

11262



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

13  
2ej

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS

"LA POBRE CAPACIDAD BIOSINTETICA DE ANTIGENO TIPOESPECIFICO  
EXPLICA LA ELEVADA PREVALENCIA DE CEPAS NO TIPIFICABLES DE  
*Streptococcus* DEL GRUPO B EN MEXICO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS

P R E S E N T E :

DR. GERARDO DEL CARMEN PALACIOS SAUCEDO



Tutor: Dr. Fortino Solórzano Santos  
Asesor: Dr. Stephen J. Mattingly  
Elizabeth K. Eskew

MEXICO, D.F.

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

264118



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

En primer lugar, quiero dar muchas gracias a Dios por la oportunidad de poder concluir este trabajo. Reconozco que sin El esto no hubiera sido posible. El ha provisto en abundancia en todos los aspectos de mi vida, por lo que sólo me queda reconocer que:

**"... en él vivimos, y nos movemos y somos."** (Libro de los Hechos 17:28)

El amor, apoyo, estímulo y comprensión de la persona que Dios ha dispuesto para compartir toda experiencia, no los puedo retribuir con nada. Es mi esposa Martha, a quien tanto debo y por quien tanto agradezco al Dios de toda gracia. Por esta gracia, en verdad soy mas que bienaventurado.

**"El que halla esposa halla el bien, y alcanza la benevolencia de Dios."** (Proverbios 18:17)

El ejemplo de dedicación y carácter de quien dirigió al alumno en esta empresa. Comprensión, paciencia, confianza y estímulo siempre. ¿He aprendido? Sí. ¿Harto? Creo... que sí. Muchas Gracias Dr. Fortino Solórzano Santos. Gracias a Dios por tu amistad.

**"Y amigo hay más unido que un hermano."** (Proverbios 28:24)

Ellos se esforzaron. Sacrificio amoroso en todo tiempo. Ejemplo, dedicación, provisión. Ocho vástagos sacaron adelante. Mis padres, Javier y Rosa María: gracias por tanto. ¿Qué puedo hacer? Aunque es nada cuanto haga, es menester. Gratitud y alabanza a mi Dios por Ustedes.

Respeto y amor en todo tiempo. Apoyado y comprendido. Instrumentos de Dios. Mis suegros: Guadalupe y Rodolfo, Gracias a Dios por sus vidas

**"Honra a tu padre y a tu madre..."** (Exodo 20:12)

Support and confidence I always got from you. You opened your door. I received knowledge and experience from you all the time. I appreciate too much your continuous friendly attitude. I thank you very much for everything Dr. Stephen J. Mattingly and Elizabeth K. Eskew.

A mis hermanos, hermanas y hermano político, a todos mis maestros y compañeros, muchas gracias.

## INDICE GENERAL

	Página
<b>INDICE GENERAL.....</b>	<b>I</b>
<b>INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....</b>	<b>III</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>2</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
1. Agentes etiológicos de sepsis neonatal.	3
2. Estreptococo del grupo B como causa de infecciones neonatales.	4
3. El microorganismo ( <i>Streptococcus agalactiae</i> o Estreptococo del grupo B).	6
4. Factores de virulencia de Estreptococo del grupo B.	7
5. Antígeno específico de tipo y métodos de extracción.	7
6. Clasificación serológica de Estreptococo del grupo B.	9
7. Estreptococo del grupo B en países en desarrollo.	12
8. Estreptococo del grupo B en México.	13
<b>JUSTIFICACION.....</b>	<b>17</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>HIPOTESIS.....</b>	<b>18</b>
<b>MATERIAL Y METODOS .....</b>	<b>19</b>
1. Muestra.	19
a) Aislamientos bacterianos.	

b) Origen y selección de los aislamientos.	
c) Definición de los aislamientos.	
d) Cepa control.	
2. Medios de crecimiento.	20
3. Preparación de antígenos para serotipificación.	20
a) Método de extracción ácida caliente.	
b) Método de extracción enzimática.	
4. Procedimiento de serotipificación.	23
5. Preparación de antígenos para la cuantificación de antígeno específico de tipo.	24
a) Preparación del antígeno aislado del medio sobrenadante.	
b) Preparación del antígeno adherido a la célula.	
6. Procedimiento de cuantificación del antígeno específico de tipo.	25
7. Cálculo de la cantidad de antígeno específico de tipo.	27
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
1. Serotipificación de antígenos preparados por extracción ácida caliente.	29
2. Serotipificación de antígenos extraídos enzimáticamente a diferentes concentraciones.	29
3. Cuantificación del antígeno específico de tipo soluble extracelular.	35
4. Cuantificación del antígeno específico de tipo adherido a la superficie de la célula.	38
5. Serotipificación de las fracciones positivas a ácido siálico.	38
<b>DISCUSION.....</b>	<b>40</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>50</b>

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

---

<b>Tabla 1.</b>	<b>Serotipos y determinantes antigénicos de <i>Streptococo</i> del grupo B de origen humano.</b>	<b>Página 11</b>
<b>Tabla 2.</b>	<b>Interpretación de la prueba de precipitación en tubo capilar.</b>	<b>Página 23</b>
<b>Tabla 3.</b>	<b>Serotipos de 57 aislamientos mexicanos de <i>Streptococo</i> del grupo B utilizando antígenos preparados por extracción ácida caliente y extracción enzimática.</b>	<b>Página 31</b>
<b>Tabla 4.</b>	<b>Concentraciones requeridas de antígenos para serotipificar 23 aislados "no tipificables" de <i>Streptococo</i> del grupo B.</b>	<b>Página 32</b>
<b>Tabla 5.</b>	<b>Resultados de la serotipificación de 8 aislados "no tipificables" de <i>Streptococo</i> del grupo B con diferentes concentraciones de antígenos.</b>	<b>Página 34</b>
<b>Tabla 6.</b>	<b>Contenido de ácido siálico en dos alíquotas del líquido sobrenadante de los aislados 14 y 110.</b>	<b>Página 36</b>
<b>Figura 1.</b>	<b>Diagrama resumido de la preparación de los antígenos para serotipificación.</b>	<b>Página 22</b>
<b>Figura 2.</b>	<b>Diagrama resumido de la purificación y cuantificación del antígeno específico de tipo.</b>	<b>Página 26</b>
<b>Figura 3.</b>	<b>Contenido de ácido siálico en el líquido sobrenadante de los aislados 14, 49 y 110.</b>	<b>Página 37</b>
<b>Figura 4.</b>	<b>Contenido de ácido siálico del antígeno adherido a la superficie de la célula obtenido por extracción enzimática de los aislados 14, 49 y 110.</b>	<b>Página 39</b>
<b>Tabla A.</b>	<b>Resultados de la serotipificación de 23 aislados "no tipificables" de <i>Streptococo</i> del grupo B utilizando diferentes concentraciones de antígenos.</b>	<b>Página 58</b>

---

## RESUMEN

En Estados Unidos de Norteamérica y otros países desarrollados, *Streptococo* del grupo B del tipo III es el serotipo prevalente. En México los serotipos Ia y Ia/c han sido los más frecuentemente identificados con un porcentaje alto de aislamientos no tipificables (12%). Estos últimos son raramente encontradas en países desarrollados. Debido a esto, la baja incidencia de enfermedad neonatal invasiva por *Streptococo* del Grupo B en México, ha sido atribuida a la baja prevalencia de aislamientos del serotipo III y a la elevada prevalencia de aislados no tipificables. Con el objeto de evaluar si aislados no tipificables de *Streptococo* del Grupo B pueden ser serotipificados si se obtienen mayores cantidades de antígeno específico de tipo, 57 aislamientos mexicanos fueron inicialmente serotipificados con antígenos preparados por el procedimiento de extracción ácida caliente de Lancefield. Estos aislamientos fueron posteriormente evaluados para la presencia de antígeno específico de tipo por un procedimiento de extracción enzimática de la pared celular con *N*-acetilmuramidasa, y por el aislamiento de antígeno de tipo soluble del medio sobrenadante. Las suspensiones antigénicas obtenidas fueron concentradas 10X, 100X y 1000X, y serotipificadas. De los 28 aislados inicialmente no tipificables, 23 fueron serotipificados con los extractos enzimáticos, la mayoría (10/23) fue del serotipo III. Los otros aislamientos fueron del tipo II (cinco), tipo Ib (cuatro), tipo Ia (tres) y tipo Ic (uno). La mayoría de los aislados no tipificables requirieron suspensiones de antígeno más concentradas para ser serotipificados. Además, se midió el contenido de ácido siálico (principal componente del antígeno específico de tipo de *Streptococo* del grupo B) de las células y del medio sobrenadante de tres aislados crecidos en 1000 ml de medio de cultivo. Un aislamiento "no tipificable" con los dos métodos inicialmente utilizados, pudo ser serotipificado a pesar de producir niveles apenas detectables de ácido siálico. Estos resultados muestran que la mayoría de los aislamientos "no tipificables" por los métodos estándar, pueden ser serotipificados cuando se emplean métodos que permiten obtener mayor cantidad de antígeno específico de tipo no degradado y, por lo tanto, son "no tipificables" debido a que son pobres productores de dicho antígeno. Además, los resultados de este estudio sugieren que los aislamientos clasificados como no tipificables por el método de Lancefield deben ser examinados por el procedimiento de extracción enzimática para determinar la presencia de antígeno específico de tipo. Estos hallazgos están en contra de la hipótesis que atribuía la baja incidencia de enfermedad invasiva por *Streptococo* del Grupo B en México, a la prevalencia alta de aislados no tipificables y a la baja prevalencia de aislados del serotipo III.

## SUMMARY

In USA and other developed countries type III is the prevalent serotype of Group B streptococci (GBS); in contrast, in Mexico the most frequently identified serotypes are Ia and Ia/c. In addition, nontypeable strains account for 12% of the isolates in Mexico and <1% of the isolates in the United States. Therefore, the low incidence of GBS invasive disease in Mexico has been attributed to the low prevalence of serotype III isolates and the high prevalence of nontypable isolates. In this study, 57 GBS isolates (28 nontypeable by the Lancefield's hot-acid extraction procedure) from carrier and infected neonates and women from Mexico were also examined for the presence of type-specific antigen by an enzymatic procedure using *N*-acetylmuramidase digestion of the cell wall, and by isolating the soluble type-specific antigen from the supernatant medium. Of the 28 nontypeable strains, 23 were serotyped by the enzyme extraction procedure, with serotype III being the predominant serotype in invasive disease (10/23). The other strains were type II (five isolates), type Ib (four isolates), Ia (three), and Ic (one). Nontypeable strains required more concentrated antigen suspensions to be serotyped. Furthermore, the sialic acid content (a main component of GBS type-specific antigen [TSA]) from cells and supernatant fluid of three strains grown in 1 liter of culture medium was quantitated. A carrier isolate nontypeable by both extraction procedures was now typeable as Ia though it produced barely detectable levels of sialic acid-containing antigen. Our results suggest that many nontypable strains by standard methods can be serotyped when methods obtaining bigger quantities of intact TSA are used, and discard the hypothesis attributing the low frequency of GBS invasive disease in Mexico to the low of type III and high of nontypeable strain prevalences. These results suggest that nontypeable isolates of GBS should be further examined by the enzymatic extraction procedure to determine the presence of TSA.



## ANTECEDENTES

### 1. Agentes etiológicos de sepsis neonatal.

Los agentes etiológicos de sepsis neonatal han cambiado a través del tiempo. Una serie de reportes realizados por pediatras en el Hospital New-Haven en Yale, cubriendo un periodo de 60 años, de 1928 a 1988, demuestran este patrón cambiante de la etiología bacteriana de la sepsis neonatal (1-3). Los bacilos entéricos, particularmente *Escherichia coli*, llegaron a ser la causa predominante de infecciones serias en el recién nacido. Sin embargo, a finales de la década de los sesentas y principios de los setentas, se suscitó un incremento rápido en la frecuencia de casos de sepsis neonatal causados por *Streptococo* del grupo B, llegando a superar a *E. coli* como el líder causante de esta patología (4-8). El surgimiento de *Streptococo* del grupo B como un patógeno neonatal contribuyó a un incremento absoluto real en la tasa de infecciones neonatales serias, ya que no hubo un cambio sustancial en la incidencia de infecciones neonatales por *E. coli* y otros microorganismos adquiridos de la madre (1,4,9).

Estos y otros estudios muestran también la importancia que empezaron a tener algunos gérmenes de origen nosocomial, tales como *Staphylococcus epidermidis*. Esto como resultado del desarrollo de procedimientos más invasivos para el tratamiento en unidades de cuidados intensivos neonatales, entre otros factores. Otra consecuencia de este desarrollo fue una reducción paulatina en la letalidad y, por lo tanto, mayor supervivencia neonatal a eventos de sepsis (1-3).

