

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

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

**SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA *Streptococcus agalactiae*
EN MUJERES MEXICANAS DE 15 A 40 AÑOS.**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INFECTOLOGO
PRESENTA
RAUL CALTENCO SERRANO.**

**TUTORES DE TESIS : DR. FORTINO SOLORZANO SANTOS.
DR. JAVIER TORRES LOPEZ.
MEXICO D.F.**

1996.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS.

A mis padres por la oportunidad de vivir.

A Lulu, Raul y Viridiana, por su amor y paciencia.

A mis hermanos.

A mis maestros: Dr. Juan Games Eternod, Dr. Juan Antonio Trejo y Pérez, Dr. Fortino Solórzano Santos y Dr. Humberto Díaz Ponce.

A los niños del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI y a sus padres.

A dios por todo lo anterior.

INDICE.

	páginas.
Agradecimientos	2
Indice	3
Resumen	4
Abstract	5
Antecedentes	6
Justificación	9
Objetivos	9
Cálculo del tamaño de muestra	10
Material y Métodos	
Especificaciones del antígeno	11
Conjugación del antígeno con un poliaminoácido	11
Procedimiento de ELISA	12
Determinación de la especificidad del antígeno	13
Estandarización	13
Resultados	14
Conclusiones	14
Discusión	15
Bibliografía	17

RESUMEN

La enfermedad invasiva por *Streptococcus agalactiae* (Estreptococo beta hemolítico del grupo B) en nuestro país es rara. Esta se presenta con mayor frecuencia en recién nacidos o lactantes menores. La colonización cervicovaginal por este microorganismo en mujeres mexicanas se ha encontrado con una frecuencia del 10% aproximadamente. En nuestro país no se conoce cuál es la seroprevalencia en mujeres en edad reproductiva. Para conocer esta información, se obtuvieron sueros del Banco Nacional de Sueros del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE), por muestreo al azar, del grupo de mujeres de 15 a 40 años de los 32 estados de la República Mexicana. El Banco Nacional de Sueros está constituido por las muestras obtenidas en la encuesta seroepidemiológica nacional de 1987-1988. La búsqueda de anticuerpos se realizó mediante la prueba de ELISA, empleando como antígeno al polisacárido capsular determinante de grupo conjugado mediante enlace covalente a un poliaminoácido (poli-L-lisina). Se midió la concordancia intraobservador evaluando las mediciones durante la realización de la prueba en 5 días consecutivos con sueros controles positivos y controles negativos y se verificó la especificidad del antígeno con la utilización de suero de conejo inmunizado con SGB. La muestra se calculó en 2665 muestras considerando una seropositividad esperada del 10%, de acuerdo con la frecuencia observada de colonización cervicovaginal y una probabilidad de error de menos del 1%.

La evaluación de la concordancia intraobservador dio como resultado una r^2 de 0.98. Se realizaron mediciones por duplicado de cada suero y se obtuvo el promedio. El punto de corte para considerar como positivo un suero, se estableció con un valor por arriba de 2 desviaciones estándar del promedio de los controles negativos. Se ^{Calcularon} obtuvieron 2665 muestras y se estudiaron 2669; La seroprevalencia fue del 90.18% (2405 sueros positivos). La seropositividad por edades fue similar, con variaciones discretas por quinquenios, lo mismo que por estados, aunque la muestra se estableció para representatividad nacional y no estatal.

Conclusiones: En este trabajo, el grupo de mujeres mexicanas en edad reproductiva (15 a 40 años), posee anticuerpos IgG contra el polisacárido capsular determinante de grupo de Estreptococo beta

hemolítico del grupo B de Lancefield. La seroprevalencia en mujeres mexicanas en edad fértil para *Estreptococo beta hemolítico del grupo B* es alta.

ABSTRACT

Acute disease due to *Streptococcus agalactiae* in México is rare. Group B streptococcal (GBS) infections are restricted to very early infancy. The incidence of mothers who are colonized by GBS in mexican population is nearly of 10%. There are not data about seroprevalence of GBS in mexican woman at reproductive age. In order to know the seroprevalence in this age-group were obtained a randomized sample of sera from National Bank of Sera of Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) in 15 – 40 old-age mexican woman. This National Bank of Sera was formed by sera from 32 states of México in 1987-88. To screening sera ELISA was employed created by covalent linkage between capsular polisacharide of GBS and a polypeptide (poly-L-lisina). Intraobserver consistency were made with contrast showed between values determined in five days with positive and negative controls. Specificity of antigen was established by adsorption of positive sera by liofilized GBS and then, absorbance pre and post adsorption was measured. The sample size with a less than 1 % of error and prevalence nearly of 10%, was 2665 serum-patients. Results: Intraobserver consistency rendered r^2 of 0.98. Sera adsorption showed a decreased values of absorbance. Measurements of sera were realized by duplicate and cutoff point was determined by two standard deviation on negative sera control mean. 2669 sera was tested and 2405 positive sera was rendered. Seroprevalence was established in 90.18%. Conclusions: There are IgG antibodies in 15-40 old-age mexican woman. High seroprevalence against GBS was encountered.

ANTECEDENTES

Los estreptococos beta hemolíticos fueron considerados como un grupo heterogéneo de bacterias desde el siglo pasado, que incluían a microorganismos relacionados con enfermedad en humanos y bovinos. La identificación de los mismos era difícil, ya que las diversas pruebas propuestas para su identificación creaban cierta confusión puesto que los métodos disponibles en ese entonces no permitían diferenciar entre bacterias aisladas de muestras clínicas de sujetos enfermos y las obtenidas a partir de ganado bovino; mucho menos podía definirse con certeza algún género y especie⁽¹⁾. Rebecca Lancefield propuso en 1933, la clasificación de los estreptococos beta hemolíticos en grupos identificados serológicamente, con lo que se pudo observar cierta correlación con las fuentes de donde eran aislados, ya sea humana o animal (bovina)⁽¹⁾. Esta clasificación sigue vigente y su utilidad se ha visto favorecida por la identificación subsecuente de serotipos y la caracterización de cepas por análisis de ADN^(2,3).

El grupo B de la clasificación serológica de Lancefield incluye a una sola especie: *S. agalactiae*. Es un coco Gram positivo, catalasa negativo, que produce hemólisis beta en agar sangre, da positiva la prueba de hidrólisis de hipurato así como la prueba de CAMP (hemólisis sinérgica cuando se coloca adyacente a una cepa de *Staphylococcus aureus* que posea hemolisina). Incluye a nueve serotipos: Ia, Ia/c, Ib/c, II, IIc, III, IV, V y VI⁽⁴⁾. Todos se han relacionado con enfermedad en el humano, sin embargo los primeros seis causan enfermedad invasiva en el recién nacido⁽⁵⁾ en cualquiera de las dos formas clínicas descritas: síndrome de inicio temprano que ocurre dentro de los 5 días posteriores al nacimiento y el síndrome de inicio tardío que ocurre después de este tiempo hasta los tres meses⁽⁴⁾.

