



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

HOSPITAL DE PEDIATRIA I. M. S. S. C. M. P.
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI IMSS. HOSPITAL DE PEDIATRIA

JUN. 25 1990
DEPTO. DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION

"ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LIQUIDO AMNIOTICO CONTRA Streptococcus DEL GRUPO B"

TESIS DE POSTGRADO

CURSO DE ESPECIALIZACION EN INFESTOLOGIA Y ECOLOGIA HUMANA

P R E S E N T A :
DR. FELIPE M. ALONZO VAZQUEZ

TUTOR: DR. FORTINO SOLORZANO SANTOS



IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

MEXICO, D. F.

1990

FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

I N D I C E

| | |
|---|----|
| INTRODUCCION | 1 |
| ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS | 3 |
| OBJETIVOS | 9 |
| HIPOTESIS | 10 |
| UNIVERSO Y MUESTRA | 11 |
| CRITERIOS DE INCLUSION, EXCLUSION Y NO INCLUSION | 12 |
| CRITERIOS DE VALIDEZ | 14 |
| CONTROLES DE CALIDAD | 16 |
| DEFINICIONES OPERACIONALES | 17 |
| MATERIAL Y METODOS | 19 |
| RESULTADOS | 21 |
| DISCUSION | 31 |
| CONCLUSIONES | 35 |
| BIBLIOGRAFIA | 36 |

INTRODUCCION

La infección perinatal, sigue siendo una causa importante de morbi-mortalidad en países en vías de desarrollo. Son múltiples los microorganismos que se han involucrado, entre los que se incluyen agentes virales, bacterianos o parasitarios. En nuestro país, las enterobacterias ocupan los primeros lugares como causa de infecciones neonatales y maternas, a diferencia de los descritos en el extranjero donde predominan los Gram positivos. En los últimos años, en el Instituto Nacional de Perinatología (1986-1989), se ha observado una mayor frecuencia de infecciones perinatales por Streptococcus del grupo B (SGB) en recién nacidos y en mujeres embarazadas o en el puerperio que previamente no se habían documentado.

La infección por SGB en el primer trimestre de la gestación se ha relacionado con muerte fetal, aborto o malformaciones congénitas. La infección en etapas tardías de la gestación, puede ocasionar trabajo de parto prematuro, ruptura prematura de membranas o mortinatos. En un estudio llevado a cabo por Bobitt y cols. (1), encontraron que la morbilidad de los recién nacidos es mayor cuando las madres son portadoras crónicas de SGB que cuando son portadoras transitorias (26% vs 9%). La infección sistémica por SGB es más frecuente en niños de pretérmino y la frecuencia de partos de pretérmino es mayor en las mujeres con colonización vaginal por SGB cuando se compara con mujeres no colonizadas por este microorganismo (11.8 vs 3%).

Las rutas de infección perinatal por SGB más aceptadas son: a) por vía transplacentaria (durante bacteremias

maternas); b) por vía ascendente; c) durante el paso del producto de la gestación por el canal del parto o; d) por contaminación extrauterina, a partir de personas colonizadas.

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

Desde 1938, se sabe que los SGB causan enfermedad en el hombre. En estudios con parturientas, se encontró que había colonización por este microorganismo; aunque la mayoría de estas mujeres se encontraban asintomáticas, en otras que se encontraban severamente enfermas los SGB fueron aislados de sangre. En los Estados Unidos, de 1940 a 1970 se reportaron algunos casos esporádicos de infecciones puerperales y neonatales por SGB, y no fue sino hasta la década de los 70s, en que se fue asociando con mayor frecuencia con infecciones severas de recién nacidos y lactantes. En la actualidad en algunas áreas de EEUU es la principal causa de infección neonatal.

Los grupos más frecuentemente afectados por SGB son el de mujeres embarazadas y los menores de tres meses de edad. Las infecciones perinatales por SGB han sido relacionadas con sepsis puerperal, meningitis neonatal, neumonía neonatal (difícil de distinguir de la enfermedad de membranas hialinas) e infección sistémica temprana o tardía (1, 2, 3). La transmisión vertical de la infección, se inicia a partir del canal endocervical y vaginal de mujeres colonizadas (2, 4, 5). La frecuencia de colonización vaginal o endocervical varía de acuerdo a las diferentes regiones estudiadas. En un estudio llevado a cabo por Solórzano y cols., entre 1986 y 1987 en el Instituto Nacional de Perinatología en México (6), se encontró un porcentaje de colonización de 10% en mujeres embarazadas en diferentes periodos de la gestación. Los serotipos más frecuentemente encontrados fueron el Ia

y el II (tabla 1). En México, se desconoce cual sea el serotipo de SGB predominante como causa de infección perinatal, pero en base al estudio previo, se podría deducir que se trata de los serotipos Ia y II, ya que éstos son los colonizadores más frecuentes del canal endocervical y vaginal. En el extranjero, se menciona al serotipo III, como el causante más frecuente de infección neonatal (7, 8).

Los mecanismos de defensa del hospedero contra las infecciones por SGB están mediadas por complemento opsonico, anticuerpos de tipo específico dirigidos contra antígenos presentes en el polisacárido capsular e ingestión y muerte por células fagocíticas. El decremento o la falta de alguno de estos tres mecanismos de defensa, pueden contribuir a un incremento en la susceptibilidad para ser invadidos por SGB. Estos mecanismos de defensa pueden ser transferidos al neonato durante la gestación, y algunos de estos elementos también estan presentes en el líquido amniótico.