Hasta el momento, se desconoce el porque de este cambio en la microbiología del recién nacido humano. No se sabe si dicho cambio fue debido al microorganismo en si, al huésped mismo o fue una consecuencia de cambios en el medio ambiente (1-3,9). Sea lo que haya sido, el caso de Estreptococo del grupo B probablemente constituye una advertencia más de la capacidad de los microorganismos para trastornar un balance ecológico ya alterado (9).

## **2. Estreptococo del grupo B como causa de infecciones neonatales.**

Aunque *Streptococcus agalactiae* o Estreptococo del grupo B fue descrito por Nocard desde 1880, fue asociado sólo de manera casual a enfermedad humana hasta 1938 (10), y no fue sino hasta la década de los setentas cuando fue reconocido como un patógeno humano real y "serio" (11,12). Hasta entonces, sólo era reconocido como una de las principales causas de mastitis bovina por veterinarios (13,14). Este surgimiento de Estreptococo del grupo B, a finales de los sesentas y principios de los setentas, como una causa importante de morbilidad y mortalidad neonatal no ha sido universal. La mayoría de los estudios sobre Estreptococo del grupo B y los reportes de casos proceden de países desarrollados (4,5,7-9,15). En cambio, en países en vías de desarrollo el papel de Estreptococo del grupo B en infección, hasta hace algunos años, ha sido considerado pobre o ha sido ignorado (6,15,16).

Desde dicho surgimiento a principios de la década de los setentas, Estreptococo del grupo B ha sido la causa número uno de infecciones neonatales serias en los países desarrollados (3-5,7,8,17). Aunque los reportes son muy variables, ha sido aislado de cultivos del tracto genital e intestinal bajo en el 4.6 a 41 % de las mujeres embarazadas (17). Estas diferencias en las tasas de colonización se deben

no sólo a diferencias en las poblaciones estudiadas (por ejemplo edad, paridad, estado socioeconómico, localización geográfica, etc.), sino también a la falta de estandarización en los métodos utilizados para el aislamiento (17,18). A pesar de esto, algunas de estas diferencias en las tasas de colonización se atribuyeron a diferencias verdaderas en las poblaciones estudiadas. Así, tasas de colonización bajas fueron consistentemente reportadas en algunas áreas geográficas, entre ellas México (17,19-21).

De la misma manera, las cifras de colonización reportadas en el recién nacido han sido muy variables. Diversos estudios prospectivos han demostrado que la transmisión vertical ocurre en 29 a 85 % de los neonatos nacidos de madres colonizadas con *Estreptococo* del grupo B, con una tasa media del 51 % (17). Diversos factores perinatales, tales como la edad y paridad de la mujer y la persistencia de la colonización materna, parecen jugar un papel importante en este fenómeno (4,5,11,12,17,22-24).

Dos formas clínicas de la enfermedad neonatal causada por *Estreptococo* del grupo B han sido reconocidas desde hace tiempo. En la forma de inicio temprano ("enfermedad de inicio temprano") las manifestaciones clínicas inician dentro de los primeros 7 a 10 días después del nacimiento, se manifiesta principalmente por neumonía y sepsis, y es causada por cualquiera de los serotipos de *Estreptococo* del grupo B. Por el contrario, en la "enfermedad de inicio tardío" las manifestaciones clínicas inician después de los 7 a 10 días de vida, la mayoría de los casos cursa con meningitis, y es causada más frecuentemente por aislamientos del serotipo III (3,8,17). En Estados Unidos de Norteamérica y otros países desarrollados, las tasas de ataque para el recién nacido oscilan entre 0.7 y 3.7/1000 recién nacidos vivos, con un promedio de 2/1000 en enfermedad de inicio temprano (4,5,15,17,22,23,25,26). Además, la probabilidad de infección

sintomática temprana en el recién nacido también depende de diversos factores perinatales, tales como prematuridad, ruptura prematura de las membranas fetales, asfixia al nacimiento y corioamniotitis materna (4,5,11,12,17,22-24). En cambio, la enfermedad de inicio tardío ocurre en 0.5 a 1.8 de cada 1000 recién nacidos vivos (4,15,17,26).

La letalidad asociada a sepsis neonatal se ha reducido sustancialmente en los últimos años en los países desarrollados. Entre diversos factores para esta reducción, el más importante parece ser el rápido desarrollo de procedimientos para el cuidado intensivo del recién nacido (2,3,8). La letalidad relacionada a infección por *Streptococcus* del grupo B en Estados Unidos de Norteamérica promedia 5.8% (8,17,26).

### **3. El microorganismo (*Streptococcus agalactiae* o Estreptococo del grupo B).**

Estreptococo del grupo B de Lancefield (*Streptococcus agalactiae*), es un microorganismo cocoide, que generalmente forma pares, grampositivo y anaerobio facultativo. Crece en colonias pequeñas planas, mucoides y de color blanco grisáceo en placas de agar sangre, y produce una zona estrecha de beta-hemólisis. Menos del 1 % de los aislados son no hemolíticos (15,17). La mayoría de los aislados son bacitracina resistentes, hidrolizan el hipurato de sodio, son incapaces de hidrolizar bilis-esculina y producen factor CAMP (hemólisis sinérgica con *S. aureus* productor de beta-lisina). Su identificación microbiológica definitiva requiere de métodos serológicos para identificar el antígeno carbohidrato de grupo (17,27). Diferentes métodos para la identificación del antígeno de grupo B han sido desarrollados; sin embargo, debido a su simplicidad y disponibilidad comercial, el más ampliamente utilizado es

aglutinación de látex (17,27,28). Estreptococo del grupo B es fácilmente cultivado, no obstante, su aislamiento desde ciertos sitios corporales altamente contaminados es mejorado cuando se utilizan medios de cultivo líquido enriquecidos y suplementados con antibióticos (17,27,29,30).

#### **4. Factores de virulencia de Estreptococo del grupo B.**

Estreptococo del grupo B elabora varios productos extracelulares, algunos de los cuales han sido identificados como (o podrían ser potenciales) factores de virulencia. Entre éstos tenemos hialuronidasa, proteasa, C5a-peptidasa, hemolisinas, pigmentos, nucleasas y ácido lipoteicoico. (17,18,27,28). Sin embargo, el principal determinante de la virulencia en Estreptococo del grupo B es el antígeno polisacárido capsular específico de tipo, particularmente el del tipo III (31-33). Además, parece que la cantidad de ácido siálico en dicho polisacárido es el factor directamente responsable de la virulencia (34,35). Así, mutantes que expresan polisacárido capsular sin ácido siálico pierden su capacidad patogénica (32,33,36), y se ha demostrado que la sialilación de la superficie de Estreptococo del grupo B juega un papel crucial en la evasión de la fagocitosis por macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (17,37,38).

#### **5. Antígeno específico de tipo y métodos de extracción.**

El antígeno de tipo es un polisacárido capsular ligado covalentemente al peptidoglicano de la pared celular (17,28,31,39,40). Es un polímero compuesto de glucosa, galactosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico en una relación molar 2:1:1:1 en la mayoría de las cepas, y arreglados de manera diferente en los

diferentes serotipos (17,18,41,42). El ácido siálico o ácido *N*-acetilneuramínico, constituye alrededor del 25% del antígeno específico de tipo y es el principal inmunodeterminante de este antígeno (31,43,44).

Alrededor del 85% del antígeno específico de tipo permanece adherido a la superficie de la célula (unido covalentemente al peptidoglicano de la pared celular), el resto (cerca del 10%) es liberado como antígeno soluble al medio extracelular (39,45). Además, por diferentes métodos se ha demostrado que *Streptococo* del grupo B libera al medio extracelular dos clases de antígeno de tipo, un componente de alto peso molecular (HMW type antigen) que tiene un papel determinante en la virulencia, y un componente de bajo peso molecular (LMW type antigen). Ambos contienen ácido siálico y reaccionan con antisuero específico de tipo (45). Se ha demostrado que cepas altamente virulentas poseen niveles más altos de antígeno de tipo de alto peso molecular adherido a la superficie de la célula, y que la molécula de ácido siálico incrementa la virulencia de dicho antígeno, sobre todo del antígeno del tipo III (17,31,32,37,38).

Existen diferentes procedimientos para la extracción de antígenos estreptocócicos de células completas con fines de agrupación y clasificación en tipos. Entre éstos tenemos el método de extracción ácida caliente (46), el procedimiento del ácido tricloroacético (47), el método "buffer" neutral (34,48) y los métodos que utilizan formamida caliente, solución salina o por autoclave (49). Además, se han descrito diferentes procedimientos de extracción enzimática, como los que utilizan pronasa B, lisozima y otras enzimas (17,27,50).

El procedimiento de extracción ácida caliente de células completas descrito por Lancefield, es el método utilizado habitualmente (método estándar) para la extracción de antígenos con fines de agrupación y clasificación en serotipos de *Streptococo* del grupo B (17,27,28). No obstante, se ha demostrado que los

productos obtenidos con este y otros métodos han sufrido degradación parcial, lo cual resulta en polímeros desprovistos de ácido siálico y en mezclas complejas de antígenos específico de grupo, de tipo y otros antígenos de reactividad cruzada (17,39,45,48). En cambio, procedimientos de extracción más "leves", como los que utilizan ácido tricloroacético frío o "buffer" EDTA neutral o métodos enzimáticos, resultan en polisacáridos de mayor peso molecular y en mayor cantidad, los cuales retienen sus componentes acidolábiles tales como el ácido siálico (27,34,47,48,50,51). Así, se ha demostrado que la extracción enzimática con *N*-acetilmuramidasa resulta en 20 veces más antígeno de alto peso molecular que el procedimiento de extracción "buffer" neutral (39). Por otro lado, el aislamiento desde el medio de cultivo sobrenadante de antígenos polisacáridos solubles liberados por la célula, ha resultado en alta producción de antígeno específico de tipo de alto peso molecular no degradado o intacto (45).

## **6. Clasificación serológica de *Streptococo* del grupo B.**

*Streptococo* del grupo B ha sido clasificado en diferentes serotipos con base en su antígeno polisacárido capsular y en unos pocos antígenos proteicos de la pared celular (17,18,52,53). Originalmente, tres serotipos fueron reconocidos (I, II y III). Posteriormente, antígenos de reactividad cruzada permitieron clasificar a cepas del tipo I en los serotipos Ia, Ib y Ic (17,52-55). Más recientemente otros tres serotipos han sido reconocidos, los serotipos IV, V y VI, estos últimos se han relacionado a enfermedad en el adulto con ciertos factores predisponentes (17,56). El establecimiento de una clasificación uniforme de los aislamientos de *Streptococo* del grupo B en serotipos ha sido difícil. Debido a esto, inconsistencia en la nomenclatura en los diferentes reportes ha sido la regla. Esto

motivó la realización de varias reuniones de grupos expertos para tratar de unificar la clasificación serológica de *Streptococo* del grupo B (Tabla 1) (54,57).

En países desarrollados, el serotipo III de *Streptococo* del grupo B ha sido el más consistentemente aislado, tanto en sujetos asintomáticos como en casos de enfermedad invasiva neonatal, independientemente del tipo de enfermedad (17,58). Aproximadamente 90% de los aislamientos de lactantes con meningitis (independientemente de la edad de inicio), y de lactantes con infección de inicio tardío (independientemente del cuadro clínico) pertenecen al serotipo III (5,34,47,58-60). Otro hallazgo que ha sido constante en países desarrollados, es la baja frecuencia de aislamientos no tipificables. Así, aislados obtenidos tanto de sujetos asintomáticos como de pacientes con infecciones "serias" y que no pueden ser serologicamente clasificados, corresponden a menos del 1% del total de los aislamientos (17,58,59).



**Tabla 1.** Serotipos y determinantes antigénicos de *Streptococo* del grupo B de origen humano\*.

Serotipo		Antígenos polisacáridos		Antígenos proteicos	
Actual	Histórico	Mayor	Menor/Compartido	Actual	Histórico
Ia	Ia	Ia	Iabc	-	-
Ib	Ib	Ib	Iabc	c	Ibc
Ia/c	Ic	Ia	Iabc	c	Ibc
II	II	II		c	Ibc
III	III	III		c, X, R	Ibc, X, R
IV		IV		c, X, R	Ibc, X, R
V		V		c	-
VI		VI		ND	-

\* Reproducción parcial de Baker 1995.  
 ND: no determinado.