La enfermedad invasiva por *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B, SGB) en recién nacidos, ocurre con una frecuencia de 9000 - 12,000 casos por año en países como los Estados Unidos⁽⁵⁾. En nuestro país no se conoce su incidencia con exactitud, sin embargo, la enfermedad se presenta esporádicamente. Con respecto a este punto existen estudios encaminados a establecer las posibles causas de su aparente baja frecuencia. Dos trabajos realizados en nuestro país han determinado una frecuencia de 1.5%⁽⁶⁾ y 10.3%⁽⁷⁾ de colonización cervicovaginal por SGB en grupos de mujeres mexicanas, mismas que son notablemente inferiores a la que se reporta en mujeres norteamericanas (>40%)⁽⁸⁾. Los datos anteriores hacen suponer que el bajo porcentaje de colonización podría explicar la baja frecuencia de la enfermedad en nuestro país, sin embargo, en uno de estos trabajos⁽⁷⁾, la distribución y frecuencias de los serotipos de SGB en la población de mujeres embarazadas que acudieron a un centro de atención perinatal de tercer nivel, tuvieron diferencias con respecto a los serotipos que se informan en Estados Unidos. Por ejemplo, en nuestro país⁽⁷⁾ las frecuencias son las siguientes: Ia, Ib/c, Ia/c (66.6%), serotipo II, IIc (12.1%) y III (3%); comparadas con las que se

reportan en Estados Unidos donde son similares entre los tres serotipos Ia, Ib/c, Ia/c (30%) II, IIc (30%) y III (también 30% aproximadamente)⁽⁴⁾.

Los resultados de estas investigaciones, son similares a los de un estudio de población que incluyó a un grupo de mujeres Mexico-Norteamericanas,⁽⁸⁾ donde se encontró una frecuencia de colonización del 18.4% (9.9% cuando es corregido para un solo cultivo) y de 40.9% para las mujeres caucásicas norteamericanas. Las diferencias en la frecuencia de colonización cervicovaginal y la distribución de serotipos de SGB se han considerado posibles explicaciones a la baja ocurrencia de enfermedad invasiva en lactantes y recién nacidos en México sin que se haya determinado la verdadera causa.

De lo anterior se desprenden algunas posibilidades: 1) Que la relativa baja frecuencia de colonización cervical explique a su vez un porcentaje menor de transmisión al producto, 2) que la distribución del serotipo considerado con mayor virulencia (serotipo III) sea mas baja entre el grupo de mujeres que tienen colonización cervicovaginal por SGB que la que se encuentra en países donde la enfermedad invasiva se presenta con una mayor incidencia, 3) que ocurra protección humoral por respuesta cruzada por exposición a otras bacterias, 4) que exista una afinidad epitelial diferente en mujeres latinas que la que tienen las mujeres caucásicas por el SGB, 5) que las cepas de otros países posean genes relacionados con virulencia diferentes a los que poseen las cepas autoctonas. Sin embargo, también pudiera ocurrir que la causa fuera una mezcla de esos factores.

La respuesta humoral que induce SGB ha sido estudiada y dentro de los anticuerpos que puede inducir en el ser humano, dos tienen particular importancia⁽⁹⁻¹²⁾: El anticuerpo dirigido contra el polisacárido de grupo (el polisacárido de grupo está constituido por una proporción 3:1:1:1 de ramnosa, N-acetilglucosamina, galactosa y fosfato de glucitol)⁽¹³⁾ el cual posee importancia desde el punto de vista epidemiológico, no confiere protección y carece de poder opsonizante; el anticuerpo dirigido contra el polisacárido de tipo (constituido por una proporción de 2:1:1:1 galactosa, glucosa, N-acetilglucosamina y ácido sialico, para todos los serotipos excepto para el serotipo III quien tiene una proporción 3:1:1:1)⁽¹³⁾ confiere protección inmunológica ya que los niveles superiores a 2 ug/ml evitan la enfermedad invasiva en el recién nacido al ser transferidos transplacentariamente⁽¹⁴⁾. En relación a este último polisacárido (de tipo) se ha demostrado una estructura idéntica en un polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* tipo 14^(15,16).

La investigación de la enfermedad producida por esta bacteria, ha tenido alcances considerables en los últimos años principalmente en el área de la prevención, de la cual, existe un buen número de trabajos que demuestran protección en la descendencia en el modelo animal

cuando se inmuniza al progenitor con un conjugado⁽¹⁷⁻²⁰⁾ (polisacárido de tipo unido a una proteína). No se ha establecido la utilidad que pudiera tener en países no desarrollados una vacuna

contra SGB, aunque que desde el punto de vista de costo beneficio puede ser que no se justifique en población abierta, si la seroprevalencia es alta.

Los estudios mediante encuestas microbiológicas (toma de cultivos) donde se determinan los serotipos prevalentes en una determinada población o mediante la búsqueda de anticuerpos dirigidos contra SGB han permitido observar la distribución de la exposición al microorganismo, lo cual ha sido útil para establecer el riesgo de enfermedad que tiene una población ^(8,21).

Existen pocas descripciones de encuestas serológicas poblacionales realizadas utilizando el polisacárido determinante de grupo de SGB, una de ellas ⁽¹²⁾ muestra diferencias significativas en las concentraciones de anticuerpos anti-polisacárido de grupo entre mujeres colonizadas por SGB y mujeres no colonizadas (3.5 ug/ml vs 1.2 ug/ml). El anticuerpo que se genera contra el polisacárido de grupo está dirigido contra la fracción de ramnosa, ya que este dió una mayor inhibición de la absorbancia cuando se probaron los diferentes azúcares constituyentes por separado, para inhibir la absorbancia dada por la presencia de anticuerpos contra determinante antigénico de grupo ⁽¹²⁾.

La susceptibilidad de la población se determina por la exposición previa o no a un microorganismo dado. De tal manera que aquellas poblaciones que no se han expuesto al microorganismo en cuestión y no han generado anticuerpos, se puede decir que son susceptibles a la enfermedad producida por tal microorganismo. Para el caso de SGB, esta demostrado que la presencia de anticuerpos maternos contra el polisacárido determinante de tipo previene de enfermedad en recién nacidos a través del paso transplacentario ⁽²²⁾. Esta última situación fué verificada por Baker, Edwards y Kasper ⁽¹⁴⁾ quienes observaron una correlación positiva entre las concentraciones maternas de anticuerpos y las concentraciones en sangre de cordón, sugiriendo paso transplacentario.

La importancia que puede tener para nuestro país el conocer la seroprevalencia contra SGB en particular, está en que permitiría corroborar si existe riesgo para la población (colonización baja y seroprevalencia baja) esperando una mayor incidencia a futuro, y por otra parte, dado que en Estados Unidos, los estudios experimentales ⁽¹⁷⁻²⁰⁾ prometen la pronta aparición de la vacuna contra SGB de aplicación a madres en riesgo (mujeres embarazadas con colonización cervical o vaginal por SGB), sería de gran beneficio anticiparse a conocer la seroprevalencia para determinar si se justificaría o no la vacuna contra SGB en nuestro país.

Con base en lo anterior se decidió buscar evidencia serológica de exposición a SGB mediante la utilización de polisacárido determinante de grupo en mujeres como una alternativa a la investigación de colonización cervicovaginal, la cual por supuesto, es mas costosa e implica un mayor tiempo y dificultades para su realización.

El objetivo del trabajo que actualmente se presenta fué, el de tratar de responder la pregunta de investigación acerca de si la mujer mexicana en edad reproductiva, es decir de 15 a 40 años, posee anticuerpos (IgG) que sugieran contacto con SGB y cual es su prevalencia en nuestro país.

JUSTIFICACION.

El estudio epidemiológico mediante encuesta serológica permite determinar la prevalencia en la población con respecto a un contacto infeccioso. Las ventajas que tienen estos estudios son: menor costo, facilitan el trabajo sin la necesidad de desplazarse hasta un lugar para tomar cultivos y sobre todo, desde el punto de vista de organización, pueden proporcionar datos preliminares para justificar la realización de estudios futuros a la población. La realización de una encuesta serológica contra una bacteria como SGB que tiene una baja incidencia en la población mexicana tuvo dos justificaciones que motivaron que se realizara, la primera, que no se conoce cual es la posible causa de la baja incidencia de la enfermedad en países como el nuestro; la segunda saber si en nuestro país se justificaría el empleo de una vacuna (próxima a aparecer, por lo menos por la serie de trabajos con diseños de vacunas conjugadas, polisacárido mas una proteína, que han aparecido en la literatura de los últimos seis años) que proteja al recién nacido mediante la inmunización materna, es decir, de la misma manera como se previene el tétanos neonatal.

