

Rev. Cienc. Tecnol.

Año 12 / N° 14 / 2010 / 25–28

## Detección del gen *rib* en cepas invasivas y colonizantes de *Streptococcus agalactiae* en Misiones

### *Detection of the rib gen in invasive and colonizing Streptococcus agalactiae strains in Misiones*

Angela Keil, Margarita Laczeski, Patricia Oviedo, Eduardo Pegels, Marina Quiroga, María I. Fonseca, Marta Vergara

#### Resumen

El objetivo de este trabajo fue estudiar la distribución de un gen asociado a la virulencia de *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* Grupo B, SGB) en aislamientos colonizantes recuperados de mujeres embarazadas y aislamientos invasivos recuperados de neonatos, y de contribuir con datos útiles para estudios epidemiológicos y para la formulación de una vacuna regional. Un total de 34 aislamientos colonizantes y 7 aislamientos invasivos fueron analizados para detectar el gen *rib* por PCR específica. Se detectó la presencia del gen *rib* en el 87,8 % de los aislamientos, sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre colonizantes e invasivos.

Concluimos que en la población estudiada, el gen *rib* en cepas de SGB se distribuye comparablemente en aislamientos colonizantes recuperados de mujeres embarazadas y en aislamientos invasivos recuperados de neonatos con enfermedad severa.

Palabras clave: *Streptococcus agalactiae*; *Streptococcus* Grupo B; SGB; gen *rib*.

#### Abstract

The aim of this work was to study the distribution of a gene associated with *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*, GBS) virulence in colonizing isolates from pregnant women and invasive isolates from newborn infants. We also aimed to contribute with useful data for epidemiological studies and formulation of a regional vaccine. A total of 34 colonizing isolates and 7 invasive isolates was analyzed for detection of *rib* gene by specific PCR. The *rib* gene was present in 87.8 % of the isolates, without significant differences ( $p > 0.05$ ) between colonizing and invasive ones.

It was concluded that in the population studied, the *rib* gene in GBS strains was distributed comparably in colonizing isolates from pregnant women and invasive isolates from newborn infants with severe disease.

Key words: *Streptococcus agalactiae*; Group B *Streptococcus*; GBS; *rib* gene.

#### Introducción

*Streptococcus* beta hemolítico del grupo B de Lancefield (SGB) es reconocido como el principal causante de graves enfermedades invasivas perinatológicas y desde Abril de 2008 “la obligatoriedad de la realización de la búsqueda de SGB en todas las embarazadas con edad gestacional entre las semanas 35 y 37, presenten o no condiciones de riesgo” está reglamentada por la Ley N° 26.369, para todo el Territorio Nacional. [1]

Entre los factores predisponentes para adquirir la infección se encuentran aquellos relacionados con un incremento de la susceptibilidad en el huésped por los bajos niveles de anticuerpos anticapsulares que genera el serotipo infectante. Además bajos niveles de anticuerpos en la madre o adecuados niveles en la madre pero con nacimiento pretérmino, agregado al reducido pasaje trasplacentario de

inmunoglobulina G, contribuyen al riesgo. [2, 3]

Factores como los asociados a un elevado inóculo del microorganismo, situación frecuente por la colonización particularmente densa en la madre (agravada por manipulaciones obstétricas de monitoreo intrauterino o exámenes ginecológicos), posibilitan el ascenso de bacterias aumentando la exposición del feto. [2]

La colonización del recién nacido se puede producir durante el parto (50–75 %) a partir del tracto genital materno infectado o en el útero, por vía ascendente, siendo la tasa de transmisión vertical mayor al 50 %. [4]

El 1–2 % de los colonizados desarrollará una infección invasiva [4].

En la infección por SGB intervienen diversos factores de virulencia para la prosecución del daño, destacándose: adherencia–invasión celular de epitelios y barreras endoteliales–injurias directas de tejidos–bloqueo de meca-

nismos inmunológicos— inducción del síndrome séptico [5,6,7,8,9].

La adherencia a las superficies epiteliales es mediada por adhesinas proteicas o no proteicas que tienen afección por las células faríngeas fetales. Entre ellas la mejor caracterizada es el Complejo Proteína C, integrado entre otras, por la proteína Rib, codificada por el gen *rib*. [10, 11]

Es de trascendental importancia para la región, la búsqueda del gen *rib* en cepas de SGB aisladas en embarazadas a término y neonatos enfermos, debido a que la expresión de la proteína Rib se encuentra relacionada al serotipo más frecuentemente asociado a enfermedad perinatólogica severa. [12, 13, 14]

Esta proteína Rib fue identificada y secuenciada en la cepa BM 110, un miembro de elevada virulencia, clon de tipo III [15, 16].

Dentro de sus características se destaca su propiedad antigénica que lo hace útil en el desarrollo de estrategias vacunales que protejan al ser humano de esta enfermedad [12, 14].