Varios investigadores han reportado que el líquido amniótico tiene actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos (9-12), otros han reportado los cambios que ocurren en el líquido amniótico durante la infección (13-15). En la actualidad se han esclarecido algunos de los componentes del líquido amniótico que le confieren sus propiedades antimicrobianas (16-19) entre los que se incluyen: transferrina, lisozima, complejos de zinc/péptido e inmunoglobulinas (tabla 2).

Gray y cols. (1987) encontraron que los valores promedio de anticuerpos específicos contra SGB en el líquido

amniótico de 58 mujeres sanas oscilan entre 0.18 ug y 0.40 ug/ml. Los títulos más altos de anticuerpos correspondieron al serotipo II, siguiéndole en orden de frecuencia los serotipos Ib, II y Ia respectivamente (tabla 3).

En México se desconocen muchos de los aspectos epidemiológicos e inmunológicos de las infecciones perinatales por SGB, el conocimiento y comprensión de estos parámetros ayudarán a entender mejor este tipo de infecciones. En este estudio determinamos cual es la actividad antimicrobiana del líquido amniótico en mujeres mexicanas sin infección para evaluar uno de los aspectos inmunológicos del binomio madre-hijo que regulan la frecuencia de infección perinatal por SGB.

TABLA 1. DISTRIBUCION POR SEROTIPOS DE SGB DE AISLAMIENTOS VAGINALES DE 33 MUJERES EMBARAZADAS. INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA, MEXICO.

| SEROTIPO | Nº DE AISLAMIENTOS (%) | |
|----------------|---------------------------|--------|
| Ia | 8 | (24.2) |
| Ib/c | 3 | (9.1) |
| Ia/c | 11 | (33.3) |
| II | 2 | (6.0) |
| II/c | 2 | (6.0) |
| III | 1 | (3.0) |
| NO TIPIFICABLE | 6 | (18.2) |

Reproducido de: J Infect Dis. 1989; 159:1004.

TABLA 2. FACTORES QUE CONFIEREN ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA AL LIQUIDO AMNIOTICO.

| | POOL DEL SEGUNDO TRIMESTRE | POOL DEL TERCER TRIMESTRE |
|--|-------------------------------|------------------------------|
| SODIO (meq/l) | 134.0 | 124.0 |
| POTASIO (meq/l) | 3.8 | 3.7 |
| CLORO (meq/l) | 112.0 | 107.0 |
| BICARBONATO (meq/l) | 13.4 | 13.3 |
| GLUCOSA (mg/100 ml) | 51.0 | 36.0 |
| CALCIO (meq/l) | 7.4 | 6.3 |
| PROTEINAS (g/100 ml) | 0.4 | 0.4 |
| ALBUMINA (g/100 ml) | 0.3 | 0.2 |
| TRANSFERRINA (mg/100 ml) | 36.0 | 38.5 |
| ZINC (mg/ml) | 0.44 | 0.39 |
| POSFORO INORGANICO (mg/100 ml) | 141.0 | 102.0 |
| ZINC/POSFORO INORGANICO (mg/100 ml) | -200.0 | -200.0 |
| LISOZIMA (mg/ml) | 5.7 | 173.0 |
| IgG | NO DETECTABLE | NO DETECTABLE |

Reproducido de: Am J Obstet Gynecol. 1987; 156:95.

TABLA 3. NIVELES DE ANTICUERPOS CONTRA SGB EN 68 MUESTRAS DE LIQUIDO AMNIOTICO.

| SEROTIPO | ANTICUERPOS EN LIQUIDO AMNIOTICO (ug/ml) | | | N° CON MAS DE 1 ug/ml |
|----------|---|------|--------------|--------------------------|
| | MEDIA | 1 SD | VALOR MAXIMO | |
| Ia | 0.18 | 0.44 | 3.55 | 2 |
| Ib | 0.35 | 0.26 | 1.02 | 1 |
| II | 0.40 | 0.44 | 1.64 | 8 |
| III | 0.29 | 0.33 | 1.73 | 3 |

Reproducido de: Am J Obstet Gynecol. 1987; 156:667.

O B J E T I V O S

1. Conocer si existe actividad antimicrobiana en el líquido amniótico de mujeres embarazadas sin infección, contra diferentes serotipos de SGB.
2. Buscar si existen diferencias en la actividad antimicrobiana del líquido amniótico de mujeres embarazadas sin infección, contra diferentes serotipos de SGB.

FORMULACION DE HIPOTESIS

Ho. No hay diferencias en la actividad antimicrobiana del líquido amniótico de mujeres embarazadas sin infección contra los diferentes serotipos de SGB.

Hi. Hay diferencias en la actividad antimicrobiana del líquido amniótico de mujeres embarazadas sin infección, contra los diferentes serotipos de SGB.

UNIVERSO

Mujeres embarazadas bajo control prenatal en el Instituto Nacional de Perinatología.

MUESTRA

Veinte muestras de líquido amniótico obtenidas de mujeres embarazadas sin infección, en el tercer trimestre de la gestación.

CRITERIOS DE INCLUSION

1. Mujeres embarazadas sin infección, en el tercer trimestre de la gestación programadas para cesárea electiva.

CRITERIOS DE EXCLUSION

1. Mujeres embarazadas sin infección en el tercer trimestre de la gestación, en las que el líquido amniótico obtenido sea insuficiente o meconial.
2. Mujeres embarazadas asintomáticas en el tercer trimestre de la gestación, en las que el cultivo inicial de líquido amniótico sea positivo con 10^2 o más unidades formadoras de colonias por ml de líquido amniótico de algún microorganismo.
3. Que haya contaminación durante el procesamiento de la muestra de líquido amniótico.