Se decidió realizar inicialmente la búsqueda de anticuerpos contra polisacárido de grupo, como un primer paso para corroborar si existía una alta seroprevalencia que explicara la baja frecuencia de enfermedad por exposición directa al agente relacionado (SGB).

OBJETIVO.

1. Conocer la seroprevalencia contra *Streptococcus agalactiae* en una población de mujeres mexicanas en edad reproductiva de 15 a 40 años.

Aun cuando se sabe que los estudios descriptivos no requieren hipótesis decidimos comprometernos con una frecuencia esperada, para poder así continuar posteriormente con una línea de investigación.

HIPOTESIS GENERAL.

Para el planteamiento del supuesto de que una seroprevalencia alta explique una frecuencia de enfermedad baja en la población se espera que la seroprevalencia sea mayor al 90% o menor al 10% ya que la frecuencia de colonización cervicovaginal en nuestro país es del 10% aproximadamente.

HIPOTESIS ALTERNA.

1. La prevalencia de anticuerpos contra *Streptococcus agalactiae* en mujeres mexicanas es menor al 10% .

HIPOTESIS NULA.

1. La prevalencia de anticuerpos contra *Streptococcus agalactiae* en mujeres mexicanas es mayor al 90% .

UNIVERSO.

Las muestras de la encuesta serológica nacional que constituyen el Banco Nacional de Sueros (69,290 sueros) obtenidos en la encuesta serológica nacional de 1987-1988⁽²³⁾.

METODO DE MUESTREO.

Se obtuvieron las muestras de suero de las mujeres mexicanas de 15 a 40 años por medio de un muestreo aleatorio por computadora de las muestras de suero de mujeres de 15 a 40 años del banco nacional de sueros (conformado por las muestras de suero obtenidas en los 32 estados de la República Mexicana) por desagregación nacional (no estatal) incluyendo a los 32 estados de la República Mexicana.

CALCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA.

Para el cálculo del tamaño de muestra se consideró tanto el porcentaje de colonización cervical en mujeres mexicanas, la frecuencia aproximada de enfermedad invasiva en recién nacidos en nuestro país así como la frecuencia esperada de seroprevalencia. Para lo cual se empleó la fórmula:

Colonización Cervicovaginal en mujeres mexicanas = 10%.⁽⁷⁾

Tasa de infección neonatal por SGB = 0.6 por 1000 nacidos vivos.⁽⁷⁾

$$N = 4z_{\alpha}^2 S^2 / W^2$$

De la cual se tiene que:

$z_{\alpha} = 1.645$ cuando $\alpha = 0.05$ dado que la hipótesis alterna es de una cola

$S = 0.033$

$W = 0.10$

Por tanto sustituyendo:
$$\frac{4 (1.645)^2 \times (0.033)^2}{(0.10)^2}$$

De dicho cálculo se obtuvo una cantidad de 1537 muestras para un nivel de confianza del 95% y 2665 muestras para un nivel de confianza de 99%.⁽²⁴⁾

MÉTODOS.

Especificaciones del antígeno.

En la producción del antígeno se empleó la cepa 110 aislada de una recién nacida con meningitis de inicio tardío en los EUA (el antígeno fué producido por el Dr. Gerardo Palacios Saucedo en la ciudad de San Antonio, Texas). En dicha cepa se demostraron características fenotípicas de alta virulencia y fue serotipo III.

El procedimiento de obtención consistió en crecer la cepa en un medio definido químicamente (FMC) del cual se prepararon 10 litros. La cepa se dejó crecer hasta la fase estacionaria (DOA alrededor de 1.400) manteniendo estable el pH alrededor de 7.0 mediante la adición hidróxido de sodio. El sobrenadante fue separado por centrifugación a 10 000 G y decantado en fracciones en frascos estériles. Posteriormente este sobrenadante fue dializado en contra de un gradiente con una solución de acetato de sodio 4M por 4 noches a 4° C. Después de dializado el sobrenadante fue liofilizado y redisolto hasta obtener una solución de 15 ml. Dicha solución fue aplicada de manera fraccionada sobre una columna de dietilaminoetil celulosa y utilizando un gradiente de carbonato de amonio de menor a mayor densidad (750 ml de una solución 0.02 M y 750 ml de una solución 0.3 M). Se probó una alícuota de todas las fracciones obtenidas para evaluar su contenido de hexosas por el método Anthrone. Finalmente se probó una alícuota de cada una de las fracciones positivas para hexosas para medir su contenido de ácido siálico por el método del ácido tiobarbitúrico.

El contenido de las fracciones positivas a hexosas y negativas para ácido siálico fue mezclado y liofilizado (el ácido siálico es un componente del polisacárido de tipo, por lo que fue desechado y solo se consideraron para liofilización a las fracciones libres de este azúcar).

Conjugación del antígeno con un poliaminoácido. Dado que los carbohidratos son ricos en cargas negativas, no se adhieren adecuadamente a las placas de poliestireno para el ensayo de ELISA, por lo que se conjugó mediante enlace covalente a una proteína⁽²⁵⁾. El polisacárido se conjugó con un poliaminoácido, poli-L-lisina, con peso molecular entre 30,000 y 70,000 Kd. La técnica de conjugación que se utilizó fue la siguiente, de acuerdo con la técnica de Barry M Gray⁽²⁵⁾:

Reactivos utilizados:

- A) NaOH 0.01N con Fenoltaleína (Hidróxido de sodio con fenoltaleína como indicador) pH 12.
- B) Poli L-lisina tipo III, peso molecular 30,000-70,000 Kd al 0.1%.
- C) Polisacárido: Polisacárido de grupo concentración 1000ug /ml en agua destilada.

D) Cristales de cloruro cianúrico.

Alcalinización del polisacárido: Se prepararon 0.5ml de antígeno agregándose a 2.5 ml de NaOH 0.01N (pH 12) y se mezcló por 10 segundos (se observa una solución de color rosa).

Activación por cloruro cianúrico: A la mezcla anterior se agregan 2.5 mg de cristales de cloruro cianúrico y se mezclaron por 10 segundos. La solución se decoloró conforme el pH descendía de 12 a 8.0 - 8.2.

Acoplamiento del polisacárido a la poli L-lisina: Se agregó a la mezcla anterior 0.5ml de Poli L-lisina, la cual se mezcló suavemente y se dejó por 2 h a 40C.

Se verificó que no hubiera turbiedad al finalizar el tiempo de reposo de 2 h a 4° C.

PROCEDIMIENTO DE ELISA.

1. Adsorción a placas de poliestireno (Combiplate 8): El antígeno acoplado a poli L-lisina se diluyó a una concentración de 1 - 5 ug/ml con PBS (buffer de Sol. Salina fosfato) pH 7.4. La concentración ideal se evaluó realizando ensayos con diferentes concentraciones (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 y 5.0ug/ml). Se agregó de esta dilución 100ul a cada pozo de la placa y se dejó incubando en agitación continua durante toda la noche.

2. Al día siguiente se lavaron las placas con una solución de agua desionizada y Brij 35 (detergente) al 0.05% por 4 veces y con volúmenes de 300µl cada lavado y se agregan los sueros a probar.

3. Los sueros a probar se diluyeron 1:500 a 1:1000 (se buscó la mejor dilución en el procedimiento de estandarización) con PBS-Brij 35 al 0.05%.

4. Después de efectuar la dilución del suero se agregó a las placas un volumen de 100µl de los sueros diluidos por duplicado y se incubaron por 3 h a temperatura ambiente y con agitación gentil.