## 7. Estreptococo del grupo B en países en desarrollo.

En general, la información sobre Estreptococo del grupo B y su relación con morbilidad y mortalidad en países en vías de desarrollo es escasa. Esto se debe, fundamentalmente, a deficiencias en los sistemas de reporte y a limitaciones de laboratorio (6). No obstante, a pesar de la poca información, la prevalencia de colonización materna por Estreptococo del grupo B oscila entre 4 y 30 %, cifras más o menos similares a las reportadas en Estados Unidos de Norteamérica (6,17). Probablemente, estas tasas de prevalencia son subestimaciones de las prevalencias reales en dichos países, debido a que los sitios cultivados, el número de sitios muestreados y las técnicas de cultivo utilizadas han sido, en general, menos óptimas que las empleadas en los estudios realizados en países desarrollados (6,17).

En lo que respecta a enfermedad neonatal, la mayoría de las publicaciones de países en vías de desarrollo corresponden a reportes de casos. Así, no existen datos suficientes para poder hacer un cálculo de las tasas de incidencia en tales países (6).

En base a estos y otros resultados, Walsh y colaboradores hicieron una estimación del papel probable de Estreptococo del grupo B en infección neonatal en "el mundo en desarrollo". Estimaron que Estreptococo del grupo B podría ser responsable de una cuarta parte o más de los casos totales de sepsis neonatal en el conjunto de países en vías de desarrollo. Los autores sugirieron que "la participación de Estreptococo del grupo B en infección en "el mundo en desarrollo" necesita ser explorada (6).

## 8. Estreptococo del grupo B en México.

El primer estudio en evaluar mujeres, por lo menos, de origen mexicano, es el publicado por Anthony y colaboradores en 1978 (61). En un estudio longitudinal de tres años de seguimiento, evaluaron a través de observaciones seriadas el estado de colonización por Estreptococo del grupo B en 382 mujeres embarazadas del área de Los Angeles, California. La colonización por Estreptococo del grupo B fue significativamente menor entre mujeres de origen mexicano, en mujeres mayores de 20 años de edad y en multiparas. El 18.4 % de las mujeres de origen mexicano evaluadas eran portadoras de Estreptococo del grupo B, por lo menos en una de las muestras. En cambio, las mujeres de origen caucásico y negras estuvieron colonizadas en una proporción mayor, 40 y 30 % respectivamente. Otro aspecto interesante fueron los resultados sobre la persistencia de la colonización, clasificada como crónica, transitoria e intermitente. La intermitencia en la colonización por Estreptococo del grupo B ha sido previamente descrita (4,61), y en éste como en otros estudios la colonización materna crónica estuvo fuertemente asociada al riesgo de infección para el recién nacido.

El primer estudio sobre Estreptococo del grupo B realizado en México, fue el publicado por Collado y colaboradores en 1981 (16). En una muestra de 200 mujeres mexicanas de clase media baja, se encontró colonización genital en el 4 % después de muestreo múltiple y en el 1.5 % al considerar una muestra única. Debido a estos resultados, la baja incidencia de sepsis neonatal por Estreptococo del grupo B en México fue atribuida, en ese entonces, a la baja prevalencia de colonización detectada en las mujeres mexicanas.

Después de estos estudios, hubo un silencio de casi una década sobre *Streptococo* del grupo B en México, por lo menos en lo que respecta a evaluaciones publicadas a nivel internacional. *Streptococo* del grupo B fue dejado a un lado debido, probablemente, a la baja prevalencia de colonización reportada. No fue sino hasta finales de la década de los ochenta y principios de esta década (1990), cuando se publica nueva información sobre *Streptococo* del grupo B procedente desde México. Una serie de trabajos, tres de ellos en revistas de circulación internacional, es publicada por Solórzano-Santos y colaboradores (20,21,62). Un estudio sobre colonización cervicovaginal en mujeres embarazadas (21) y dos estudios relacionados con infección neonatal (20,62). A continuación, se comentan algunos de los resultados más relevantes de estos tres estudios:

1o. Al evaluar 340 mujeres embarazadas, la prevalencia de colonización cervicovaginal fue siete veces superior (10.3%) a la reportada por Collado y colaboradores (16). Esta cifra, por otro lado, es similar a la reportada en países desarrollados (17,21,61). Aunque las diferencias en la prevalencia de la colonización materna detectada por Solórzano-Santos y col. con respecto a la reportada por Collado y col., podrían ser secundarias a diferencias en las poblaciones estudiadas y a diferencias en los métodos bacteriológicos utilizados, es probable que el 10.3 % encontrado por Solórzano-Santos sea una subestimación de la prevalencia real de colonización. Esto es debido a varios motivos: 1) sólo se tomaron muestras cervicovaginales, 2) cada paciente fue muestreada una sola vez, y 3) las muestras fueron sembradas inicialmente en medios de cultivo sólidos y no en un caldo selectivo suplementado con antibióticos (8,17,21,26).

2o. Fue detectada una participación importante de *Estreptococo* del grupo B en infecciones postparto (12% solo en lo que respecta a endometritis postcesárea) (20).

3o. La tasa de ataque neonatal encontrada, uno por cada 1500 recién nacidos vivos, fue similar a la reportada en países industrializados, ocupando *Estreptococo* del grupo B el 8o. lugar como causa de sepsis neonatal (4,5,15,17,20,22,23,25,26).

4o. La letalidad asociada a *Estreptococo* del grupo B (38.5%) fue más de seis veces superior al promedio reportado en Estados Unidos de Norteamérica (6-8,17). Cabe mencionar que la mayoría de los casos estudiados correspondieron a casos de enfermedad de inicio temprano, manifestada por neumonía y sepsis con o sin meningitis, y con abundantes factores de riesgo perinatal.

5o. La frecuencia de serotipos fue interesante (vale la pena mencionar que este fue el primer estudio sobre los serotipos de *Estreptococo* del grupo B participando en México). Los serotipos predominantes, tanto en casos de enfermedad como de colonización, fueron los tipos Ia y Ia/c. El método empleado para la serotipificación fue el procedimiento tradicional de Lancefield que utiliza extractos ácidos calientes, método utilizado en la mayoría de los reportes sobre serotipos. Otros dos hallazgos relevantes fueron, la elevada prevalencia de cepas no tipificables (18.2 %) y la baja prevalencia de cepas del serotipo III (serotipo más frecuentemente asociado a enfermedad invasiva perinatal).

Los resultados de estos estudios desechaban la hipótesis anterior que atribuía la baja incidencia de enfermedad por *Estreptococo* del grupo B en México a la baja prevalencia de colonización. Con estos resultados, la aparente baja incidencia de

enfermedad neonatal por *Estreptococo* del grupo B en México, se atribuyó a la elevada prevalencia de cepas no tipificables y a la baja prevalencia de cepas del serotipo III. Los autores concluyeron mencionando la necesidad de investigaciones adicionales sobre el papel de *Estreptococo* del grupo B como un patógeno perinatal en México (21).

Recientemente evaluamos la prevalencia de anticuerpos contra *Estreptococo* del grupo B en una muestra de 2669 sueros. Estos sueros fueron obtenidos de mujeres en edad reproductiva de 15 a 40 años de edad residentes en diferentes estados de la República Mexicana. A través de un ensayo inmunoenzimático utilizando antígeno de grupo altamente purificado obtenido de una cepa prototipo de *Estreptococo* del grupo B, una seroprevalencia global superior al 90% fue detectada, sin diferencias entre grupos de edad ni entre entidades federativas. Debido a que la mayoría de la muestra estudiada tenía anticuerpos contra el antígeno de grupo de *Estreptococo* del grupo B, es probable que la mayoría de la población mexicana esté altamente expuesta a este microorganismo. Esto, además, podría ser un factor que contribuye a la baja incidencia de enfermedad invasiva por *Estreptococo* del grupo B en México (63). Son pocas las encuestas serológicas poblacionales realizadas con el polisacárido determinante de grupo de *Estreptococo* del grupo B (64); sin embargo, se ha demostrado que los anticuerpos adquiridos transplacentariamente, dirigidos contra el polisacárido determinante de tipo, reducen el riesgo de enfermedad en el recién nacido (65-67). La evaluación de la seroprevalencia en México contra el antígeno específico de tipo, podría permitir conocer si esta elevada exposición a *Estreptococo* del grupo B tiene un papel en la baja incidencia de enfermedad por dicho microorganismo en México.

## JUSTIFICACION

Por lo descrito en antecedentes, la hipótesis que atribuía la baja incidencia de enfermedad invasiva por *Estreptococo* del grupo B en México a la baja prevalencia de colonización es poco probable. Recientemente, esta baja incidencia de enfermedad invasiva por *Estreptococo* del Grupo B en México, ha sido atribuida a la baja prevalencia de cepas del serotipo III y a la elevada prevalencia de cepas no tipificables colonizando a mujeres mexicanas. Sin embargo, varias interrogantes surgen de esta afirmación, ¿por qué esa elevada prevalencia de cepas no tipificables? y por lo tanto, ¿por qué la baja prevalencia de cepas del serotipo III?, realmente ¿tal prevalencia elevada de cepas no tipificables es la responsable de la baja incidencia de enfermedad neonatal por *Estreptococo* del grupo B en México?

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los aislamientos no tipificables\* de *Estreptococo* del grupo B:

- 1) ¿pueden ser serotipificados al utilizar métodos más suaves de extracción y concentración del antígeno específico de tipo?
- 2) ¿pueden ser serotipificados al utilizar métodos que permiten la purificación y concentración del antígeno específico de tipo?

\*utilizando antígenos preparados por el método de extracción ácida caliente de Lancefield.

## JUSTIFICACION

Por lo descrito en antecedentes, la hipótesis que atribuía la baja incidencia de enfermedad invasiva por Estreptococo del grupo B en México a la baja prevalencia de colonización es poco probable. Recientemente, esta baja incidencia de enfermedad invasiva por Estreptococo del Grupo B en México, ha sido atribuida a la baja prevalencia de cepas del serotipo III y a la elevada prevalencia de cepas no tipificables colonizando a mujeres mexicanas. Sin embargo, varias interrogantes surgen de esta afirmación, ¿por qué esa elevada prevalencia de cepas no tipificables? y por lo tanto, ¿por qué la baja prevalencia de cepas del serotipo III?, realmente ¿tal prevalencia elevada de cepas no tipificables es la responsable de la baja incidencia de enfermedad neonatal por Estreptococo del grupo B en México?

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los aislamientos no tipificables\* de Estreptococo del grupo B:

- 1) ¿pueden ser serotipificados al utilizar métodos más suaves de extracción y concentración del antígeno específico de tipo?
- 2) ¿pueden ser serotipificados al utilizar métodos que permiten la purificación y concentración del antígeno específico de tipo?

\*utilizando antígenos preparados por el método de extracción ácida caliente de Lancefield.



## OBJETIVOS

Evaluar si aislados no tipificables\* de *Streptococo* del grupo B pueden ser serotipificados:

- 1) al utilizar métodos más suaves de extracción y concentración del antígeno específico de tipo.
- 2) al utilizar métodos que permiten la purificación y concentración del antígeno específico de tipo.

## HIPOTESIS

Los aislamientos no tipificables\* de *Streptococo* del grupo B pueden ser serotipificados:

- 1) cuando se utilizan métodos más suaves de extracción y concentración del antígeno específico de tipo.
- 2) cuando se utilizan métodos que permiten la purificación y concentración del antígeno específico de tipo.

\*utilizando antígenos preparados por el método de extracción ácida caliente de Lancefield.

## OBJETIVOS

Evaluar si aislados no tipificables\* de *Streptococo* del grupo B pueden ser serotipificados:

- 1) al utilizar métodos más suaves de extracción y concentración del antígeno específico de tipo.
- 2) al utilizar métodos que permiten la purificación y concentración del antígeno específico de tipo.

## HIPOTESIS

Los aislamientos no tipificables\* de *Streptococo* del grupo B pueden ser serotipificados:

- 1) cuando se utilizan métodos más suaves de extracción y concentración del antígeno específico de tipo.
- 2) cuando se utilizan métodos que permiten la purificación y concentración del antígeno específico de tipo.

\*utilizando antígenos preparados por el método de extracción ácida caliente de Lancefield.