CRITERIOS DE NO INCLUSION

1. Mujeres embarazadas que hayan recibido antibióticos dos semanas previas a la toma de líquido amniótico.
2. Mujeres embarazadas que cursen con patología infecciosa al momento del estudio.

3. Mujeres embarazadas que estén recibiendo esteroides o inmunosupresores.
4. Mujeres embarazadas con Diabetes Mellitus, colagenopatías o desnutrición de tercer grado.
5. Mujeres embarazadas con ruptura prematura de membranas.

CRITERIOS DE VALIDEZ

AJUSTE BACTERIANO Y RECUENTO DE COLONIAS

FUNDAMENTO

La metodología seguida para realizar el ajuste de las concentraciones bacterianas a probar en el ensayo in vitro sobre la actividad antimicrobiana del líquido amniótico, se fundamenta teóricamente en los métodos que estudian el crecimiento y muerte bacterianos, en particular en los recuentos de cultivos de bacterias como son el de dilución y el de colonias, mismos que se emplean ampliamente cuando se desea hacer un recuento del número de bacterias vivas, y cuyo postulado básico es que cualquier célula viable (viva) inoculada en un medio reciente, se multiplicará y producirá datos de crecimiento de fácil reconocimiento, tales como: turbidez, presencia de ácido o gas en el caldo o colonias en el agar. Estos métodos tienen la ventaja de uniformidad, ya que los exámenes repetidos en una muestra dada dan resultados reproducibles.

1. Recuento por dilución: Con esta técnica se logra una estimación del número de bacterias en la población, que pueden multiplicarse en un medio líquido. Cualquier medio puede emplearse, siempre que fomente el crecimiento de los microorganismos por estudiar.

El recuento por dilución es más exacto si se inoculan varios tubos de medio de cultivo en porciones de 1 ml de cada dilución. Su precisión aumenta al inocular mayor cantidad de tubos con

cada dilución sucesiva, 5 ó 10, por ejemplo.

2. Recuento de colonias (cuentas viables): Se basa en la presuposición de que cada bacteria incluida en medio de agar nutritivo o en su superficie, se multiplicará y producirá una colonia visible. En consecuencia, el número de colonias será el mismo que el número de bacterias viables inoculadas en el agar. Por ejemplo, un ml de una muestra original que contenga 100 bacterias por ml, se espera producirá 100 colonias.

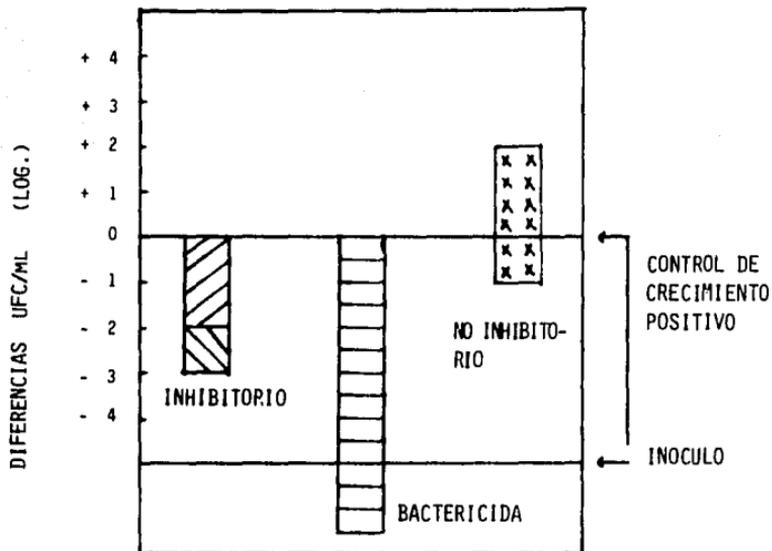
CONTROLES DE CALIDAD

1. Medios de cultivo: Los medios de cultivo (caldo BHI y Agar Soya Tripticasa) serán preparados de acuerdo a las indicaciones específicas de cada casa comercial, posteriormente serán sometidos a prueba de esterilidad incubándolos a 37° C por 24 h en una estufa bacteriológica.
2. Control de esterilidad del líquido amniótico problema: La muestra original de líquido amniótico, antes de ser procesada será inoculada en medios de cultivo bacteriológicos, para corroborar su esterilidad (Agar McConkey, Agar Sangre de Carnero, Caldo de Tioglicolato).
3. Control del inóculo bacteriano: Después de hacer un ajuste bacteriano óptico, a una turbidez parecida a la del tubo N° 0.5 de McFarland, que da una concentración aproximada de bacterias de 1×10^8 UFC/ml, y hacer diluciones 1:10 hasta alcanzar una concentración aproximada de $1 \times 10^{3-4}$ UFC/ml. Se efectuarán cuentas viables para corroborar la cantidad real del inóculo bacteriano.
4. Control de la actividad antimicrobiana del líquido amniótico: Se harán cuentas viables por duplicado no debiendo haber una diferencia mayor del 20% entre una cuenta y otra.

DEFINICIONES OPERACIONALES

1. Actividad inhibitoria del líquido amniótico:
Cuando haya una diferencia de dos o más logaritmos en unidades formadoras de colonias por ml, entre el líquido amniótico problema y su control de crecimiento positivo.
2. Actividad bactericida del líquido amniótico:
Cuando el líquido amniótico probado mate en 99.9% de las bacterias inoculadas.
3. Actividad no inhibitoria del líquido amniótico:
Cuando haya una diferencia menor de dos logaritmos (base 10) en unidades formadoras de colonias por ml, entre el líquido amniótico problema y su control de crecimiento positivo.