5. Pasado este tiempo las placas se lavaron nuevamente con agua desionizada-Brij 35 0.05%, por 4 veces con volúmenes de 300µl cada lavado.

6. Se agregó el anti-anticuerpo humano conjugado (anticuerpo contra la fracción constante de IgG humano conjugado a fosfatasa alcalina obtenido en ratón) diluido 1:1000 en PBS-Brij 0.05% en un volumen de 100 µl por pozo.

7. Posteriormente se dejó incubando a 37°C durante 60 minutos.
8. Al término de este tiempo se lavó la placa por 4 veces con agua desionizada-Brij 35 al 0.05% con volúmenes de lavado de 300µl.
9. Se agregó el sustrato del antihumano conjugado que es P-difenil fosfato a una concentración de 1mg/ml diluido en Buffer de dietanolamina pH 9.8.
10. Finalmente se dejó incubar por una hora a temperatura ambiente y se hizo la lectura al finalizar este lapso a una longitud de onda de 405nm.

Determinación de la especificidad del antígeno. Se verificó la especificidad del antígeno mediante el empleo de suero de pacientes lactantes que habían desarrollado enfermedad tardía midiendo IgM ya que la respuesta principal de los niños menores de 18 meses es fundamentalmente a través de la producción de anticuerpos IgM. Posteriormente los sueros fueron adsorbidos con pastillas de SGB desecados y se realizaron mediciones de IgM en forma pareada, es decir sueros adsorbidos y sueros no adsorbidos. Gráfica 1.

Para la determinación de IgM se utilizaron diluciones de suero mas concentradas y mayores concentraciones del antígeno como se refieren en un trabajo previo ⁽²⁶⁾. Se empleó el antígeno a una concentración de 10 ug/ml. El suero se probó a una dilución de 1:200.

También se realizó una prueba de ELISA con sueros obtenidos de conejos inmunizados con SGB y *Streptococcus pyogenes* a diferentes diluciones: 1:100, 1:500, 1:1000, 1:1500 y 1:2000. Solo se observó positividad (absorbancia decreciente) en el suero de conejos inmunizados con *Streptococcus agalactiae*.

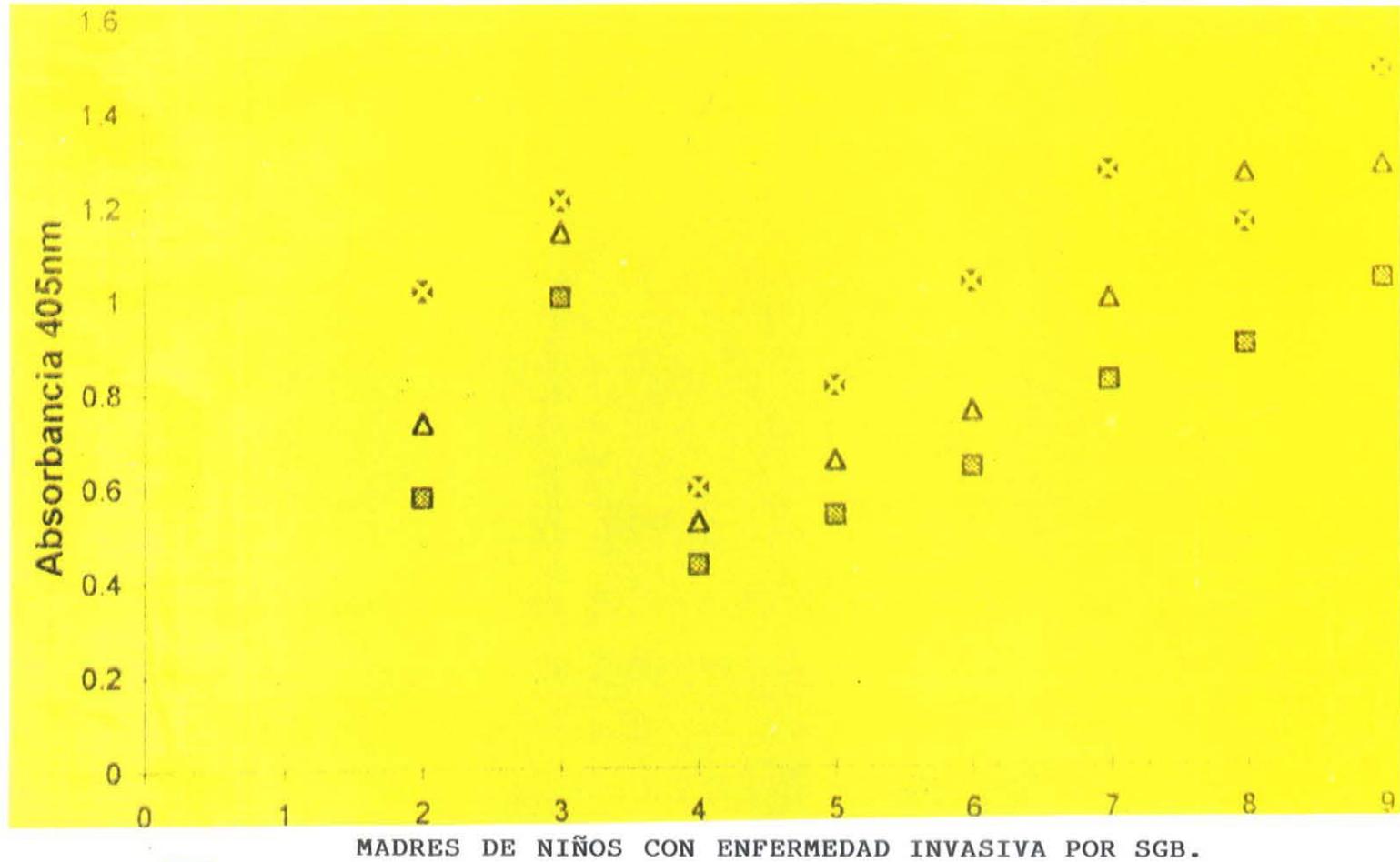
ESTANDARIZACION:

Se realizaron algunos ensayos variando tanto el tiempo de incubación con el antígeno como las diluciones de los sueros de prueba. Se llegó a la concentración óptima del antígeno de 3ug/ml y la dilución con mejor definición para los sueros positivos y negativos fué la de 1:500 y el tiempo de incubación con los sueros de prueba fue de 3 horas.

Los sueros que se emplearon como referencia inicial para buscar los sueros negativos y positivos fueron los sueros de cuatro madres de recién nacidos que tuvieron enfermedad invasiva, lo mismo que los de sus hijos que padecieron enfermedad (4 muestras de cuatro lactantes). Las muestras de estos pacientes se consideraron negativas con base en el antecedente de que los hijos de madres que no poseen anticuerpos contra SGB desarrollan enfermedad invasiva. La búsqueda de sueros se hizo entre las muestras de un banco de sueros creado en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría, del

GRAFICA 1.

ADSORCION DE IgM EN SUEROS POSITIVOS CON SGB
DESECADO.



- ✕ Suero sin adsorción.
- △ Suero adsorbido 1 sola vez.
- Suero adsorbido 2 veces.

Centro Médico Nacional Siglo XXI. Las muestras que conforman este banco de sueros fueron tomadas del personal de la Unidad de Investigación (laboratoristas, pasantes en servicio social, investigadores y tesis de los laboratorios de bacteriología, virología, parasitología y biología molecular). Se lograron reunir 29 sueros negativos y 19 sueros positivos. Se determinó el promedio de las lecturas de absorbancia de los sueros negativos y se calculó la desviación estándar considerando como positivas las lecturas por arriba de la 3ª desviación estándar.

