al 5%