## MATERIAL Y METODOS

**1. Muestra. a) Aislamientos bacterianos.** Cincuenta y siete (57) aislamientos de *Streptococo* del grupo B aislados en México fueron incluidos. Cuarenta y tres (43) fueron aislados de portadores asintomáticos y 14 de pacientes con enfermedad invasiva. **b) Origen y selección de los aislamientos.** Estos aislados fueron seleccionados sistemáticamente del cepario del Instituto Nacional de Perinatología de la Secretaría de Salud y del cepario del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS. Todos los aislamientos fueron inicialmente identificados como *Streptococo* del grupo B a través de los métodos bacteriológicos convencionales (hidrólisis del hipurato de sodio, hidrólisis de bilis-esculina negativa y prueba de CAMP positiva) y aglutinación de Látex. **c) Definición de los aislamientos.** Todo aislamiento obtenido de un lactante o adulto asintomático, o de una mujer cuyo hijo permaneció asintomático durante los tres primeros meses de vida, fue considerado como aislado de un portador asintomático. Los aislamientos obtenidos de un recién nacido o lactante con sepsis, neumonía y/o meningitis, de una madre de un recién nacido con cualquiera de estas enfermedades, o de una mujer con endometritis u otra enfermedad infecciosa postparto atribuida a *Streptococo* del grupo B, fueron considerados como aislados de casos de enfermedad invasiva. **d) Cepa control.** Se utilizó como control la cepa número 110. Esta cepa del serotipo III, fue aislada de un lactante norteamericano con meningitis de inicio tardío y es alta productora de antígeno específico de tipo (45,68).

**2. Medios de crecimiento.** Todos los aislamientos fueron crecidos hasta la fase exponencial media en caldo Todd-Hewitt (Difco, Detroit, MI) y almacenados en dicho medio a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Estos cultivos fueron descongelados, rutinariamente estriados en placas de agar sangre de carnero e incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  durante la noche antes de su uso. Todos los experimentos de serotipificación y cuantificación de antígeno específico de tipo fueron realizados en un medio definido químicamente (FMC), el cual fue originalmente diseñado para el crecimiento de estreptococos orales y modificado para contener 65 mM de fosfato de sodio (68, 69).

**3. Preparación de antígenos para serotipificación.** *a) Método de extracción ácida caliente.* Todos los aislamientos fueron inicialmente serotipificados utilizando extractos antigénicos preparados de células completas por el procedimiento de extracción ácida caliente de Lancefield, como previamente ha sido descrito (27,52,58). *b) Método de extracción enzimática.* Crecimientos frescos en placas de agar sangre fueron inoculados en 10 ml y 100 ml de medio FMC y crecidos aerobícamente a  $37^{\circ}\text{C}$  en baño "María" circulante. El pH y la densidad óptica fueron monitorizados durante el crecimiento, manteniendo el pH entre 6.5 y 7.0 por titulación lenta con NaOH 2.5 N. Estos cultivos fueron crecidos hasta la fase exponencial media, aproximadamente 500 unidades de densidad óptica ajustada (DOA) (Espectrofotómetro Coleman Junior II, a 675 nm multiplicado por 1000) (43,70). Cuando los cultivos estuvieron listos fueron enfriados inmediatamente en hielo. Las células fueron removidas por centrifugación a 9000 X g por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El líquido sobrenadante fue dializado durante la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  en contra de agua destilada y desionizada (durante cuatro noches con cambio diario de agua) y posteriormente liofilizado.

Los paquetes celulares fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante la noche y, posteriormente, lavados con 5 o 50 ml de  $\text{KPO}_4$  0.03 M (pH 7.0), centrifugados y resuspendidos en 5 o 50 ml de  $\text{KPO}_4$  0.03 M. Estas suspensiones celulares lavadas fueron incubadas con 0.2 ml (suspensiones celulares obtenidas del cultivo en 10 ml) o 0.5 ml (suspensiones celulares obtenidas del cultivo en 100 ml) de una solución de 5000 U/ml de *N*-acetilmuramidasa (Mutanolisina) a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. La densidad óptica final debía ser menor de 10 (reducción en la absorbancia mayor del 95%). Estas mezclas digeridas fueron centrifugadas a  $13,000 \times g$  por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El líquido sobrenadante fue dializado durante la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  en contra de agua destilada y desionizada (durante cuatro noches con cambio diario de agua) y posteriormente liofilizado.

Los materiales liofilizados obtenidos del líquido sobrenadante y de los paquetes celulares, fueron disueltos en agua para obtener suspensiones concentradas 10X, 100X y 1000X antes de ser serotificados. En la **Figura 1** se presenta de manera resumida un diagrama de flujo con estos procedimientos.

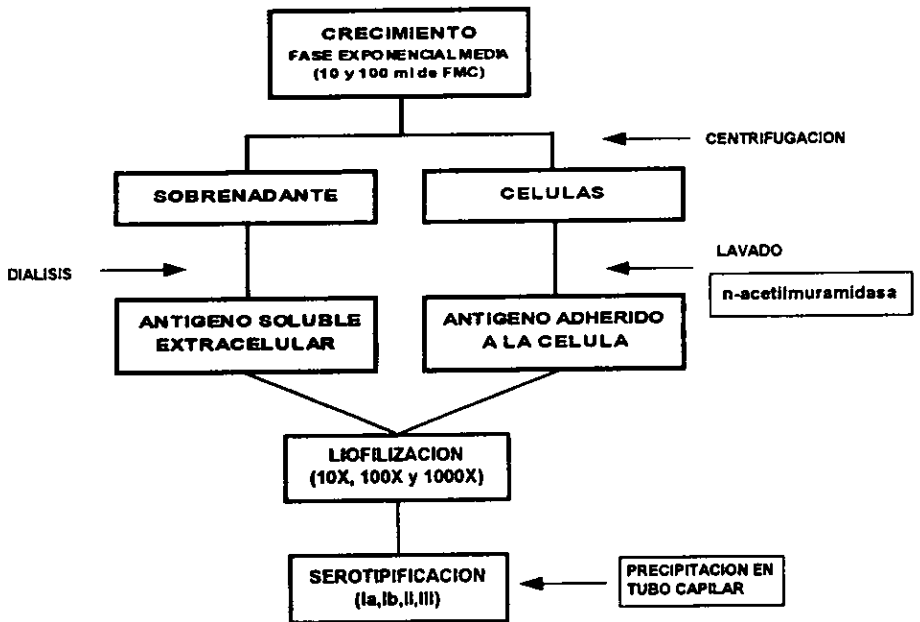


Figura 1. Diagrama resumido de la preparación de los antígenos para serotificación. Incluye el aislamiento del antígeno soluble desde el medio extracelular (líquido sobrenadante) y la extracción enzimática del antígeno adherido a la superficie de la célula (ver la descripción en el texto).

**4. Procedimiento de serotipificación.** La serotipificación de estos extractos antigénicos se llevo a cabo por el método de precipitación en tubo capilar de Lancefield, utilizando antisueros hiperinmunes preparados en conejo contra las cepas prototipo de Lancefield 090 (Ia), H36B (Ib), 18RS21 (II), y D136C (III) (27,52,58,71). La interpretación de las reacciones de precipitación obtenidas fue como previamente se ha descrito (Tabla 2) (52,53,55,58,71).

**Tabla 2.** Interpretación de la prueba de precipitación en tubo capilar.

<b>Precipitación observada con los antisueros para tipificación respectivos</b>				
<b>Ia</b>	<b>Ib</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>Serotipo</b>
+	-	-	-	<b>Ia</b>
-	+	-	-	<b>Ib</b>
+	+ <sup>a</sup>	-	-	<b>Ic</b>
-	-	+	-	<b>II</b>
-	-	-	+	<b>III</b>

<sup>a</sup> Usualmente una reacción retardada.

**5. Preparación de antígenos para la cuantificación del antígeno específico de tipo.** El contenido de ácido siálico (un componente de todos los antígenos tipo-específicos de *Streptococo* del grupo B) del líquido sobrenadante y de los paquetes celulares de dos aislados mexicanos seleccionados (14 y 49), fue medido y comparado con el mismo contenido de la cepa control 110. El aislado número 14 fue obtenido de un portador asintomático y fue no tipificable con los antígenos obtenidos por extracción ácida caliente y extracción enzimática inicialmente preparados. En cambio, el aislado número 49 fue obtenido de un caso de enfermedad invasiva y fue del serotipo III con ambos extractos antigénicos. *a) Preparación del antígeno aislado del medio sobrenadante.* El procedimiento de aislamiento del antígeno soluble extracelular del medio sobrenadante fue básicamente el mismo utilizado previamente por Doran y Mattingly (45). De manera breve, cada cepa fue crecida en 1 litro de medio FMC hasta la fase estacionaria, manteniendo el pH entre 6.5 y 7.0 por titulación lenta con NaOH 2.5 N. Después de centrifugación, el líquido sobrenadante fue dializado en contra de acetato de sodio 0.01 M (pH 6.5) a 4°C durante cuatro días con cambio diario de la solución "buffer". *b) Preparación del antígeno adherido a la célula.* El procedimiento de extracción del antígeno adherido a la superficie de la célula fue esencialmente el mismo utilizado para preparar los antígenos celulares para serotipificación (ver preparación de antígenos para serotipificación [método de extracción enzimática]). Sin embargo, cada aislado fue crecido en 1 litro de medio FMC y las células fueron incubadas con 2 ml de una solución de 5000 U/ml de mutanolisina hasta obtener una reducción en la absorbancia de 80 a 90%.



**6. Procedimiento de cuantificación del antígeno específico de tipo.** Los extractos antigénicos fueron liofilizados y redissueltos en agua hasta obtener una suspensión de 2 ml (antígeno sobrenadante), o una suspensión de 7 a 15 ml (antígeno asociado a la célula). Posteriormente, estos extractos fueron eluidos por cromatografía de intercambio iónico a través de una columna de dietilaminoetilcelulosa, utilizando un gradiente continuo de 750 ml de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  0.02 y 0.3 M. Una alícuota de las fracciones positivas para hexosas por el procedimiento "Antrona" (72,73), fue concentrada cuatro veces y ensayada para medir su contenido de ácido siálico a través del método cuantitativo del ácido tiobarbitúrico después de hidrólisis ácida caliente "leve" (74,75). Las fracciones positivas para ácido siálico fueron mezcladas, liofilizadas, redissueltas en agua destilada y desionizada y serotipificadas como fue descrito antes. En la **Figura 2** se muestran resumidos en diagrama de flujo estos procedimientos.

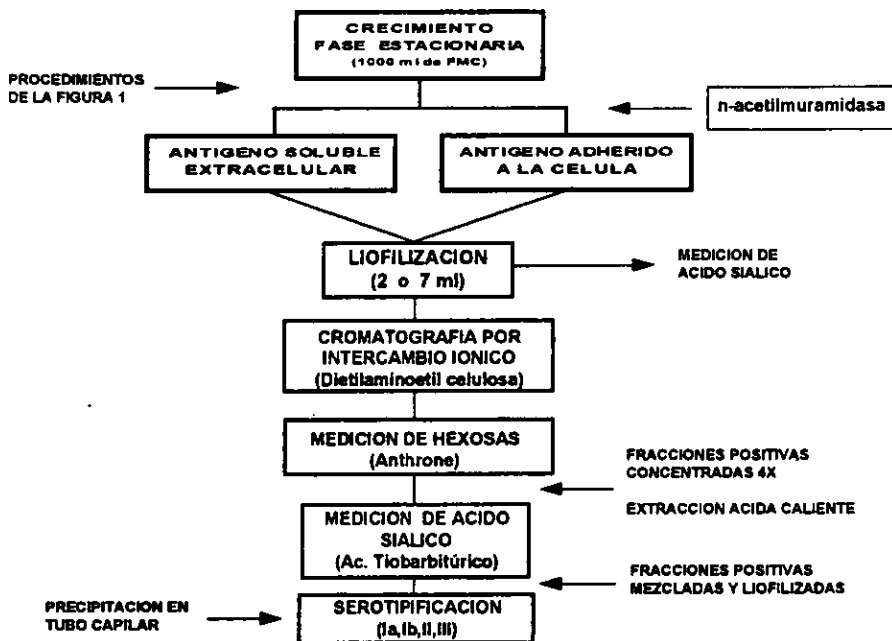


Figura 2. Diagrama resumido de los procedimientos utilizados para la purificación y cuantificación del antígeno específico de tipo. Incluye la elusión por intercambio iónico y la serotipificación de las mezclas de las fracciones correspondientes al tercer pico de ácido siálico (ver la descripción en el texto).