Posteriormente se formó un suero de referencia con la mezcla de los 29 sueros negativos y los 19 sueros positivos (200 ul de cada uno) y fueron dispuestos en viales de 500 ul . La prueba de ELISA se realizó con cada suero negativo incluyendo un control de reacción, un control positivo (suero de referencia positivo) y un control negativo (suero de referencia negativo). Cada suero negativo se probó por duplicado para la búsqueda de anticuerpos y las lecturas obtenidas durante cinco días consecutivos se compararon para evaluar la concordancia entre las mediciones, la cual fue de 98% (Coeficiente de intervalo intraclass de 0.98). Gráfica 2 Y 3.

RESULTADOS

La muestra calculada correspondió a 2665 para un nivel de confianza de 99%, El total de muestras proporcionadas por el Banco Nacional de Sueros fueron 2701, las cuales se obtuvieron en forma aleatoria por computadora. Del total de muestras proporcionadas se lograron procesar 2669 con una pérdida de 34 muestras, de las cuales algunas se desecaron, algunas otras contenían una cantidad de suero insuficiente lo cual hizo que no se incluyeran para su estudio.

El número total de muestras positivas fue de 2405, que representaron el 90.18%. Las muestras negativas fueron 262, representando el 9.82%. Gráfica 4. La cantidad de sueros estudiada por estado se muestra en el cuadro 1. La seropositividad por estados de la república fue de 56 al 100% . La seropositividad más alta la tuvieron los estados de Baja California Norte, Baja California Sur, Campeche, Nayarit y Quintana Roo con 100% cada una. La seropositividad mas baja la tuvieron los estados de Tabasco, Chihuahua, Chiapas y Zacatecas con 56%, 73.33%, 76% y 76.19 % respectivamente. La cantidad de sueros por edad que fueron estudiados se muestra en el cuadro 2. La frecuencia por grupos de edad de cinco años (quinquenios) mostró una seropositividad constante que varió entre 84.1 y 94.4%. Gráfica 5.

CONCLUSIONES

La seroprevalencia de anticuerpos contra *Streptococcus agalactiae* en mujeres mexicanas en edad reproductiva (de 15 a 40 años de edad), fue del 90.18%. Lo anterior corroboró la hipótesis de que la seroprevalencia es mayor al 90%. Estos datos sugieren una exposición frecuente a SGB y quizá ocurra a temprana edad en la vida de las mujeres mexicanas. Las fuentes de colonización pueden ser múltiples y quizá no solo ocurra en aparato genital, sino también en

CUADRO 1. *

ENTIDAD	No. DE SUEROS POR ENTIDAD	POSITIVOS	% POSITIVOS
Aguascal.	24	20	83.33
B.N. Nor.	52	52	100
B.C. Sur.	10	10	100
Campeche	17	17	100
Coahuila	66	63	95.45
Colima	14	12	85.71
Chiapas	100	76	76
Chihuahua	75	55	73.33
D.F	266	254	95.49
Durango	45	42	93.33
Guanajuato	132	127	96.21
Guerrero	87	86	98.85
Hidalgo	63	61	96.83
Jalisco	176	161	91.48
E. de Méx.	327	298	91.13
Michoacan	118	96	81.36
Morelos	40	37	92.50
Nayarit	26	26	100
Nvo. León	103	97	94.17
Oaxaca	100	91	91
Puebla	137	120	87.59
Queretaro	33	28	84.85
Q. Roo	16	16	100
Sinaloa	67	64	95.52
Sn. Luis P.	72	67	93.06
Sonora	61	54	88.52
Tabasco	50	28	56
Tamaulipas	74	68	91.89
Tlaxcala	24	21	87.50
Veracruz	207	183	88.41
Yucatan	45	43	95.56
Zacatecas	42	32	76.19
Total	2669	2405	90.11

* Se presenta el cuadro con porcentajes por entidades de la república aunque la muestra fue calculada para desagregación nacional.

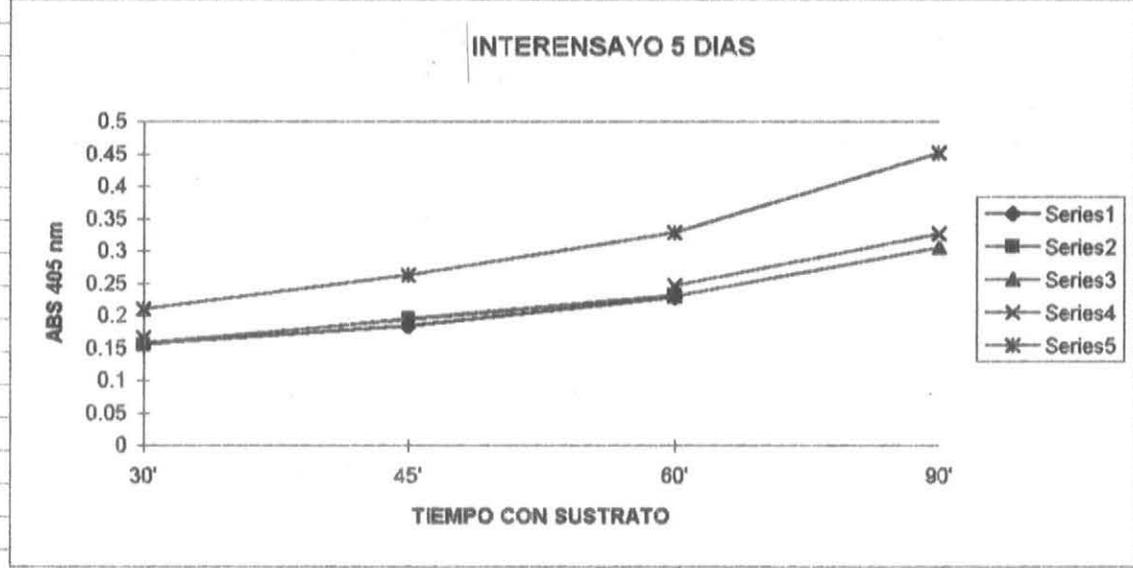
CUADRO 2.

EDAD	TOTAL DE SUEROS ESTUDIADOS	POSITIVOS	% POSITIVOS
15	161	146	90.68
16	140	127	90.71
17	132	112	84.84
18	158	141	89.24
19	113	104	92.03
20	140	124	88.57
21	98	84	85.71
22	120	112	93.33
23	110	100	90.90
24	116	103	88.79
25	108	99	91.66
26	86	81	94.18
27	112	104	92.85
28	92	84	91.30
29	89	79	88.76
30	120	108	90
31	71	67	94.36
32	90	81	90
33	81	76	93.82
34	83	74	89.15
35	75	65	86.66
36	68	62	91.17
37	81	74	91.35
38	72	68	94.44
39	71	61	85.91
40	82	69	84.14

TOTAL DE MUESTRAS ESTUDIADAS**2669****TOTAL DE MUESTRA CALCULADA****2665****PORCENTAJE DE POSITIVOS****90.18% (2405 SUEROS)**