DEFINICIONES OPERACIONALES



MATERIAL Y METODOS

1. Obtención de la muestra de líquido amniótico: Las muestras de líquido amniótico fueron tomadas por médicos del Departamento de Gineco-Obstetricia, por punción con jeringa y aguja estériles de las membranas placentarias, antes de seccionarlas, durante cesáreas electivas. El volumen tomado fue de cuando menos 5 ml.

Todas las muestras de líquido amniótico fueron congeladas a menos 20° C hasta su procesamiento, sin que transcurriera más de 24 h.

2. Procesamiento de la muestra de líquido amniótico: La muestra original de líquido amniótico se inoculó en medios de cultivo bacterianos (Agar McConkey, Agar Sangre de Carnero y Caldo de Tioglicolato), para verificar su esterilidad. Posteriormente se centrifugó por 20 minutos a 2,000 rpm para remover partículas de grasa, células epiteliales y eritrocitos (cuando la muestra se contaminaba con sangre).

3. Bacterias: Se utilizaron tres cepas ya conocidas de bacterias, aisladas de cultivos cervicovaginales de mujeres asintomáticas correspondientes a los serotipos Ia, II y III de Streptococcus del grupo B.

De cultivos jóvenes (18 a 24 h de incubación) de estos tres serotipos bacterianos, se preparó una suspensión en solución salina 0.9%, igualada a una turbidez igual al tubo N° 0.5 de McFarland (que proporciona aproximadamente

10^8 UFC/ml'. El inóculo bacteriano se preparó haciendo una dilución de 1:10,000 en solución salina, de la suspensión bacteriana preparada previamente, para alcanzar una concentración final aproximada entre $1 \times 10^{3-4}$ UFC/ml. Para corroborar la cantidad de inóculo se efectuó recuento de colonias bacterianas por medio de cuentas viables.

4. Actividad antimicrobiana del líquido amniótico:

Para cada serotipo la prueba constó de los siguientes tubos:

TUBO 1 (control de crecimiento positivo): 0.5 ml de caldo BHI más 0.5 ml del inóculo bacteriano preparado previamente.

TUBO 2 (líquido amniótico problema): 0.5 ml de la muestra de líquido amniótico más 0.5 ml del inóculo bacteriano preparado previamente.

Todos los tubos fueron incubados en una estufa bacteriológica a 37°C por un período de 24 h. Se efectuó recuento de colonias bacterianas por medio de cuentas viables en placas de Agar Soya tripticasa a las 6, 12 y 24 h de incubación, para construir curvas de crecimiento bacteriano.

RESULTADOS

Estudiamos la actividad antimicrobiana in vitro de 20 muestras de líquido amniótico de mujeres mexicanas en el tercer trimestre de la gestación, contra tres cepas conocidas de SGB, recuperadas a partir de cultivos cervicovaginales de mujeres asintomáticas en diferentes periodos de gestación. Las cepas utilizadas fueron la 32 (serotipo Ia), 524 (serotipo II) y la 204 (serotipo III).

Todas las muestras de líquido amniótico utilizadas fueron tomadas durante cesáreas electivas de mujeres clínicamente sanas. Estas muestras de líquido amniótico antes de ser procesadas fueron inoculadas en medios de cultivo bacterianos para corroborar su esterilidad y eliminar la posibilidad de una infección intra-amniótica subclínica. En todos los casos los cultivos fueron negativos.

En la figura I se observa el crecimiento bacteriano a lo largo de 24 h de las tres cepas de SGB (expresados en medianas y rangos) en las veinte muestras de líquido amniótico.

El rango de crecimiento es amplio para los tres serotipos, entre 6 y 7 unidades, exponenciales en base 10. La mediana de crecimiento después de 24 h de incubación es similar para los serotipos Ia, II y III. Para el serotipo Ia el crecimiento es menor en las primeras 12 h de incubación. Después de 12 h de incubación en líquido amniótico se observa un decremento de la masa bacteriana más marcado para los serotipos II y III que para el Ia, igualándose finalmente

el número de unidades formadoras de colonias (UFC) para los tres serotipos después de 24 h de incubación, con una concentración mínima de 1×10^9 UFC/ml y una concentración máxima de 1×10^{13} (UFC/ml).

En la figura II se comparan las medianas de crecimiento bacteriano de los tres serotipos de SGB en líquido amniótico y en caldo nutritivo (BHI). Se observa que la velocidad de crecimiento durante las primeras 12 h de incubación es mayor en el líquido amniótico con respecto al crecimiento en caldo nutritivo para los serotipos II y III con una caída brusca después de 12 h de incubación. Para el serotipo Ia la mediana de crecimiento siempre es menor en el líquido amniótico con respecto al crecimiento en caldo nutritivo, pero la diferencia es aún más pronunciada después de 24 h de incubación. En general para los tres serotipos, el crecimiento es limitado después de 12 h de incubación resultando en un decremento de la masa bacteriana, en cuanto que en caldo nutritivo se observa aún crecimiento exponencial después de las 12 h de incubación.

En las figuras II a IV, se comparan los resultados individuales del crecimiento bacteriano en cada muestra de líquido amniótico con su respectivo control de crecimiento positivo en caldo nutritivo para obtener la actividad antimicrobiana del líquido amniótico después de 24 h de incubación. Para el serotipo Ia, 16/20 muestras del líquido amniótico tuvieron actividad inhibitoria; para el serotipo II, 11/20 tuvieron actividad inhibitoria y para el serotipo III, 15/20 tuvieron actividad inhibitoria. En ninguna de las muestras se observó actividad bactericida.