## 7. Calculo de la cantidad de antígeno específico de tipo.

a). La cantidad de ácido siálico (ácido *N*-acetilneuramínico) fue calculada a partir de las lecturas de densidad óptica obtenidas en el ensayo del ácido tiobarbitúrico de la siguiente manera (74,75):

$$\left[ \frac{E_3}{E_2 E_3 - E_1 E_4} (A_{549}) - \frac{E_4}{E_2 E_3 - E_1 E_4} (A_{532}) \right] \text{ dilución} = C$$

Donde E es el coeficiente de extinción como sigue:

$E_3=133$  y  $E_4=48$  son los coeficientes de extinción  $\times 10^{-3}$  de desoxirribosa a 532 y 549 nm

$E_1=DO_{532}$  y  $E_2=DO_{549}$  son los coeficientes de extinción  $\times 10^{-3}$  de ácido *N*-acetilneuramínico a 532 y 549 nm (determinados en una curva estándar para ácido *N*-acetilneuramínico en cada ensayo)

E (coeficiente de extinción) a estas absorbancias fue determinado de la siguiente manera:

$$E = \frac{\text{Absorbancia} \times 5}{\text{Volúmen de solución estándar}}$$

$A_{549}$  = Absorbancia a 549 nm

$A_{532}$  = Absorbancia a 532 nm

$$\text{dilución} = \frac{\text{ml de butanol-ácido} \times 2 \times 309}{\text{concentración de la muestra}}$$

Donde: 309 = peso molecular del ácido siálico

2 = corrección para 0.5 ml (ensayo original basado en muestras de 1 ml)

C = cantidad de ácido siálico expresada en  $\mu\text{g/ml}$

b). La cantidad de ácido siálico en  $\mu\text{g/mg}$  de peso celular seco (CDW) determinada en los ensayos del ácido tiobarbitúrico se calculó de la siguiente manera:

$$\text{ug de ácido siálico/mg de peso celular seco} = \frac{C \times \text{Volúmen de la fracción} \times 1000}{0.43 \times \text{volúmen del cultivo} \times (\text{DOA final} \times 1000)}$$

Donde,

C = cantidad de ácido siálico en  $\mu\text{g/ml}$

Volúmen de la fracción = ~ 8.5 ml para cada fracción

0.43 = peso celular seco de EGB requerido para obtener 1 DOA

1 DOA = 0.43 de peso celular seco de EGB

Volúmen del cultivo = 1000 ml para cada cepa

DOA = densidad óptica ajusta final del cultivo

## RESULTADOS

### **1. Serotipificación de antígenos preparados por extracción ácida caliente.**

Con los extractos antigénicos preparados por el método de extracción ácida caliente de Lancefield, 28 de los 57 aislados fueron clasificados como no tipificables, nueve fueron del serotipo III y los otros 20 fueron de cualquiera de los otros serotipos (**Tabla 3**). El origen clínico de los 57 aislamientos es descrito en la sección de Material y Métodos. Cuarenta y tres fueron aislados de recién nacidos, lactantes o adultos portadores asintomáticos, y 14 de recién nacidos, lactantes o mujeres gestantes con enfermedad invasiva.

### **2. Serotipificación de antígenos extraídos enzimáticamente a diferentes concentraciones.**

Al probar, por precipitación en tubo capilar, las suspensiones con diferentes concentraciones de antígenos extraídos enzimáticamente, 23 de los 28 aislados inicialmente no tipificables (empleando antígenos extraídos por calor ácido) pudieron ser serotipificados. Diez de estos aislamientos (10/23) fueron del serotipo III, la mayoría de ellos (8/10) habían sido aislados de portadores asintomáticos. Solo dos aislados de casos de enfermedad invasiva fueron inicialmente clasificados como “no tipificables” utilizando extractos ácidos calientes, ambos fueron del tipo III al ser probados con antígenos preparados por extracción enzimática. Los otros aislamientos inicialmente “no tipificables” que pudieron ser serotipificados al utilizar los extractos enzimáticos, fueron del tipo II

(cinco aislados), tipo Ia (tres aislados), tipo Ib (cuatro), y tipo Ic (uno). Todos ellos correspondieron a aislados de portadores. Cinco aislamientos no pudieron ser serotipificados con ninguna de las suspensiones antigénicas preparadas tanto por calor ácido como por extracción enzimática (Tabla 3). Los cinco fueron aislados de portadores asintomáticos. Uno de estos cinco aislamientos (aislado 14), junto con un aislado fácilmente tipificable aún con extractos ácidos (aislado 49), y la cepa control 110, fueron seleccionados para medir y comparar el contenido de ácido siálico (principal componente del polisacárido capsular) adherido a la superficie de la célula y liberado al medio extracelular (ver sección de Material y Métodos, apartado 5).

Las concentraciones de antígeno que fueron necesarias para serotipificar los 23 aislados inicialmente no tipificables, fueron variables (Tabla 4). Las suspensiones concentradas 100 veces de los antígenos extraídos enzimáticamente fue la concentración mínima requerida para serotipificar todos estos 23 aislados. Solo siete de estos aislamientos, fueron serotipificados con las suspensiones antigénicas concentradas 10 veces, las cuales también habían sido preparadas por extracción enzimática. Los 23 aislados también fueron tipificables al utilizar las suspensiones antigénicas concentradas 1000 veces, obtenidas tanto de los paquetes celulares como del medio de crecimiento.

**Tabla 3.** Serotipos de 57 aislamientos mexicanos de *Streptococo* del grupo B, determinados por la prueba de precipitación en tubo capilar, utilizando antígenos preparados por extracción ácida caliente y extracción enzimática.

Serotipo	Método de preparación del antígeno					
	Extracción ácida caliente			Extracción enzimática <sup>a</sup>		
	Aislado de portador <sup>b</sup>	Aislado invasivo <sup>b</sup>	Total	Aislado de portador <sup>b</sup>	Aislado invasivo <sup>b</sup>	Total
III	2*	7	9	10	9	19
II	2	1	3	7	1	8
Ia	3	2	5	6	2	8
Ib	4	2	6	8	2	10
Ic	6	-	6	7	-	7
NT	26	2	28	5	-	5
Total	43	14	57	43	14	57

<sup>a</sup> del antígeno adherido a la superficie de la célula obtenido de cultivos en 10 y 100 ml y concentrados 10X, 100X y 1000X.

<sup>b</sup> Origen clínico de los aislados.

\* Número de aislamientos.

NT: No tipificable.

Tabla 4. Concentraciones requeridas de antígenos, obtenidos del líquido sobrenadante y extraídos enzimáticamente<sup>a</sup> de las células, para serotipificar 23 aislados no tipificables<sup>a</sup> de *Streptococo* del grupo B.

Serotipo	Concentración de antígeno para dar una prueba de precipitinas positiva					
	10X		100X		1000X	
	Líquido sobrenadante*	Adherido a la célula*	Líquido sobrenadante*	Adherido a la célula*	Líquido sobrenadante*	Adherido a la célula*
III	1	3	4	10	10	10
II	-	1	2	5	5	5
Ia	-	2	2	3	3	3
Ib	-	1	1	4	4	4
Ic	-	-	-	1	1	1
Total	1	7	9	23	23	23

<sup>b</sup> con extractos antigénicos preparados por el procedimiento de extracción ácida caliente de Lancefield.

<sup>a</sup> con *N*-acetilmuramidasa.

\* Origen del antígeno.



Para ilustrar la variabilidad en las concentraciones de antígeno requeridas para ser serotipificados, los serotipos de ocho aislamientos inicialmente "no tipificables" son mostrados en la **Tabla 5**. El aislado número 3 fue fácilmente serotipificado con la menor concentración del antígeno aislado desde el medio sobrenadante. No obstante, la mayoría de los aislados inicialmente no tipificables, como lo fueron el 2, 8, 16, 24 y 29, requirieron suspensiones de antígeno más concentradas para ser serotipificados. Finalmente, algunos aislamientos, como el 6 y 14, no pudieron ser serotipificados con ninguna de las preparaciones antigénicas utilizadas (**Tabla 5**). Los resultados de la serotipificación de los 23 aislados inicialmente no tipificables se presentan en una tabla extra al final de la tesis (**Tabla A**).

Los extractos antigénicos obtenidos de la superficie celular del aislado número 29, precipitaron con antisuero para el tipo Ia cuando se utilizaron suspensiones concentradas 10X. Sin embargo, extractos antigénicos más concentrados de este aislado también precipitaron con antisuero para el tipo Ib. De esta manera, este aislamiento fue clasificado en el serotipo Ic (**Tabla 5**) (17,55,76,77).

Los 29 aislamientos que fueron tipificables con los antígenos extraídos por calor ácido (**Tabla 3**), también fueron fácilmente serotipificables con las suspensiones antigénicas de menor concentración, obtenidas del líquido sobrenadante y de la superficie celular. Con excepción del grupo de cepas no tipificables, hubo una concordancia perfecta en los serotipos definidos con los dos métodos utilizados para la preparación de los extractos antigénicos.

**Tabla 5. Resultados de la serotipificación de 8 aislados no tipificables<sup>a</sup> de *Streptococo* del grupo B utilizando suspensiones con diferentes concentraciones de antígenos aislados del líquido sobrenadante y extraídos enzimáticamente<sup>b</sup> de las células.**

Aislado No.	Concentración de antígeno					
	10X		100X		1000X	
	Líquido sobrenadante*	Adherido a la célula*	Líquido sobrenadante*	Adherido a la célula*	Líquido sobrenadante*	Adherido a la célula*
2	NT	Ia	NT	Ia	Ia	Ia
3	III	III	III	III	III	III
6	NT	NT	NT	NT	NT	NT
8	NT	NT	III	III	III	III
14	NT	NT	NT	NT	NT	NT
16	NT	NT	NT	Ib	Ib	Ib
24	NT	NT	NT	Ib	Ib	Ib
29	NT	Ia	NT	Ic	NT	Ic

<sup>a</sup> con extractos antigénicos preparados por el procedimiento de extracción ácida caliente de Lancefield.

<sup>b</sup> con *N*-acetilmuramidasa.

\* Origen del antígeno.

NT: No tipificable.

### 3. Cuantificación del antígeno específico de tipo soluble extracelular.

El contenido de ácido siálico en dos alícuotas del líquido sobrenadante del crecimiento en 1000 ml (liofilizado para obtener una suspensión de 2 ml) de dos aislados, fue medido antes de ser sometido a cromatografía. Una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  de las cepas 14 y 110 contenía 12.2  $\mu\text{g/ml}$  y 197.6  $\mu\text{g/ml}$  de ácido siálico respectivamente. Una alícuota de 250  $\mu\text{l}$  contenía 11.1 y 198.5  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente (**Tabla 6**).

Estas suspensiones altamente concentradas del líquido sobrenadante fueron fraccionadas por cromatografía de intercambio iónico, utilizando una columna de dietilaminoetil-celulosa y un gradiente continuo de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  0.02 M a 0.3 M (750 ml de cada uno) recientemente preparado. Las fracciones (~8.5 ml cada una) fueron entonces ensayadas para su contenido de hexosas y posteriormente para ácido siálico. El contenido de ácido siálico del líquido sobrenadante del crecimiento en 1000 ml de medio de cultivo de los aislados 14, 49, y 110 es mostrado en la **Figura 3**. Para mayor información sobre estos aislados ver el apartado 5 de la sección de Material y Métodos ("Preparación de antígenos para la cuantificación del antígeno de tipo") y la sección de Resultados apartado 2 ("Serotipificación de antígenos extraídos enzimáticamente a diferentes concentraciones"). Los dos picos de ácido siálico (antígenos de bajo y alto peso molecular) del aislado 14 fueron considerablemente bajos con relación a los de la cepa control 110. En cambio, los dos picos de ácido siálico del aislado 49 fueron superiores a los del número 14, pero ligeramente más bajos que los de la cepa 110 (**Figura 3**).

**Tabla 6.** Contenido de ácido siálico en dos alícuotas del líquido sobrenadante liofilizado<sup>a</sup> de los aislados 14 y 110 de *Streptococo* del grupo B crecidos en 1000 ml de medio FMC.

<i>Cantidad ensayada</i>	Ácido Siálico (µg/ml)	
	<i>Cepa 14</i>	<i>Cepa 110</i>
100 µl	12.2	197.6
250 µl	11.1	198.5

<sup>a</sup> hasta obtener una suspensión de 2 ml.

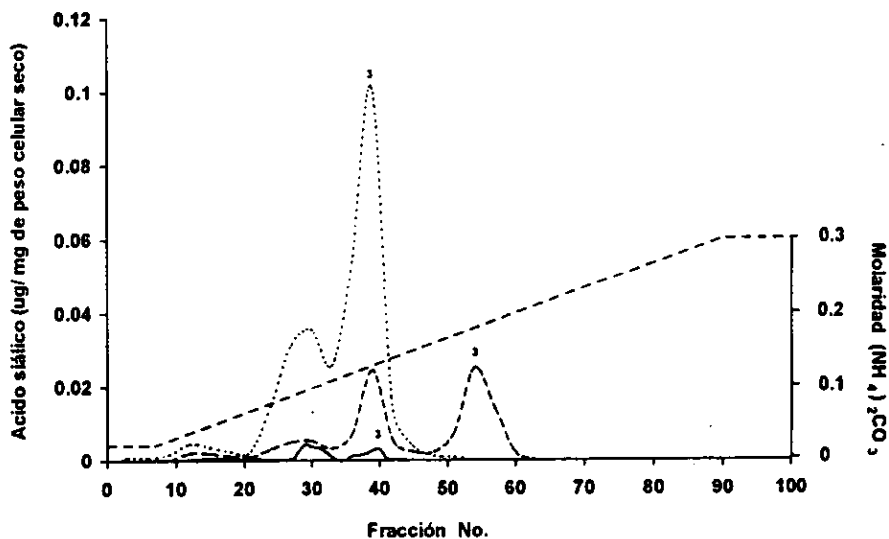


Figura 3. Contenido de ácido siálico en el líquido sobrenadante obtenido del cultivo en 1000 ml de los aislados 14 ( — ), 49 ( - - ) y 110 ( ····· ), eluido a través de una columna de dietilaminoetil-celulosa con un gradiente lineal de 750 ml de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.02 y 0.3 M. Las fracciones del tercer pico (señalado como 3) de cada aislado fueron mezcladas y serotipificadas: el aislado 14 fue del serotipo Ia, el 49 del serotipo III y el 110 del serotipo III. Solo la media del gradiente de los tres aislados es mostrado.