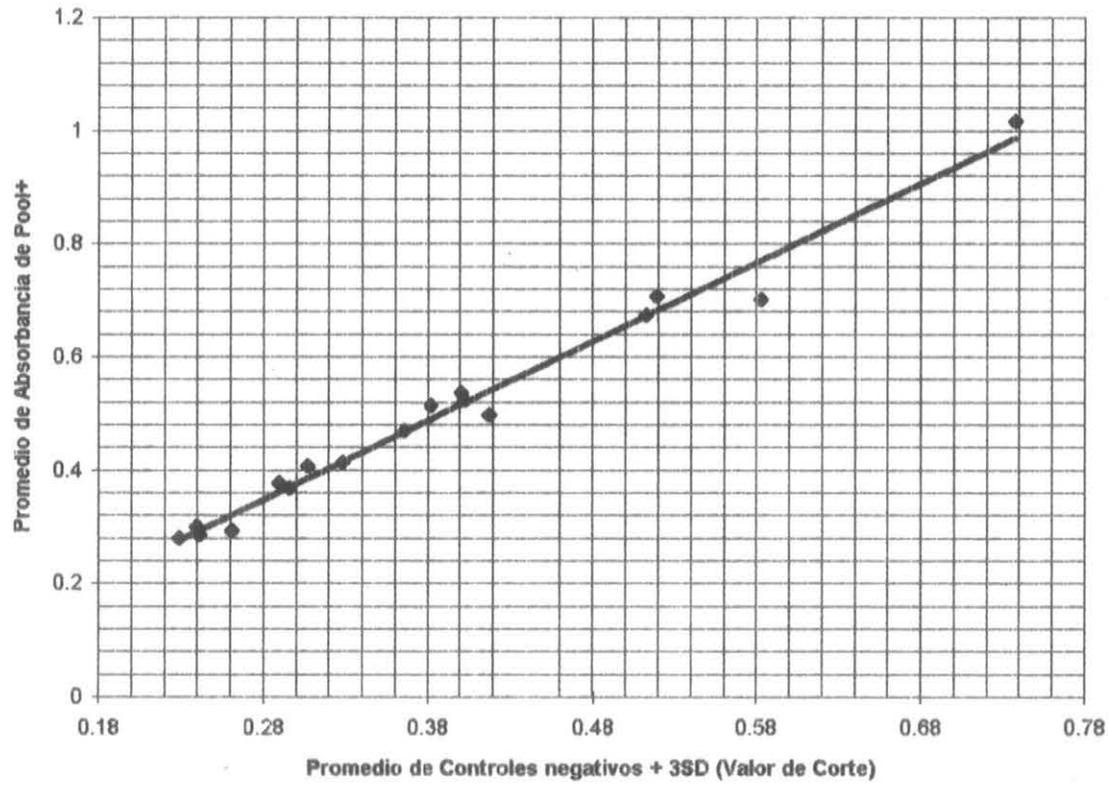
GRAFICA 2 INTERENSAYO

INTERENSAYO											
Dia 1	30'	45'	60'				30'	45'	60'	90'	
	0.155446	0.183091	0.227267				0.155446	0.183091	0.227267		
Dia 2	30'	45'	60'				Dia 2	0.153681	0.194362	0.230811	
	0.153681	0.194362	0.230811				Dia 3	0.157437	0.193082	0.229193	0.305718
Dia 3	30'	45'	60'	90'			Dia 4	0.165655		0.246436	0.326507
	0.157437	0.193082	0.229193	0.305718			Dia 5	0.20942481	0.26171011	0.32733997	0.45136093
Dia 4	30'		60'	90'							
	0.165655		0.246436	0.326507							
Dia 5	30'	45'	60'	90'							
	0.20942481	0.26171011	0.32733997	0.45136093							



GRÁFICA 3.

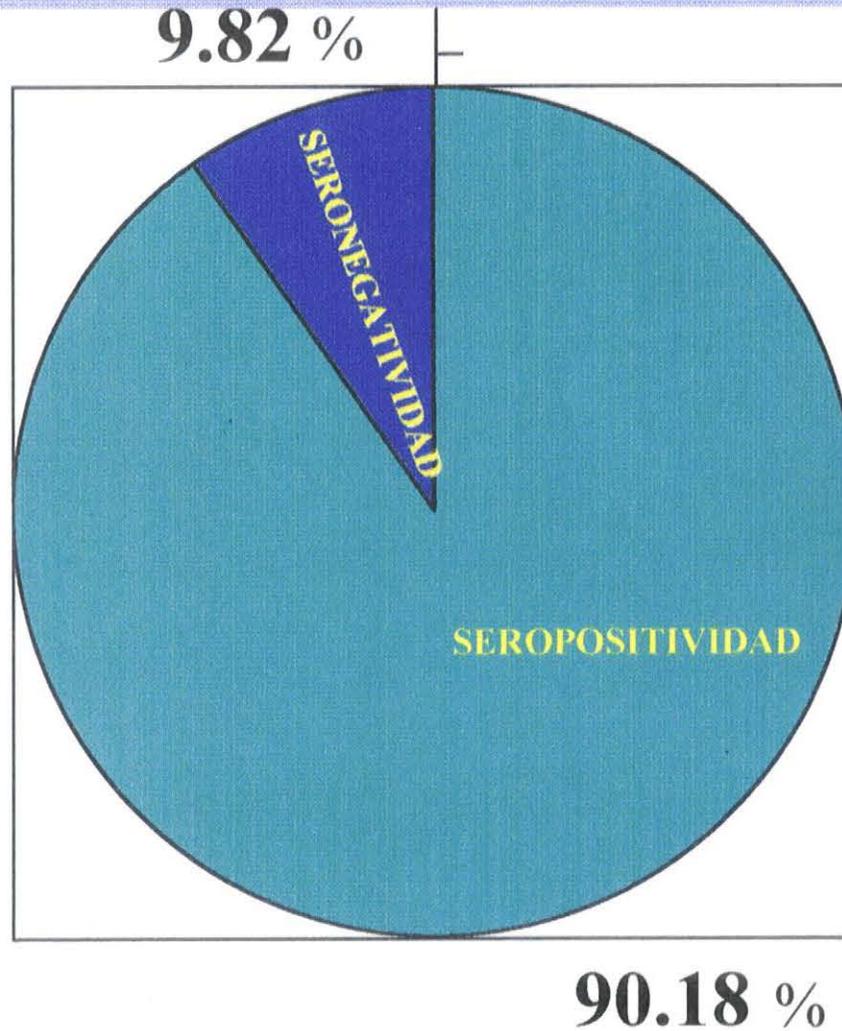
Curva de correlacion para establecer valor de corte IgG Strep. Grupo B.