En la tabla IV se resumen los resultados de la actividad antimicrobiana de las 20 muestras de líquido amniótico contra los tres serotipos de SGB. En resumen, se observa que a lo largo de las 24 h de incubación el número de muestras que tienen actividad inhibitoria se incrementa.

El análisis estadístico por medio de una prueba de varianza no paramétrica para datos dicotomizados con más de dos muestras y distribución no normal (Q de Cochran) mostró que no hay diferencias significativas entre la actividad inhibitoria del líquido amniótico ($p < 0.05$) contra los tres serotipos de SGB utilizados en los ensayos in vitro (tabla IV), por lo que se deduce que las diferencias numéricas observadas están distribuidas por el azar más que por una diferencia real.

TABLA 4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN 20 MUESTRAS DE LIQUIDO AMNIOTICO DE MUJERES MEXICANAS

| SEROTIPO | TIEMPO DE INCUBACION | | | | | |
|----------|----------------------|----|------|----|------|----|
| | 6 h | | 12 h | | 24 h | |
| | I | NI | I | NI | I | NI |
| Ia | 10 | 10 | 11 | 9 | 16 | 4 |
| II | 6 | 14 | 9 | 11 | 11 | 9 |
| III | 7 | 13 | 11 | 9 | 15 | 5 |

I. INHIBITORIO

NI. NO INHIBITORIO

En ninguno de los casos se encontró actividad bactericida.

TABLA 5. ANALISIS ESTADISTICO (Q DE COCHRAN) DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL LIQUIDO AMNIOTICO CONTRA LOS TRES SEROTIPOS DE SGB PROBADOS A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION

| TIEMPO | S E R O T I P O S | | | | | | |
|--------|-------------------|--------------|---------------|-------|---------|------|--------|
| | Ia (G_1) | II (G_2) | III (G_3) | L_1 | L_1^2 | Q | P |
| 6 h | 10 | 6 | 7 | 23 | 51 | 2.88 | > 0.05 |
| 12 h | 11 | 9 | 11 | 31 | 65 | 0.57 | > 0.05 |
| 24 h | 16 | 11 | 15 | 42 | 104 | 3.81 | > 0.05 |

N = 20

G1 0.05 = 5.99

K = 3

FIGURA I. CURVAS DE CRECIMIENTO EN LIQUIDO AMNIOTICO DE TRES SEROTIPOS DE SGB (MEDIANAS Y RANGOS)

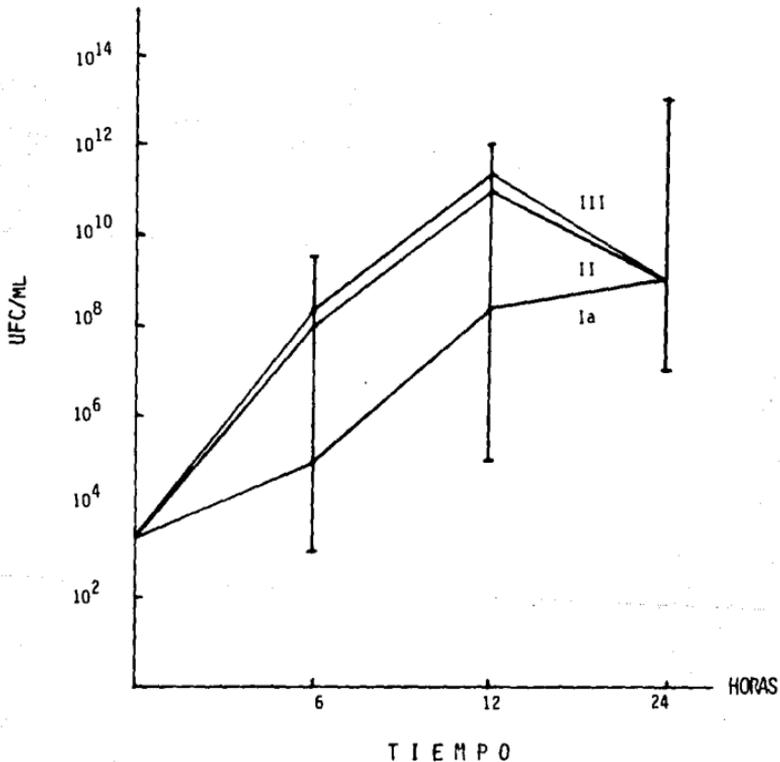
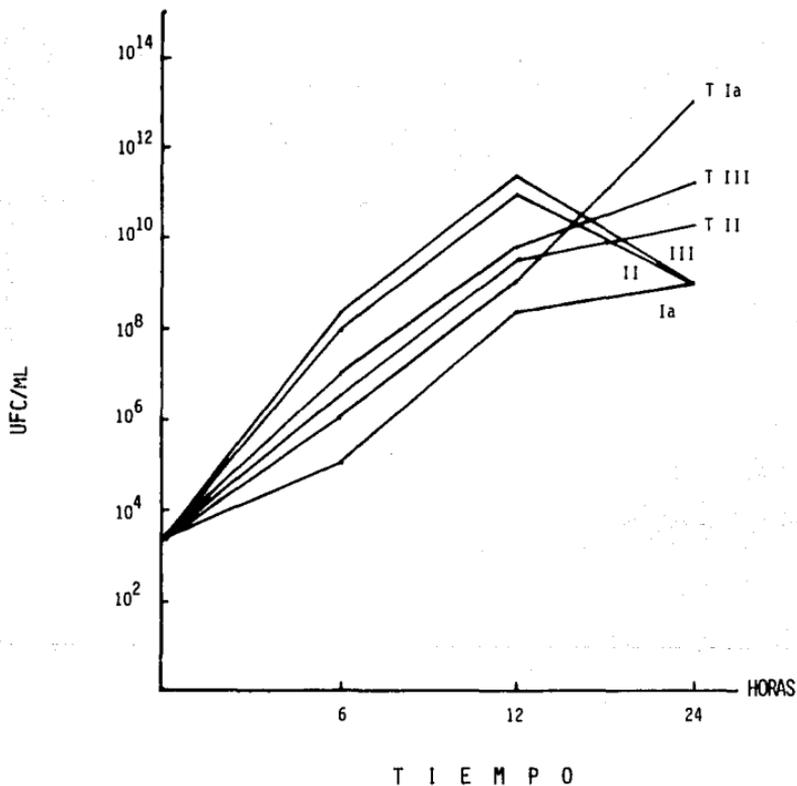
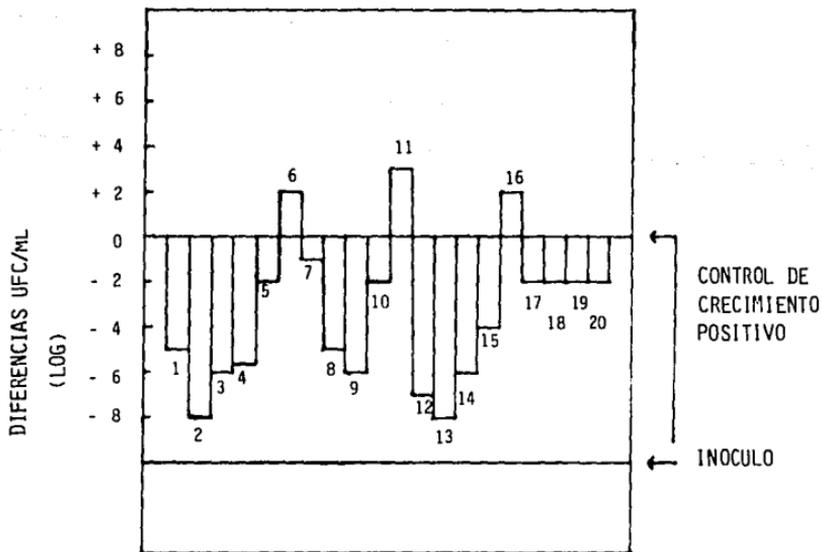