#### **4. Cuantificación del antígeno específico de tipo adherido a la superficie de la célula.**

La cuantificación de ácido siálico en las suspensiones obtenidas por extracción enzimática de las células de los aislados 14, 49, y 110 crecidas en 1000 ml, fue similar a la observada en los líquidos sobrenadantes respectivos (**Figura 4**). Aunque los picos de ácido siálico de los aislados 49 y 110 fueron similares, solo 7 ml de los 15 ml de la suspensión obtenida del cultivo en 1000 ml del aislado 110, fueron aplicados a la columna de cromatografía (~50% del antígeno total). En cambio, la curva de ácido siálico del aislado 49 fue obtenida con el total del antígeno obtenido del cultivo en 1000 ml. La cantidad de ácido siálico adherido a la célula del aislado 14 fue extremadamente baja al compararla con la de los aislados 49 y 110 (**Figura 4**).

#### **5. Serotipificación de las fracciones positivas a ácido siálico.**

El aislado número 14, no tipificable con los antígenos extraídos por calor ácido y los extractos enzimáticos inicialmente preparados, pudo ser serotipificado cuando las fracciones positivas para ácido siálico obtenidas por cromatografía fueron mezcladas, concentradas y probadas para su seroreactividad. Este aislado fue entonces clasificado como serotipo Ia. La mezcla de las fracciones positivas a ácido siálico de los aislados 49 y 110 también dieron reacciones de precipitación positivas (**Figuras 3 y 4**).

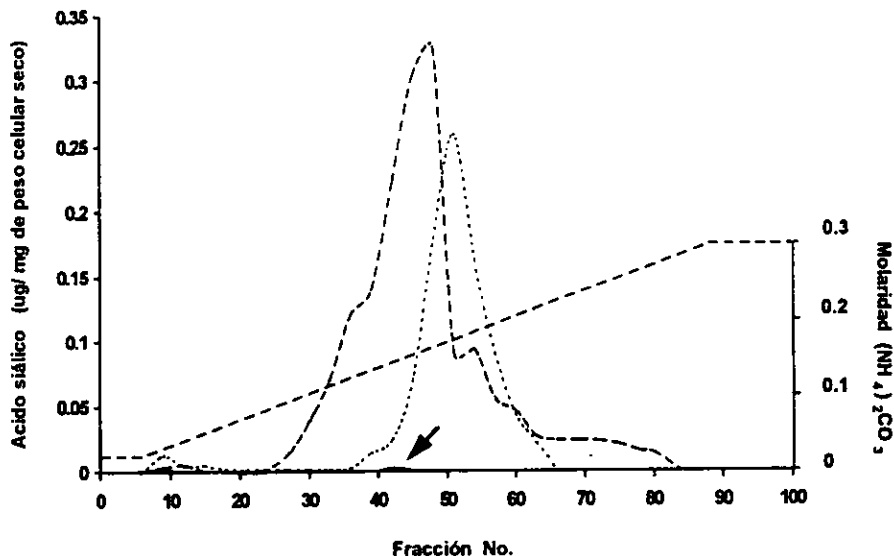


Figura 4. Contenido de ácido siálico del antígeno adherido a la superficie de la célula obtenido por extracción enzimática del cultivo en 1000 ml de los aislados 14 (—), 49 (---) y 110 (---), eluido a través de una columna de dietilaminoetil-celulosa con un gradiente lineal de 750 ml de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  0.02 y 0.3 M. El pico del aislado 14 es señalado por la flecha. Las fracciones positivas para ácido siálico de cada aislado fueron mezcladas y serotipificadas: el aislado 14 fue del serotipo Ia, el 49 fue del serotipo III y el 110 del serotipo III. Solo la media del gradiente de los tres aislados es mostrado.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## DISCUSION

Aunque la información sobre el papel de *Streptococcus agalactiae* en enfermedad perinatal en México es escasa. un estudio de mujeres mexicanas embarazadas encontró que más del 10% de ellas estaba colonizada con dicho microorganismo (21). Solórzano-Santos y colaboradores (20,62) encontraron infección neonatal por Estreptococo del grupo B en 1/1500 recién nacidos vivos con una elevada letalidad, varias veces más alta que el promedio reportado en los Estados Unidos de Norteamérica (6,8,17). Además, un estudio reciente de alcance nacional en México, en el que se encontró una elevada seroprevalencia para Estreptococo del grupo B (superior al 90%), sugiere que la población mexicana está altamente expuesta a este microorganismo desde edades tempranas (63). En contraste con Estados Unidos de Norteamérica y otros países desarrollados en donde el tipo III es el serotipo prevalente, en México los serotipos Ia y Ia/c han sido los más frecuentemente identificados. Otra característica notable en México es el alto porcentaje de aislados no tipificables y la baja frecuencia de aislados del serotipo III (20,21). Vale la pena mencionar que, como en otros países, estos resultados de serotipificación fueron obtenidos con antígenos preparados por el método de extracción ácida caliente de Lancefield. Debido a esto, la baja incidencia de enfermedad invasiva por Estreptococo del grupo B en México, se atribuyó a la elevada prevalencia de aislados no tipificables y a la baja prevalencia del serotipo III (20,21). Varias interrogantes surgieron de estos resultados, ¿a qué se debía esa elevada prevalencia de aislados no tipificables? ¿por qué tal baja prevalencia de aislados del tipo III? ¿esta baja prevalencia del serotipo III era la responsable de la baja



incidencia de enfermedad neonatal por *Streptococo* del grupo B en México? En el presente estudio se evaluó una muestra de cepas de *Streptococo* del grupo B aisladas en México, algunas de las cuales fueron no tipificables con antígenos preparados por el procedimiento de extracción ácida caliente de Lancefield. La mayoría de estos aislados "no tipificables" pudieron ser serotipificados con el empleo de un método de extracción enzimática no ácida y suspensiones concentradas de antígeno. Un buen número de dichos aislados (10/28) fue reclasificado en el serotipo III. Además, se demostró que la síntesis de ácido siálico de uno de los aislamientos no tipificables, tanto con extractos ácidos calientes como con extractos enzimáticos, fue significativamente menor a la de aislados "facilmente" tipificables. Dicho aislamiento "no tipificable" pudo ser serotipificado mediante el empleo de una preparación antigénica altamente purificada, a pesar del hecho de ser "muy" pobre productor de antígeno específico de tipo.

Varios factores de virulencia han sido identificados en *Streptococo* del grupo B (17,27,28,68,78-80). Sin embargo, el principal determinante de la virulencia de este microorganismo es el polisacárido capsular. Este polisacárido es también el blanco de anticuerpos protectores y el antígeno empleado para clasificar en serotipos a *Streptococcus agalactiae* (antígeno específico de tipo) (17,28). Está adherido covalentemente al peptidoglicano de la pared celular (31,39,40), y es un polímero compuesto de unidades repetidas de glucosa, galactosa, *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico), las cuales están arregladas de manera diferente para cada serotipo (41,42). El 25% de este polisacárido capsular, o antígeno específico de tipo, es el azúcar ácido "ácido siálico", el cual es el principal inmunodeterminante y el principal determinante del

papel en la virulencia de este polisacárido (31,32,35,39,43,44). Las cadenas laterales de este antígeno que terminan en ácido siálico hacen a *Streptococo* del grupo B un pobre activador de la vía alterna del complemento y, por lo tanto, resistente a la fagocitosis en ausencia de anticuerpos específicos (17,37,38).

Con el empleo de antígenos extraídos por calor ácido, cuatro serotipos fueron inicialmente reconocidos, Ia, Ib, II y III (17,18,28,52,53). Posteriormente, las cepas que contienen el antígeno carbohidrato Ia y el antígeno proteico Ibc (actualmente conocido como Ic) fueron designadas como serotipo Ic (17,54,55). Más recientemente, los serotipo IV, V y VI fueron reconocidos y caracterizados (17,28). De los cinco serotipos de *Streptococo* del grupo B asociados a enfermedad invasiva neonatal (Ia, Ib, Ic, II y III), el tipo III es el más frecuentemente aislado (17,28,58). Dicho serotipo es reconocido como el responsable de la mayoría de los casos de enfermedad neonatal (5,34,47). En cambio, cepas de *Streptococo* del grupo B que no pueden ser clasificadas serológicamente (“no tipificables”) son responsables de menos del 1% de los casos de enfermedad (17,58,59).

Se han utilizado varios métodos para extraer antígenos de la superficie celular con la finalidad de agrupar y clasificar en serotipos los aislados de *Streptococo* del grupo B. Estos incluyen el método de extracción ácida caliente de Lancefield (46), el procedimiento de extracción con ácido tricloroacético frío (47), los métodos con formamida caliente, por autoclave, con solución salina (27,49), el procedimiento “buffer” neutral (34,48), y métodos de extracción que utilizan enzimas (50). El método de extracción ácida caliente (“hot-HCl extraction”) de células completas es el método estándar para aislar antígenos estreptocócicos

(17,27,28). Sin embargo, se ha demostrado que este y otros métodos resultan en antígenos parcialmente degradados y en mezclas complejas de antígenos que incluyen antígeno de grupo, antígeno de tipo y otros antígenos que podrían causar reactividad cruzada (17,39,45,48). En cambio, procedimientos de extracción más "leves", como los que emplean ácido tricloroacético frío (47), solución amortiguadora ("buffer") de ácido etilendiaminotetraacético (34) o algunas enzimas (27,50), resultan en polisacáridos de mayor peso molecular, los cuales retienen sus componentes acidolábiles, como lo es el ácido siálico (27,48,51).

Existen diferentes métodos para la extracción enzimática de antígenos estreptocócicos. Entre éstos tenemos los que utilizan pronasa B, lisozima y *N*-acetilmuramidasa (mutanolisina) (27,50). En el presente estudio se utilizó *N*-acetilmuramidasa para extraer, de células completas, el antígeno específico de tipo, con el fin de probar la reactividad serológica de aislados "no tipificables" con antígenos preparados por extracción ácida caliente. La extracción enzimática con mutanolisina ha resultado en la liberación del 95% del antígeno específico de tipo adherido a la pared. De esta manera, la cantidad recuperada de antígeno específico de tipo de alto peso molecular es 20 veces mayor que la obtenida con el procedimiento "buffer neutral" u otros métodos (39).

Doran y Mattingly (39) encontraron que más del 85% del total del antígeno específico de tipo sintetizado por un aislado del tipo III, permanece covalentemente adherido a la superficie de la célula, mientras que ~10% es liberado al medio extracelular como antígeno soluble. Por otro lado, varios estudios han demostrado que el antígeno de grupo y el antígeno de tipo pueden ser fácilmente aislados y purificados desde el medio de crecimiento. Utilizando un

medio químicamente definido, Doran y colaboradores (45) por un lado, y Carey y colaboradores (51) por otro, purificaron por cromatografía grandes cantidades de antígeno de grupo B y antígeno de tipo III del líquido sobrenadante. Además, Doran y colaboradores (45) encontraron que dos especies moleculares de antígeno de tipo III (las dos conteniendo ácido siálico) pueden ser recuperadas del líquido sobrenadante. Una corresponde a un antígeno de alto peso molecular (HMW) asociado a la virulencia y responsable de la seroreactividad de tipo, la otra es una forma más pequeña del antígeno (antígeno de bajo peso molecular [LMW]). De esta manera, el aislamiento de antígenos polisacáridos solubles del medio de cultivo libre de células, resulta en alta producción de antígeno específico de tipo de alto peso molecular no degradado.