$R^2 = 0.9823$

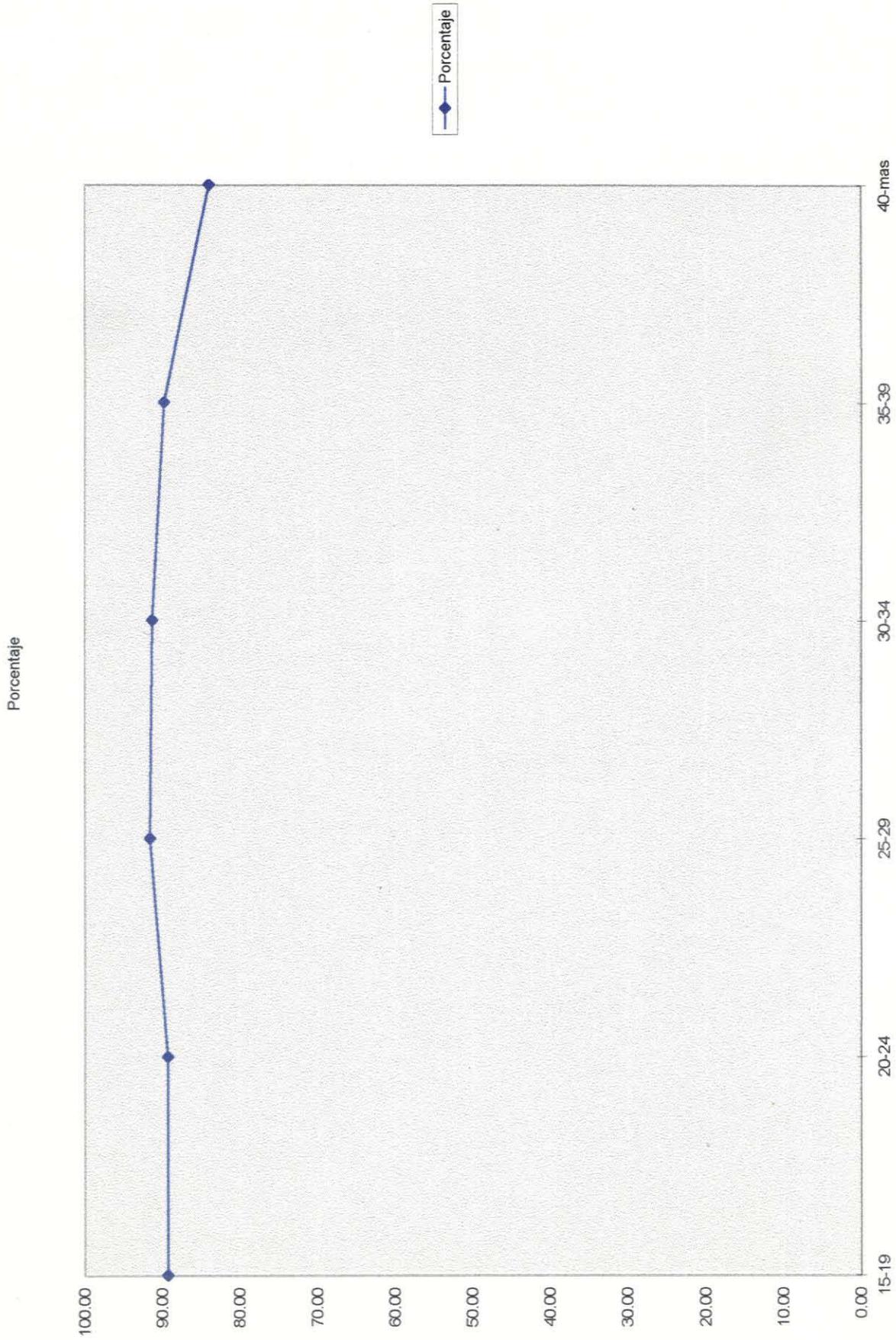
**PORCENTAJE TOTAL DE SUEROS POSITIVOS Y
NEGATIVOS EN MUJERES MEXICANAS
DE 15 A 40 AÑOS**

Gráfica 4.



GRAFICA 5

PORCENTAJE DE SUEROS POSITIVOS POR EDAD EN QUINQUENIOS.



EDAD EN GRUPOS DE CINCO AÑOS (QUINQUENIOS).

tubo digestivo y respiratorio. Esto sugiere que la colonización observada refleje un estado de no protección humoral y que el 10% represente a la población susceptible de enfermedad. El comportamiento de la seroprevalencia sin cambios relacionados con la edad de las mujeres estudiadas, apoya el supuesto de una exposición temprana, dado que no se observa una tendencia con respecto a la edad, sin embargo, habría que precisar la edad de seroconversión.

En esta encuesta hubo pocas variaciones en la prevalencia por estado, sin embargo la muestra no fue calculada para una representatividad estatal, sino que el cálculo se realizó considerando una representatividad nacional y se obtuvieron muestras al azar de cada estado hasta reunir la totalidad de la muestra calculada.

DISCUSION.

La transmisión vertical de SGB ocurre en un porcentaje de 29 a 85% con un promedio de 51%⁽⁴⁾. La enfermedad de inicio temprana en el recién nacido ocurre en 1 a 2% de los hijos de madres con cultivo positivo, sin embargo este porcentaje se incrementa al 15.2% si hubo asociación con ruptura prematura de membranas o corioamnioitis⁽²⁷⁾. El desarrollo de enfermedad invasiva en el recién nacido por SGB se ha relacionado con los niveles de anticuerpos contra polisacárido determinante de serotipo que transfiere transplacentariamente la madre^(14,22,28). La seroprevalencia del 90% encontrada en esta encuesta seroepidemiológica es un hallazgo que deja abierta la posibilidad de una alta protección humoral contra la infección por SGB. En este estudio no se observa una tendencia significativa en el porcentaje de seropositividad con respecto a la edad, lo cual concuerda con lo observado por otros autores con respecto a la presencia de anticuerpos contra polisacárido de tipo en mujeres, donde tampoco encontraron diferencias entre tres de cuatro grupos de edad (grupo I, mujeres de 16 a 20 años; grupo II, mujeres de 21 a 25 años; grupo III, mujeres de 26 a 30 años; grupo IV, mujeres de 31 a 35 años)⁽²⁹⁾. Muy probablemente la respuesta humoral esté relacionada con exposiciones de intensidad variable una vez que ocurre la colonización, ya sea en tracto respiratorio, digestivo o genital, ya que como ha sido observado en el seguimiento de la colonización vaginal por SGB, donde se han observado tres tipos de portadoras: Crónicas, transitorias e intermitentes es probable que estos "tipos" de estado de portador representen un continuum con variaciones a lo largo de un año⁽³⁰⁾.

La distribución de serotipos cambia de un lugar a otro y puede observarse esto con lo informado para México^(6,7) y para Estados Unidos⁽⁸⁾ así como para Gambia⁽³¹⁾, donde el serotipo V se recuperó en el 41% de las mujeres estudiadas, 6.9% con una colonización por dos serotipos (I, V y V y otra cepa no tipificable). La frecuencia de recuperación del serotipo III fué del 6.9% en este estudio y la recuperación en lactantes ocurrió con una frecuencia del 39% para el serotipo V y el serotipo III se recuperó en el 17%.

La respuesta serológica cruzada ha sido buscada como una alternativa de protección desde 1980, con el estudio de Baker, Kasper y Cols.⁽³²⁾, quienes diferenciaron a dos grupos de

pacientes por sus niveles de anticuerpos preinmunización contra el polisacárido de tipo III, posteriormente se les administró a aleatoriamente a cada paciente vacuna polivalente (Pneumovax) contra *Streptococcus pneumoniae* o 50ug de polisacárido de serotipo III de SGB. El resultado que obtuvieron fué que el grupo con niveles moderados a altos de anticuerpos contra polisacárido tipo III de SGB, previo a la aplicación de las vacunas, tuvieron un incremento significativo en el título de anticuerpos, comparados con el grupo que tuvo niveles bajos de anticuerpos contra serotipo III. Además, la respuesta al polisacárido tipo III fué notablemente mas alta que la del grupo al cual se administró Pneumovax. En un trabajo previo se demostró que la actividad del suero de adultos inmunizados con Pneumovax tuvo actividad opsónica *in vitro* y actividad protectora *in vivo* para SGB en un modelo de rata⁽³³⁾.

Es probable que la colonización a temprana edad y su comportamiento con incrementos en la densidad de colonización, sea la causa de una estimulación en la producción de anticuerpos de tal manera que permita con el paso del tiempo la eliminación gradual de SGB a niveles indetectables. Lo anterior explicaría porque los hijos madres colonizadas que muestran anticuerpos en títulos bajos sean los que desarrollen enfermedad. Esto mismo abre la posibilidad de que la alta seroprevalencia sea la explicación a una baja incidencia de enfermedad invasiva por SGB en los recién nacidos mexicanos. También es muy probable que el porcentaje de mujeres colonizadas refleje a la población en riesgo y aquellas mujeres con evidencia serológica de exposición a SGB sean las que ya han eliminado a SGB o lo mantienen en proporciones indetectables por cultivo ya sea cervicovaginal o anal.

BIBLIOGRAFIA .