FIGURA II. CURVAS DE CRECIMIENTO EN LIQUIDO AMNIOTICO Y CALDO NUTRITIVO DE TRES SEROTIPOS DE SGB (MEDIANAS)



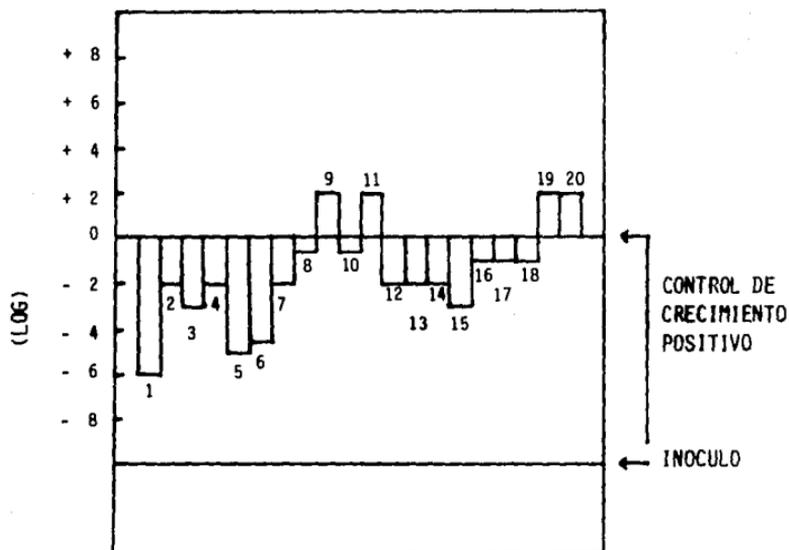
(T) CRECIMIENTO EN CALDO NUTRITIVO

FIGURA III. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL LIQUIDO AMNIOTICO CONTRA SGB SEROTIPO 1A (N=20)



* ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DESPUES DE 24 H DE INCUBACION.

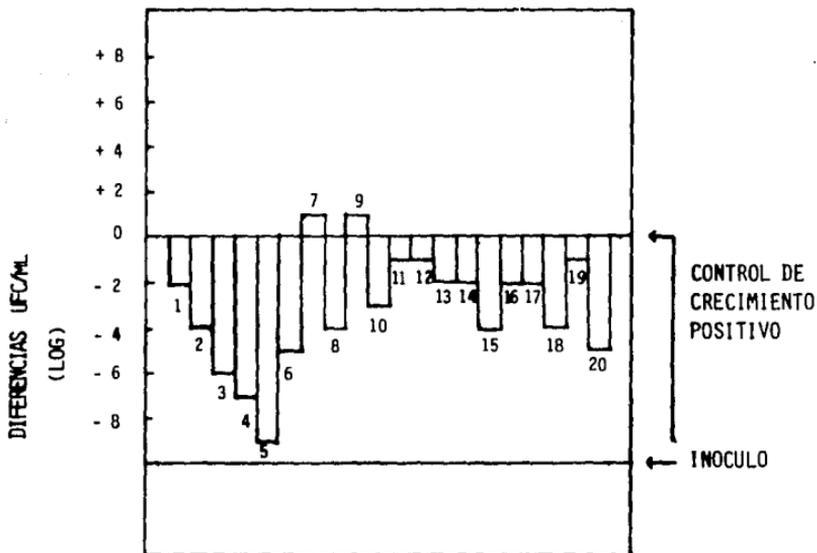
GRAFICA IV. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL LIQUIDO AMNIOTICO CONTRA SGB SEROTIPO 11 (N = 20)



* ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DESPUES DE 24 H DE INCUBACION.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

FIGURA V. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL LIQUIDO AMNIOTICO
CONTRA SGB SEROTIPO III (N = 20)



▪ ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DESPUES DE 24 H
DE INCUBACION

DISCUSION

En México, la frecuencia real de infecciones por SGB es desconocida y tradicionalmente se ha considerado baja, sin embargo, en los 80s en el Instituto Nacional de Perinatología se han identificado varios casos de enfermedad neonatal y materna calculándose una incidencia de 1:1,500 nacidos vivos en los últimos tres años (20).

La frecuencia de infección neonatal generalmente guarda relación directamente proporcional con la frecuencia de colonización materna, en consecuencia los serotipos identificados en los recién nacidos deben guardar relación con los mismos que colonizan el canal cervicovaginal o el tubo digestivo de la mujer embarazada. En el INPer se demostró que la colonización cervicovaginal y del tubo digestivo es del 100% (6) y que los serotipos predominantes son en orden de frecuencia el Ia, II y No tipificables.

En la generación de la enfermedad por SGB, como en otras infecciones, la interacción del agente, hospedero y medio ambiente es fundamental. El cuerpo humano posee varios mecanismos de defensa contra agentes infecciosos, tanto específicos como inespecíficos, que están presentes en la sangre, secreciones y otros líquidos corporales como el líquido amniótico (16-19). Cattaneo fue el primero en reportar que el líquido amniótico tiene propiedades antimicrobianas. En 1983, Blanco y cols. (13, 14), estudiaron la asociación entre la ausencia de actividad antimicrobiana del líquido amniótico y la frecuencia de infección intra-amniótica, encontrando que ésta era más común en mujeres con menor actividad antimicrobiana en el líquido amniótico. En otro es-

tudio, este mismo autor demostró que la infección intra-amniótica es más frecuente cuando existen niveles bajos de IgG en el líquido amniótico (15).

En este estudio investigamos cual es la actividad antimicrobiana de la fracción soluble del líquido amniótico de mujeres mexicanas sanas contra tres serotipos diferentes de SGB.

El estudio in vitro de la actividad antimicrobiana del líquido amniótico se llevó a cabo tomando como punto de referencia curvas normales de crecimiento bacteriano (controles de crecimiento positivo) en medios nutricionalmente completos (en este caso caldo BHI), que representan el crecimiento en número y masa que en condiciones óptimas pueden alcanzar las bacterias en un sistema cerrado de cultivo, de tal manera que la presencia de elementos que limiten el crecimiento o disminuyan la masa bacteriana en un medio líquido pueda ser evaluada en función de un crecimiento normal (en este caso el líquido amniótico).

En los resultados de este estudio observamos que el crecimiento de los SGB tanto en el caldo nutritivo como en el líquido amniótico es muy amplio, esta variación tan amplia refleja el estado metabólico bacteriano en un momento particular del estudio y la presencia de elementos que interfieren con el crecimiento bacteriano (en el caso particular del líquido amniótico). En más de la mitad de las muestras de líquido amniótico utilizadas en este estudio (tabla IV), el crecimiento bacteriano fue menor en 2 ó más unidades exponenciales en base 10 con respecto al crecimiento bacteriano en caldo nutritivo lo que traduce actividad inhibi-

toria. Esta actividad inhibitoria parece ser más tardía para los serotipos de SGB II y III que para el Ia. Evidentemente los elementos que interfieren en el crecimiento bacteriano en el líquido amniótico en ausencia de inflamación está dado por elementos solubles tales como inmunoglobulinas, transferrina, lisozima y complejos de zinc/péptido. La inhibición del crecimiento bacteriano por estos elementos puede estar dada por interferencia de la adsorción bacteriana inicial, bloqueo de ciertos sitios de unión o interferencia con el metabolismo bacteriano como en el caso de la transferrina.

La falta de actividad bactericida del líquido amniótico encontrada en este estudio ya era esperada ya que entre las principales reacciones inmunológicas para microorganismos como los SGB está la fagocitosis. En ausencia de inflamación, el líquido amniótico carece de células fagocíticas y quizás los elementos solubles en el líquido amniótico que le confieren sus propiedades antimicrobianas sean insuficientes para producir la muerte de los SGB.

Es probable que la actividad inhibitoria del líquido amniótico presente es más de la mitad de las mujeres estudiadas expliquen en parte la baja frecuencia de infección perinatal por SGB en nuestro país. Otros mecanismos involucrados podrían ser: presencia de anticuerpos maternos suficientes para impedir la invasión a tejidos infección por SGB, transferencia de anticuerpos maternos por vía transplacentaria que protegieran al recién nacido y/o menor patogenicidad de las cepas de SGB que colonizan en nuestro medio.