Para la serotipificación, en el presente proyecto, se utilizaron preparaciones de antígeno extraído de células estreptocócicas completas por un procedimiento enzimático, y preparaciones de antígeno soluble aislado del medio de cultivo sobrenadante. Este abordaje dio lugar a una mayor producción de antígeno de tipo no degradado, lo cual permitió serotipificar la mayoría de los aislados que fueron "no tipificables" por el método estándar (43,45,51). Además, la elusión de algunos extractos antigénicos por cromatografía de intercambio iónico, permitió la obtención de antígeno específico de tipo altamente purificado. Esto a su vez, permitió serotipificar a un aislado seleccionado "muy" pobre productor de dicho antígeno (aislado 14).

Con los antígenos preparados por extracción enzimática o por aislamiento del medio sobrenadante, 23 de los 28 aislados inicialmente "no tipificables" con extractos ácidos calientes fueron serotipificados. Algunos de estos aislamientos

fueron serotipificados con suspensiones antigénicas de baja concentración. Sin embargo, la mayoría de dichos aislamientos requirieron suspensiones de antígeno más concentradas para ser serotipificados. No obstante, otros aislados (5/28) no pudieron ser serotipificados aún con los extractos más concentrados. Estos resultados demuestran variabilidad en la capacidad de síntesis de antígeno específico de tipo, tanto adherido a la célula como liberado al medio extracelular (37-39,43,44). Además, el hecho de que la mayoría de los aislados inicialmente "no tipificables" requirieron de suspensiones antigénicas altamente concentradas para ser serotipificados, sugiere que son pobres productores de antígeno de tipo. Este hallazgo, a la luz del papel en la virulencia del antígeno "tipo-específico" (31-38,43) podría explicar, por lo menos en parte, porque la mayoría de dichos aislamientos fue obtenido de portadores asintomáticos. Así, de los diez aislamientos "no tipificables" que fueron reclasificados en el serotipo III, ocho fueron aislados de portadores asintomáticos. En cambio, solo dos de los 14 aislados de casos de enfermedad invasiva fueron inicialmente "no tipificables", reclasificándose posteriormente en el serotipo III (Tabla 3). Además, la mayoría de los aislados de enfermedad invasiva (12/14) fueron fácilmente serotipificados con cualquiera de los extractos utilizados. Finalmente, se demostró la pobre capacidad de síntesis de antígeno de tipo de un aislado de portador no tipificable (aislado 14), y la elevada producción de dicho antígeno por un aislado de enfermedad invasiva del serotipo III "fácilmente" tipificable (aislado 49).

En general, los aislados inicialmente "no tipificables" que pudieron ser tipificados, fueron más fácilmente serotipificados con los extractos enzimáticos obtenidos de células completas (antígeno adherido a la célula) que con las preparaciones de antígeno aislado del medio sobrenadante (antígeno soluble extracelular) (Tabla 4). Esta diferencia puede ser explicada por las diferencias

conocidas en las cantidades de antígeno específico de tipo, adherido a la superficie de la célula (~85%) y liberado al medio extracelular (~10%), sintetizadas por *Streptococo* del grupo B (39,51). Estos resultados sugieren que los extractos enzimáticos obtenidos de células completas, proporcionan una mejor suspensión antigénica con propósitos de serotipificación que los preparados obtenidos del líquido sobrenadante y los extractos celulares obtenidos por calor ácido. Además, indican que el método utilizado para la extracción del antígeno de tipo puede influir "marcadamente" la interpretación de los datos epidemiológicos sobre los serotipos de *Streptococo* del grupo B.

Los aislados tipificables con extractos obtenidos por calor ácido fueron también fácilmente serotipificados con los extractos enzimáticos de menor concentración. Estos aislados deben ser altamente productores de antígeno específico de tipo, como lo fue el aislado 49 en los ensayos de cromatografía. Con excepción de los aislados inicialmente no tipificables, hubo una concordancia perfecta en los serotipos determinados con los antígenos preparados con los dos métodos de extracción utilizados. Aunque seroreactividad cruzada era posible, sobre todo con los antígenos preparados por calor ácido (17,39,45,48), la probabilidad de obtener resultados divergentes con los dos métodos de extracción probados (ácida caliente y enzimática) era baja. La principal diferencia entre estas preparaciones consistía en la concentración de antígeno específico de tipo no degradado en cada suspensión.

Los extractos antigénicos del aislado número 29 precipitaron con antisuero para el tipo Ia cuando se probaron suspensiones de baja concentración (antígeno adherido a la célula concentrado 10X). Sin embargo, las suspensiones antigénicas

más concentradas de dicho aislado (antígeno adherido a la célula concentrado 100X y 1000X) también precipitaron con antisuero para el tipo Ib. De esta manera, dicho aislado fue clasificado como serotipo Ic. Todo aislamiento cuyas preparaciones antigénicas precipitaron con antisuero para el tipo Ia y Ib fue considerado del serotipo Ic (17,55,76,77). El antígeno específico de tipo Ib usualmente da seroreactividad más retardada que otros antígenos de tipo (55,76). Un cultivo mixto tipo Ia y tipo Ib fue descartado, ya que el antígeno fue extraído varias veces desde cultivos puros y colonias únicas en placas de agar sangre. Además, debido a que el antisuero para el tipo Ib fue adsorbido con células del tipo Ia, y el antisuero para el tipo Ia fue adsorbido con células del tipo Ib, una reacción cruzada es improbable, aunque no puede ser totalmente descartada. La reactividad cruzada ocurre cuando anticuerpos contra el polisacárido menor Iabc y aislados que poseen este antígeno (algunos del tipo Ia y Ib) son probados. Esta reactividad cruzada también ocurre cuando anticuerpos para la proteína c (antígeno Ic) y aislados del tipo Ib y Ia compartiendo este determinante antigénico son probados (17,77).

Aunque el aislado número 14, inicialmente "no tipificable", fue "muy" pobre productor de antígeno específico de tipo, como se demostró por cromatografía, pudo ser finalmente serotipificado. Esto fue posible, por lo menos en parte, por la naturaleza altamente purificada del extracto antigénico utilizado, desprovisto de otros antígenos como el antígeno de grupo, el antígeno de tipo de bajo peso molecular y, posiblemente, de otros antígenos de seroreactividad cruzada no definidos (17,39,45,48).

Con respecto a los cuatro aislados que finalmente quedaron como "no tipificables", algunos podrían ser subsecuentemente no tipificables, aún con el método de purificación por cromatografía utilizado, y corresponder al bajo porcentaje de aislamientos no tipificables reportado en Estados Unidos de Norteamérica y otros países desarrollados (17,58,59). Es posible, también, que algunos de estos aislamientos pudieran ser serotipificados si se utilizan extractos antigénicos altamente purificados preparados con cantidades más grandes de medio de cultivo, como ocurrió con el aislado número 14. Finalmente, algunos de estos aislamientos podrían ser de alguno de los serotipos más recientemente descritos (serotipos IV, V y VI). Sin embargo, estos serotipos son aún raros en países desarrollados, y se han asociado más a enfermedad en el adulto con algunos factores predisponentes (17,28,56).

En resumen, este estudio demuestra que la mayoría de los aislados de *Estreptococo* del grupo B probados y clasificados como "no tipificables" con el método de extracción ácida caliente de Lancefield, pueden ser serotipificados cuando se utilizan métodos que permiten obtener mayores cantidades de antígeno específico de tipo intacto. Los resultados sugieren que la elevada prevalencia de aislamientos no tipificables de *Estreptococo* del grupo B previamente reportada en México, se debe a que un elevado porcentaje de dichos aislamientos son pobres productores de antígeno específico de tipo y, por lo tanto, no pueden ser serotipificados por los métodos estándar. Esto indica que el procedimiento empleado para extraer el antígeno de tipo puede influir en la interpretación de los datos epidemiológicos sobre *Estreptococo* del grupo B, ya que los aislamientos "no tipificables" pueden producir antígeno de tipo, aunque a niveles no detectables por los métodos clásicos. Así, la purificación y concentración de los



antígenos de aislamientos “no tipificables” pueden ser necesarias antes que una conclusión definitiva sobre la distribución de serotipos pueda ser establecida. Se propone el modelo de serotipificación con extractos enzimáticos altamente concentrados obtenidos de células completas, para serotipificar los aislamientos que son “no tipificables” por el método estándar de Lancefield. De esta manera, los resultados obtenidos hacen poco probable la hipótesis que atribuía la baja incidencia de enfermedad invasiva por *Streptococo* del grupo B en México, a la baja prevalencia de aislados del serotipo III y a la elevada prevalencia de aislamientos no tipificables. No obstante, ¿a qué se debe la baja incidencia de enfermedad invasiva por *Streptococo* del grupo B en México? Es probable un subregistro de la infección por este microorganismo en México, ya que la mayoría de hospitales no cuenta con la tecnología apropiada para aislar e identificar *Streptococo* del grupo B, y a que recién nacidos y lactantes frecuentemente reciben tratamiento antibiótico antes de la toma de las muestras apropiadas para cultivo. Sin embargo, la infección por *Streptococo* del grupo B es encontrada en México cuando se le busca (16,20,21,62). Por otro lado, los aislados mexicanos de *Streptococo* del grupo B “no tipificables” por los métodos estándar parecen ser de baja virulencia, al menos en lo que respecta a la síntesis de polisacárido capsular, ¿por qué son pobres productores de dicho antígeno? Algunos estudios sobre virulencia en aislados mexicanos de *Streptococo* del grupo B son llevados a cabo actualmente por el alumno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Freedman RM, Ingram DL, Gross I, Ehrenkranz RA, Warshaw JB, Baltimore RS. A half century of neonatal sepsis at Yale. *Am J Dis Child* 1981;135:140-144.
2. Gladstone IM, Ehrenkranz RA, Edberg SC, Baltimore RS. A ten-year review of neonatal sepsis and comparison with the previous fifty-year experience. *Pediatr Infect Dis J* 1990;9:819-825.
3. Klein JO, Marcy SM. Bacterial sepsis and meningitis. En: Remington JS, Klein JO, ed. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 4a ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995:980-1054.
4. Baker CJ. Summary of the workshop on perinatal infections due to Group B *Streptococcus*. *J Infect Dis* 1977;136:137-151.
5. Franciosi RA, Knostamn JD, Zimmerman RA. Group B streptococcal neonatal and infant infections. *J Pediatr* 1973;82:707-718.
6. Walsh JA, Hutchins S. Group B streptococcal disease: its importance in the developing world and prospect for prevention with vaccines. *Pediatr infect Dis J* 1989;8:271-277.
7. Schuchat A, Wenger JD. Epidemiology of group B streptococcal disease. Risk factors, prevention strategy, and vaccine development. *Epidemiol Rev* 1994;16:374-402.
8. Schuchat A, Whitney C, Zangwill K. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. *MMWR* 1996;45:1-24.
9. Kretschmer RR. Group B streptococcal infections. En: Reeves DS, Geddes AM, ed. *Recent advances in infection*. New York: Churchill Livingstone, 1982:127-139.
10. Fry RM. Fatal infections by haemolytic streptococcus group B. *Lancet* 1938;1:199-201.

11. Hood M, Janney A, Dameron G. Beta-hemolytic *Streptococcus* group B associated with problems of perinatal period. *Am J Obstet Gynecol* 1961;82:809-818.
12. Eickhoff TC, Klein JO, Daly AL, Ingall D, Finland M. Neonatal sepsis and other infections due to group B beta-hemolytic streptococci. *N Engl J Med* 1964;271:1221-1228.
13. Brown JH. Cultural differentiation of beta-hemolytic streptococci of human and bovine sources. *J Exp Med* 1920;31:35-45.
14. Stableforth AW. Incidence of various serological types of *Streptococcus agalactiae* in herds of cows in Great Britain. *J Pathol Bacteriol* 1938;46:21-29.
15. Anthony BF, Okada DM. The emergence of group B streptococci in infections of the newborn infant. *Ann Rev Med* 1977; 28:355-369.
16. Collado ML, Kretschmer RR, Becker I, Guzman A, Gallardo L, Lepe CM. Colonization of Mexican pregnant women with group B *Streptococcus*. *J Infect Dis* 1981;143:134.
17. Baker CJ, Edwards MS. Group B streptococcal infections. En: Remington JS, Klein JO, ed. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 4a. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995:980-1054.
18. Anthony BF. Group B streptococcal infections. En: Feigin RD, Cherry JD, ed. *Textbook of pediatric infectious diseases*. 3a. ed. Philadelphia: W.B. Saunder, 1992:1305-1316.
19. Trujillo H. Group B streptococcal colonization in Medellín, Colombia. *Pediatr Infect Dis J* 1990;9:224-225.
20. Solórzano-Santos F, Díaz-Ramos RD, Arredondo-García JL. Diseases caused by group B *Streptococcus* in Mexico. *Pediatr Infect Dis J* 1990;9:66.
21. Solorzano-Santos F, Echaniz-Aviles G, Conde-Glez CJ, Calderon-Jaimes E, Arredondo-Garcia JL, Beltran-Zuniga M. Cervicovaginal infection with group B streptococci among pregnant Mexican women. *J Infect Dis* 1989;159:1003-1004.