1. Lancefield R.C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic *Streptococci*. *J Exp Med* 1933; 57:571-95.
2. Blumberg H.M., Stephens D.S., Licitra C., Pigott N., Facklam R., Swaminathan B. & Wachsmuth I.K. Molecular Epidemiology of Group B *Streptococcal* Infections: Use of Restriction Endonuclease Analysis of Chromosomal DNA and DNA Restriction Fragment Length Polymorphisms of Ribosomal RNA Genes (Ribotyping). *J Infect Dis* 1992; 166:574-9.
3. Bingen E., Denamur E., Lambert-Zechovsky N., Aujard Y., Brahimi N., Geslin P. & Elion J. Analysis of DNA Restriction Fragment Length Polymorphism Extends the Evidence for Breast Milk Transmission in *Streptococcus agalactiae* Late-Onset Neonatal Infection. *J Infect Dis* 1992; 165:569-73.
4. Baker C.J., Edwards MS. Group B *Streptococcal* Infections. En: Remington J.D., Klein J.O. eds. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 4th edition. Philadelphia: WB Saunders, 1995: 980-1028.
5. Coleman R.T., Sherer D.M., Maniscalco W.M. Review. Prevention of Neonatal Group B *Streptococcal* Infections: Advances in Maternal Vaccine Development. *Obstet Gynecol* 1992; 80: 301-9.
6. Collado M.L., Kretschmer R.R., Becker I., Guzmán A., Gallardo L., Lepe C.M. Colonization of Mexican Pregnant Women with Group B *Streptococcus*. *J Infect Dis* 1981; 143: 134.
7. Solórzano-Santos F., Echaniz-Avilés G., Conde-Glez C.J., Calderon-Jaimes E., Arredondo-García J.L., Beltran-Zuñiga M. Cervicovaginal Infection with Group B *Streptococci* Among Pregnant Mexican Women. *J Infect Dis* 1989; 159:1003-4.
8. Anthony B.F., Okada D.M., Hobel C.J. Epidemiology of Group B *Streptococcus* : Longitudinal Observations during Pregnancy. *J Infect Dis* 1978; 137: 524-30.
9. Baker C.J., Edwards M.S., Kasper D.L. Immunogenicity of Polysaccharides from type III, Group B *Streptococcus*. *J Clin Invest* 1978; 61:1107-10.
10. Marques M.B., Kasper D.L., Shroff A., Michon F., Jennings H.J., Wessels M.R. Functional Activity of Antibodies to the Group B Polysaccharide of Group B *Streptococci* Elicited by a Polysaccharide-Protein Conjugate Vaccine. *Infect Immun* 1994; 62: 1593-9.
11. Baker C.J., Kasper D.L., Tager I.B., Paredes A., Alpert S., McCormack W., Goroff D. Quantitative Determination of Antibody to Capsular Polysaccharide in Infection with Type III Strains of Group B *Streptococcus*. *J Clin Invest* 1977; 59: 810-18.
12. Anthony B.F., Concepcion N.F., Concepcion K.F. Human Antibody to the Group-Specific Polysaccharide of Group B *Streptococcus*. *J Infect Dis* 1985; 151: 221-6.
13. Anthony B.F. Group B *Streptococcal* Infections. En : Feigin R.D., Cherry J.D. eds. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. 3rd edition. Philadelphia: WB Saunders, 1992:1305-15.

14. Baker C.J., Edwards M.S., Kasper D.L. Role of Antibody to Native Type III Polysaccharide of Group B Streptococcus in Infant Infection. *Pediatrics* 1981; 68: 544-9.
15. Fischer G.W., Lowell G.H., Crumrine M.H., Bass J.W. Demonstration of opsonic activity and *in vivo* protection against group B streptococci type III by *Streptococcus pneumoniae* type 14 antisera. *J Exp Med* 1978; 148:776-86.
16. Fischer G.W., Lowell G.W., Crumrine M.H., Wilson S.R. Immunoprecipitation and opsonic cross-reaction between type-14 pneumococcus and group-B streptococcus type III. *Lancet* 1979; 1: 75-7.
17. Wessels M.R., Paoletti L.C., Kasper D.L., DiFabio J.L., Michon F., Holme K., Jennings H.J. Immunogenicity in Animals of a Polysaccharide-Protein Conjugate Vaccine against Type III Group B *Streptococcus*. *J Clin Invest* 1990; 86: 1428-33.
18. Paoletti L.C., Kasper D.L., Michon F., DiFabio J., Holme K., Jennings H.J., Wessels M.R. An Oligosaccharide-Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine against Type III Group B *Streptococcus*. *J Biol Chem* 1990; 265: 18278-83.
19. Paoletti L.C., Wessels M.R., Rodewald A.K., Shroff A.A., Jennings H.J., Kasper D.L. Neonatal Mouse Protection against Infection with Multiple Group B Streptococcal (GBS) Serotypes by Maternal Immunization with a Tetravalent GBS Polysaccharide-Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine. *Infect Immun* 1994; 62: 3236-43.
20. Madoff L.C., Paoletti L.C., Tai J.Y., Kasper D.L. Maternal Immunization of Mice with Group B Streptococcal Type III Polysaccharide-Beta C Protein Conjugate Elicits Protective Antibody to Multiple Serotypes. *J Clin Invest* 1994; 94: 286-92.
21. Farley M.M., Harvey R.C., Stull T., Smith J.D., Schuchat A., Wenger J.D., Stephens D.S. A Population-Based Assessment of Invasive Disease Due To Group B Streptococcus in Nonpregnant Adults. *N Engl J Med* 1993; 328:1807-11.
22. Baker C.J., Kasper D.L. Correlation of Maternal Antibody Deficiency with Susceptibility to Neonatal Group B Streptococcal Infection. *N Engl J Med* 1976; 294: 753-6.
23. Magos L.C., Sánchez V.F., Gutiérrez G., Tapia C.R. Banco Nacional de Sueros. *Salud Publica Mex* 1992; 34: 136-47.
24. Hulley S.B., Cummings S.R. *Designing Clinical Research*. 1st edition. Baltimore. Williams & Wilkins. 1988; 215-20.
25. Gray B.M. ELISA methodology for polysaccharide antigens: Protein coupling of polysaccharides for adsorption to plastic tubes. *J Immunol Method* 1979; 28: 187-92.
26. Boyer K.M., Klegerman M.E., Gotoff S.P. Development of IgM Antibody to Group B Streptococcus Type III in Human Infants. *J Infect Dis* 1992; 165:1049-55.
27. Pass M.A., Gray B.M., Khare S., et al. Prospective studies of Group B Streptococcal infections of the newborn infant. *J Pediatr* 1979; 95: 437-43.
28. Baker C.J., Rench M.A., Kasper D.L. Response To Type III Polysaccharide in Women Whose Infants Have Had Invasive Group B Streptococcal Infection. *N Engl J Med* 1990; 322: 1857-60.

29. Anthony B.F., Concepcion I.E., Concepcion N.F., Vadheim C.M., Tiwari J. Relation between Maternal Age and serum Concentration of IgG Antibody to Type III Group B Streptococci. *J Infect Dis* 1994; 170: 717-20.
30. Yow M.D., Leeds L.J., Thompson P.K., Mason E.O., Clark D.J., Beachler C.W. The natural history of group B streptococcal colonization in the pregnant women and her offspring. I. Colonization studies. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 137: 34-38.
31. Suara R.O., Adegbola R.A., Baker C.J., Secka O., Mulholland E.K., Greenwood B.M. Carriage of Group B Streptococci in Pregnant Gambian Mothers and Their Infants. *J Infect Dis* 1994; 170:1316-19.
32. Baker C.J., Kasper D.L., Edwards M.L., Schiffman G. Influence of Preimmunization Antibody Levels on the Specificity of the Immune Response to Related Polysaccharide Antigens. *N Engl J Med* 1980; 303: 173-8.
33. Lowell G.H., Fischer G.W., Wilson S.R., Crumrine M.H. Serum from adults immunized with pneumococcal vaccine is opsonic in vitro and protective in vivo for group B type III streptococci. *Pediatr Res* 1979; 13: 463. Abstract.