Para corroborar las hipótesis antes mencionadas son necesarios: medición de anticuerpos contra SGB en la madre y en sus recién nacidos, determinación de los niveles de anticuerpos que confieren protección contra la infección, medición de los elementos del líquido amniótico que le confieren sus propiedades antimicrobianas, estudios de seguimiento para correlacionar los elementos de la respuesta inmune con la frecuencia de infección por SGB y por último estudios de patogenicidad de las cepas de SGB aisladas más frecuentemente del canal cervicovaginal y tubo digestivo de mujeres mexicanas comparadas con cepas de SGB aisladas de pacientes con infección perinatal.

CONCLUSIONES

1. El líquido amniótico de mujeres mexicanas sin infección tiene actividad inhibitoria en más de la mitad de los casos (Ia 16/20, II 11/20, III 15/20) contra los serotipos de SGB aislados más frecuentemente de cultivos cervicovaginales.
2. En ninguno de los casos se encontró que el líquido amniótico tuviera actividad bactericida contra los tres serotipos de SGB probados.
3. No hay diferencias de la actividad inhibitoria del líquido amniótico contra los diferentes serotipos de SGB aislados más frecuentemente de cultivos cervicovaginales.
4. Se desconoce cual es la cantidad y la proporción de los diferentes elementos que le confieren la propiedad antimicrobiana al líquido amniótico en mujeres mexicanas.
5. Se puede deducir que la baja frecuencia de infección perinatal por SGB en México es en parte por la actividad inhibitoria que presenta el líquido amniótico en más de la mitad de los casos, pero se sugiere en este caso hacer estudios de seguimiento para correlacionar la actividad antimicrobiana del líquido amniótico con la frecuencia de infección perinatal por SGB.

BIBLIOGRAFIA

1. Bobitt JR, Damato JD, Colonel L, Sakakini J Jr: Perinatal complications in group B Streptococcal carriers: A longitudinal study of prenatal patients. Am J Obstet Gynecol. 1985; 151:711-717.
2. From The National Institutes of Health: Summary of the workshop on perinatal infectious due to group B Streptococcus. J Infect Dis. 1977; 136:137-152.
3. Rand TH: Group B Streptococcal cellulitis in infants: A disease modified by prior antibiotic therapy or hospitaliation ?. Pediatrics. 1988; 81:63-65.
4. Yow MD, Leeds LJ, Thompson PK, et al: The natural history of group B Streptococcal colonization in pregnant woman and her offspring. Am J Obstet Gynecol. 1980; 137:34-38.
5. Speck WT, Driscoll JM, Polin RA, et al: Staphylococcal and streptococcal colonization of the newborn infant. Am J Dis Child. 1977; 131:1005-1008.
6. Solórzano SF, Echaniz AG, Conde GC, et al: Cervicovaginal infection with group B streptococci among pregnant mexican women. J Infect Dis. 1989; 159:1003-1004.
7. Shigeoka AO, Rote NS, Santos JI, Hill HR: Assesment of the virulence factors of group B streptococci: Correlation with sialic acid content. J Infect Dis. 1983; 147:857-863.

8. Beargie R, Lynd P, Tucker E, Duhring J: Perinatal infection and vaginal flora. Am J Obstet Gynecol. 1975; 122:31-33.
9. Abbasi LA, Comander L, Hemming VG, Eglinton GS: Proliferation of group B Streptococci in human amniotic fluid in vitro. Am J Obstet Gynecol. 1987; 156:95-99.
10. Appelbaum PC, Holloway Y, Ross SM, Dhupelia I: The effect of amniotic fluid on bacterial growth in three population groups. Am J Obstet Gynecol. 1977; 128:868-871.
11. Schlievert P, Larsen B, Johnson W, Galesk R: Bacterial growth inhibition by amniotic fluid. Am J Obstet Gynecol. 1975; 122:814-819.
12. Miller J, Michel J, Bercovici B, Argaman M: Studies on antimicrobial activity of amniotic fluid. Am J Obstet Gynecol. 1976; 125:212-214.
13. Blanco J, Gibbs R, Krebs L: Inhibition of group B Streptococci by amniotic fluid from patients with intra-amniotic infection and from control subjects. Am J Obstet Gynecol. 1983; 147:247-250.
14. Blanco J, Gibbs R, Krebs L, Castañeda Y: The association between the absence of amniotic fluid bacterial inhibitory activity and intra-amniotic infection. Am J Obstet Gynecol. 1983; 61:450-453.

15. Blanco J, Gibbs R, Krebs LP: A controlled study of amniotic fluid immunoglobulin levels in intra-amniotic infection. *Obstet Gynecol.* 1982; 61:450-453.
16. Levy NJ, Kasper DL: Immunity to group B Streptococcus *Clin Immunol Newsletter.* 1986; 7:27-31.
17. Gray B, Springfield JD, Dillon HC Jr: Type-specific streptococcal antibodies in amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol.* 1987; 156:666-669.
18. Cederquist LL, Ewool LC, Bonsnes RW, Litwin SD; Detectability and pattern of immunoglobulins in normal amniotic fluid throughout gestation. *Am J Obstet Gyencol.* 1978; 1330:220-224.
19. Tomblin J, Davis B, Larsen B: Phosphate content of human amniotic fluid and its relationship to bacterial growth inhibition. *Am J Reprod Immunol Microbiol.* 1987; 13:33-35.
20. Solórzano SF, Díaz RR, Arredondo JL: Diseases caused by group B Streptococcus in Mexico. *Pediatr Infect Dis.* 1990; 1:66.