Se destaca que los recién nacidos hijos de madres colonizadas con SGB serotipo III tienen un riesgo 5,5 veces mayor de presentar sepsis neonatal temprana. [17]

Con el propósito de investigar uno de los genes asociados a la virulencia en cepas de nuestra provincia y aportar datos epidemiológicos regionales útiles en estrategias vacunales, se realizó este trabajo.

## Materiales y métodos

### Cepas bacterianas

Se estudiaron cepas de colección de la Cátedra de Bacteriología recuperadas durante el período 2004–2006: 34 cepas de SGB provenientes de Posadas y del interior de la provincia, recuperadas de hisopados vagino–rectales de mujeres embarazadas con 35–37 semanas de edad gestacional y 7 recuperadas de LCR o hemocultivo de neonatos enfermos.

Las cepas de SGB fueron identificadas por métodos bioquímicos convencionales [4]. La identificación serológica se realizó por el método de aglutinación de partículas de látex específica para el grupo B (Phadebact StrepB Test–ETC Internacional, Bactus AB–Sweden), según instrucciones del fabricante. Las cepas fueron sembradas y conservadas en caldo Todd–Hewitt, en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción del ADN.

### Extracción de ADN

Se realizó siguiendo el protocolo de trabajo para la extracción de ADN procarionta a partir de cultivo bacteriano en medio líquido [18]. Mediante corridas electroforéticas en geles de agarosa al 1 % teñidas con bromuro de etidio

se evaluó la calidad y cantidad de ADN extraído.

### Amplificación del ADN

Los fragmentos de ADN del gen *rib* (5' CAGGAAGTGC TGTTACGTTAAAC3') Gene Bank U58333, fueron amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Sus secuencias fueron cotejadas con el GenBank [19] y sintetizadas por Operon Molecules for Life (USA).

### Evaluación de los productos de PCR

Se llevó a cabo con corridas electroforéticas en gel de agarosa. al 2 %.

### Secuenciación del ADN

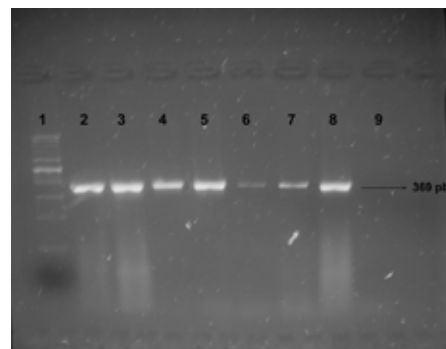
Con la finalidad de corroborar la especificidad de las secuencias de los primers utilizados, se enviaron 3 productos de PCR purificados (según el protocolo de purificación de ADN del Kit de purificación WTZAR GEL AND PCR CLEAN SYSTEM) al Servicio de Secuenciación y Genotipado de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. La secuencia informada, fue analizada con el programa Blast X [19].

### Test estadístico

Los datos fueron comparados utilizando el test exacto de Fisher [20]. Valores de  $p$  menores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

## Resultados

El análisis por PCR reveló la presencia del gen *rib* en el 87,8 % de todas las cepas estudiadas (36/41): 85,29 % (29/34) de las colonizantes y el 100 % (7/7) de las invasivas, (Figura 1) sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).



**Figura 1.** Resultados de la amplificación por PCR utilizando cebadores específicos para el gen *rib* en cepas de SGB invasivas. Línea 1: Marcador de peso molecular K562 DNA (PM 10 ng/μl, Promega Madison, WI USA); líneas 2 a 8: cepas de SGB invasivas; línea 9: control negativo.

El resultado obtenido por secuenciación del ADN, presentó una similitud del 99 % con la secuencia original.

## Discusión

SGB es reconocido como el principal causante de graves enfermedades invasivas perinatológicas. [5]

Entre los factores de virulencia que intervienen para la prosecución del daño, las proteínas de superficie, como Rib (codificada por el gen *rib*), entre otras, cumplen un rol importante. [11]

La proteína Rib se asocia al serotipo III, uno de los más agresivos y asociado a enfermedad neonatal severa. Es antigénica y puede utilizarse en el desarrollo de vacunas que protejan al ser humano de la infección [12]

El estudio de genes que codifican proteínas de superficie es importante para el análisis epidemiológico de las cepas circulantes en la provincia dado que el conocimiento de la distribución y frecuencia, como así también de la emergencia de nuevas cepas en una región, es un fundamental requisito en la formulación de estrategias vacunales.

En este estudio, el gen *rib* fue detectado con mayor frecuencia (87,8 %) que en estudios de Estados Unidos (28 %) [13] y Suecia (43 %) [21].

Estas diferencias podrían deberse a variaciones geográficas o diferencias temporales en la distribución de los serotipos capsulares de las cepas de SGB, como fuera ya descrito por diferentes investigadores, entre ellos Fernández y col. [22], Ko y col. [23], Matsubara y col. [24] y Brimil y col. [25], entre otros.

Coincidimos con el estudio realizado en Estados Unidos [13] y con Kong y col. [15] en que no encontramos diferencias significativas en la frecuencia de detección del gen *rib* en cepas colonizantes respecto a las invasivas ( $p > 0.05$ ).