22. Baker CJ, Barrett FF. Transmission of group B streptococci among parturient women and their neonates. *J Pediatr* 1973;83:919-925.
23. Dillon HC, Khare S, Gray BM. Group B streptococcal carriage and disease: a 6-year prospective study. *J Pediatr* 1987;110:31-36.
24. Ferrieri P, Clearly PP, Seeds AE. Epidemiology of group B streptococcal carriage in pregnant women and newborn infants. *J Med Microbiol* 1976;10:103-114.
25. Pass MA, Gray BM, Khare S, Dillon HC. Prospective studies of group B streptococcal infections in infants. *J Pediatr* 1979;95:437-443.
26. Zangwill KM, Schuchat A, Wenger JD. Group B streptococcal disease in the United States, 1990: Report from a multistate active surveillance system. *MMWR* 1992;41:25-32.
27. Facklam RR, Washington II JA. *Streptococcus* and related catalase-negative Gram-positive cocci. En: Balows A, Hausler WJ Jr., Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, ed. *Manual of clinical microbiology*. 5a. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991:238-257.
28. Edwards MS, Baker CJ. *Streptococcus agalatae* (Group B *Streptococcus*). En: Mandell GL, Douglas RG, Bennet JE, ed. *Principles and practice of infectious diseases*. 4a. ed. New York: Churchill Livingstone, 1995:1835-1845.
29. Mason EO, Wrong P, Barret FF. Evaluation of four methods for detection of group B streptococcal colonization. *J Clin Microbiol* 1976;4:429-431.
30. Fenton LJ, Harper MH. Evaluation of colistin and nalidixic acid in Todd-Hewitt broth for selective isolation of group B streptococci. *J Clin Microbiol* 1979;9:167-169.
31. Yeung MK, Mattingly SJ. Biosynthetic capacity for type-specific antigen synthesis determines the virulence of serotype III strains of group B streptococci. *Infect Immun* 1984;44:217-221.

32. Yeung MK, Mattingly SJ. Isolation and characterization of type III group B streptococcal mutants defective in biosynthesis of the type-specific antigen. *Infect Immun* 1983;42:141-151.
33. Rubens CE, Wessels MR, Heggen LM, Kasper DL. Transposon mutagenesis of type III group B *Streptococcus*: correlation of capsule expression with virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:7208-7212.
34. Baker CJ, Kasper DL, Davis CE. Immunochemical characterization of the "native" type III polysaccharide of group B *Streptococcus*. *J Exp Med* 1976;143:258-270.
35. Shigeoka AO, Rote NS, Santos JI, Hill HR. Assessment of the virulence factors of group B streptococci: correlation with sialic acid content. *J Infect Dis* 1983;147:857-863.
36. Wessels MR, Rubens CE, Benedí VJ, Kasper DL. Definition of a bacterial virulence factor: sialylation of the group B streptococcal capsule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8983-8987.
37. Edwards MS, Kasper DL, Jennings HJ, Baker CJ, Nicholson WA. Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III group B streptococci. *J Immunol* 1982;128:1278-1283.
38. Edwards MS, Nicholson WA, Baker CJ, Kasper DL. The role of specific antibody in alternative complement pathway-mediated opsonophagocytosis of type III group B *Streptococcus*. *J Exp Med* 1980;151:1275-1287.
39. Doran TI, Mattingly SJ. Association of type- and group-specific antigens with the cell-wall of serotype III group B *Streptococcus*. *Infect Immun* 1982;36:1115-1122.
40. DeCueninck BJ, Shockman GD, Swenson RM. Group B, type III streptococcal cell wall: composition and structural aspects revealed through endo-*N*-acetylmuramidase-catalyzed hydrolysis. *Infect Immun* 1982;35:572-582.
41. Jennings HJ, Katzenellenbogen E, Lugowsky C, Kasper DL. Structure of the native polysaccharide antigens of type Ia and type Ib group B *Streptococcus*. *Biochemistry* 1983;22:1258-1263.

42. Wessels MR, Pozsgay V, Kasper DL, Jennings HJ. Structure and immunochemistry of an oligosaccharide repeating unit of the capsular polysaccharide of type III group B *Streptococcus*. A revised structure for the type III group B streptococcal polysaccharide antigen. *J Biol Chem* 1987;262:8262-8267.
43. Doran TI, Straus DC, Mattingly SJ. Factors influencing release of type III antigens by group B streptococci. *Infect Immun* 1981;31:615-623.
44. Paoletti LC, Ross RA, Johnson K. Cell growth rate regulates expression of group B *Streptococcus* type III capsular polysaccharide. *Infect Immun* 1996;64:1220-1226.
45. Doran TI, Straus DC, Mattingly SJ. Extracellular antigens of serotype III group B streptococci. *Infect Immun* 1980;30:890-893.
46. Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med* 1933;57:571-595.
47. Lancefield RC, Freimer EH. Type-specific polysaccharide antigens of group B streptococci. *J Hyg* 1966;64:191-203.
48. Kane JA, Karakawa WW. Multiple polysaccharide antigens of group B *Streptococcus* type Ia: emphasis on a sialic acid type-specific polysaccharide. *J Immunol* 1977;118:2155-2160.
49. Wilkinson HW. Immunochemistry of purified polysaccharide type antigens of group B streptococcal types Ia, Ib, and Ic. *Infect Immun* 1975;11:845-852.
50. Tai JY, Gotschlich EC, Lancefield RC. Isolation of type-specific polysaccharide antigen from group B type Ib streptococci. *J Exp Med* 1979;149:58-66.
51. Carey RB, Eisenstein TK, Shockman GD, Greber TF, Swenson RM. Soluble group- and type-specific antigens from type III group B *Streptococcus*. *Infect Immun* 1980;28:195-203.

52. Lancefield RC. A serological differentiation of specific types of bovine hemolytic streptococci (group B). *J Exp Med* 1934;59:441-458.
53. Lancefield RC. Two serological types of group B hemolytic streptococci with related, but not identical, type-specific substances. *J Exp Med* 1938;67:25-40.
54. Jelinková J, Motlová J. The nomenclature of GBS. *Antibiot Chemother* 1985;35:49-52.
55. Wilkinson HW, Eagon RG. Type-specific antigens of group B type Ic streptococci. *Infect Immun* 1971;4:596-604.
56. Blumberg HM, Stephens DS, Modansky M, y col. Invasive group B streptococcal disease: the emergence of serotype V. *J Infect Dis* 1996;173:365-373.
57. Henrichsen J. Nomenclature of GBS antigens. *Antibiot Chemother* 1985;35:303-304.
58. Wilkinson HW, Facklam RR, Worthman EC. Distribution by serological type of group B streptococci isolated from a variety of clinical material over a five-year period (with special reference to neonatal sepsis and meningitis). *Infect Immun* 1973;8:228-235.
59. Wilkinson HW. Analysis of group B streptococcal types associated with disease in human infants and adults. *J Clin Microbiol* 1978;7:176-179.
60. Baker CJ, Barrett FF. Group B streptococcal infection in infants: the importance of the various serotypes. *JAMA* 1974;230:1158-1160.
61. Anthony BF, Okada DM, Hobel CJ. Epidemiology of group B Streptococcus: longitudinal observations during pregnancy. *J Infect Dis* 1978;137:524-530.
62. Solórzano-Santos F, Arredondo-García JL, Ortiz-Ibarra F, Díaz-Ramos RD, Cázares-Ortiz M, Echaniz-Avilés G. *Streptococcus* del grupo B en la etiología de la infección neonatal. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1990;47:146-152.

63. Caltenco SR. Seroprevalencia de anticuerpos contra *Streptococcus agalactiae* en mujeres mexicanas de 15 a 40 años. Tesis, Universidad Nacional Autonoma de México, México, 1996.
64. Anthony BF, Concepcion NF, Concepcion KF. Human antibody to the group-specific polysaccharide of group B *Streptococcus*. J Infect Dis 1985;151:221-226.
65. Baker CJ, Kasper DL. Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. N Engl J Med 1976;294:753-756.
66. Baker CJ, Edwards MS, Kasper DL. Role of antibody to native type III polysaccharide of group B *Streptococcus* in infant infection. Pediatrics 1981;68:544-549.
67. Baker CJ, Rench MA, Kasper DL. Response to type III polysaccharide in women whose infants have had invasive group B streptococcal infection. N Engl J Med 1990;322:1857-1860.
68. Milligan TW, Doran TI, Straus DC, Mattingly SJ. Growth and amino acid requirements of various strains of group B Streptococci. J Clin Microbiol 1978;7:28-33.
69. Terleckyj B, Willet NP, Shockman GD. Growth of several cariogenic strains of oral streptococci in a chemically defined medium. Infect Immun 1975;11:649-655.
70. Toennies G, Gallant DL. The relationship between photometric turbidity and bacterial concentration. Growth 1949;13:7-20.
71. Swift HF, Wilson AT, Lancefield RC. Typing group A hemolytic streptococci by M precipitin reactions in capillary pipettes. J Exp Med 1943;78:127-133.
72. Morris DL. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. Science 1948;107:254-255.
73. Loewus FA. Improvement in anthrone method for determination of carbohydrates. Anal Chem 1952;24:219.



74. Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J Biol Chem* 1959;234:1971-1975.
75. Aminoff D. Methods for the quantitative estimation of *N*-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem J* 1961;81:384-392.
76. Wilkinson HW, Moody MD. Serological relationship of type I antigens of group B streptococci. *J Bacteriol* 1969;97:629-634.
77. Lancefield RC, McCarty M, Everly WN. Multiple mouse-protective antibodies directed against group B streptococci. *J Exp Med* 1975;142:165-179.
78. Straus DC, Mattingly SJ, Milligan TW, Doran TI, Nealon TJ. Protease production by clinical isolates of type III group B streptococci. *J Clin Microbiol* 1980;12:421-425.
79. Bohnsack JF, Zhou X, Gustin JN, Rubens CE, Parker CJ, Hill HR. Bacterial evasion of the antibody response: human IgG antibodies neutralize soluble but not bacteria-associated group B streptococcal C5a-ase. *J Infect Dis* 1992;165:315-321.
80. Takahashi S, Nagano Y, Nagano N, Hayashi O, Taguchi F, Okuwaki Y. Role of C5a-ase in group B streptococcal resistance to opsonophagocytic killing. *Infect Immun* 1995;63:4764-4769.

**Tabla A.** Resultados de la serotipificación de 23 aislados no tipificables<sup>a</sup> de *Streptococo* del grupo B utilizando suspensiones con diferentes concentraciones de antígenos aislados del líquido sobrenadante y extraídos enzimáticamente<sup>b</sup> de las células.

Aislado No.	Concentración de antígeno					
	10X		100X		1000X	
	Líquido sobrenadante*	Adherido a la célula*	Líquido sobrenadante*	Adherido a la célula*	Líquido sobrenadante*	Adherido a la célula*
2	NT	Ia	NT	Ia	Ia	Ia
3	III	III	III	III	III	III
6	NT	NT	NT	NT	NT	NT
8	NT	NT	III	III	III	III
14	NT	NT	NT	NT	NT	NT
16	NT	NT	NT	Ib	Ib	Ib
24	NT	NT	NT	Ib	Ib	Ib
29	NT	Ia	NT	Ic	NT	Ic
1	NT	NT	NT	Ib	Ib	Ib
4	NT	NT	NT	II	II	II
5	NT	NT	NT	NT	NT	NT
7	NT	NT	NT	NT	NT	NT
15	NT	III	NT	III	III	III
17	NT	NT	NT	Ia	Ia	Ia
18	NT	II	NT	II	II	II
19	NT	III	NT	III	III	III
20	NT	NT	II	II	II	II
21	NT	NT	NT	III	III	III
22	NT	NT	NT	NT	NT	NT
23	NT	NT	NT	II	II	II
25	NT	NT	NT	III	III	III
26	NT	NT	NT	III	III	III

Continúa...

27	NT	NT	NT	II	II	II
28	NT	Ib	NT	Ib	Ib	Ib
30	NT	NT	NT	III	III	III
31	NT	Ia	NT	Ia	Ia	Ia
52	NT	NT	NT	III	III	III
53	NT	NT	NT	III	III	III

<sup>a</sup> con extractos antigénicos preparados por el procedimiento de extracción ácida caliente de Lancefield.

<sup>b</sup> con *N*-acetilmuramidasa.

\* Origen del antígeno.

NT: No tipificable.