Esto podría deberse, en los aislamientos estudiados, a la presencia de otros genes involucrados en la virulencia, ya que esta ha sido asociada a la expresión de múltiples genes [13], entre otros, *bca*, *bac*, *hylB* *lmb* que codifican, respectivamente, las proteínas  $\alpha$ -C asociada a la adherencia a la célula epitelial, la  $\beta$ -C a la invasión, la HylB que colabora en la diseminación a través de los tejidos y la Lmb que media en la adherencia a la laminina humana que juega un rol en la invasión y daño epitelial.

## Conclusiones

En este primer estudio:

- La portación del gen *rib* en cepas de SGB se asocia, en la población estudiada, tanto a la colonización en mujeres gestantes como a la enfermedad neonatal.

## Referencias bibliográficas

1. <http://test.e-legis-ar.msal.gov.ar> (consultada 20 Mar 2009).
2. Edwards M.S, Baker C.J. *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B). En: Mandell G.L.; Dolin R; Bennett J.E. Enfermedades infecciosas. Principios y prácticas. Editorial Elsevier; 6ª Edición; España; Vol. 2; p. 2423–34. 2006.
3. Quiroga, M, Pegels, E, Oviedo, P, Pereyra, E, Vergara, M. Antibiotic susceptibility patterns and prevalence of group B. *Streptococcus* isolated from pregnant women. Braz. J. Microbiol.; 39:245–50. 2008.
4. Vergara M., Quiroga M., Oviedo P., Pegels E. Infecciones del Tracto Genital (ITG). En: Las infecciones bacterianas y el laboratorio de bacteriología. Editorial Universitaria, 1ª Edición; Argentina; p.168–172. 2009.
5. Spellerberg B. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. Microbes. Infect.; 2:1733–42. 2000.
6. Broughton R.A., Baker C.J. Role of adherence in the pathogenesis of neonatal Group B streptococcal infection. Infect. Immun.; 39(2):837–43. 1983.
7. Farinati, A. Factores de virulencia de *Streptococcus* Grupo B con importancia en las infecciones neonatales. Asoc. Argent. Microbiol. Area Técnica. Boletín N°145. 2001.
8. Doran K.S., Nizet V. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. Mol Microbiol; 54(1):23–31. 2004.
9. Cheng Q.I., Carlson B., Pillai S., Eby R., Edwards L., Stephen B.O., Patrick C. Antibody against surface-bound C5a peptidase Is opsonic and initiates macrophage killing of Group B *Streptococci*. Infect. Immun.; 69(4):2302–08. 2001.
10. Wästfelt M.; Ståhlhammar Carlemalm M., Delisse A.M., Cabezon T., Lindahl G. Identification of a family of streptococcal surface proteins with extremely repetitive structure. J. Biol. Chem.; 271(31):18892–7.1996.
11. Lindahl G., Ståhlhammar Carlemalm M., Areschoug, T. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. Clin. Microbiol. Rev.; 18(1):102–27. 2005.
12. Larsson C., Ståhlhammar Carlemalm., Lindahl G. Experimental vaccination against group B *Streptococcus*, an encapsulated bacterium, with highly purified preparations of cell surface proteins Rib and alpha. Infect Immun; 64 (9):3518–23. 1996.
13. Manning S.D., Ki M., Marrs C.F., Kugeler K.J., Borchardt S.M., Baker C.J., Foxman B. The frequency of genes encoding three putative group B streptococcal virulence factors among invasive and colonizing isolates. BMC Infect. Dis.; 6:116. 2006.
14. Nagano N., Nagano Y., Taguchi F. High expression of a C protein  $\beta$  antigen gene among invasive strains from

- certain clonally related groups of type Ia and Ib group B *Streptococci*. *Infect. Immun.*; 70(8):4643–9. 2002.
15. Kong F., Gowan S., Martin D., James G., Gilbert, G.L. Molecular profiles of group B streptococcal surface protein antigen genes: relationship to molecular serotypes. *J. Clin Microbiol*; 40 (2): 620–6. 2002.
  16. Gherardi G., Imperi M., Baldassarri L., Pataracchia M., Alfalone G., Recchia S., Orefici G., Dicuonzo G., Creti R. Molecular epidemiology and distribution of serotypes, surface proteins, and antibiotic resistance among Group B *Streptococci* in Italy. *J. Clin. Microbiol.*; 45(9):2909–16. 2007.
  17. Figueroa J.R., Ortiz F.J., Ibarra M.B., Zúñiga G.V., Gabriel A.E., Rojas L. Riesgo de infección neonatal temprana en recién nacidos hijos de mujeres embarazadas colonizadas con *Streptococcus agalactiae* serotipo III. *Rev. Enf. Infec. en Pediatría*. XVIII (73):13–7. 2005.
  18. Cariaga Martínez A.E., Zapata P.D. Protocolos de Extracción de ADN. En: *El laboratorio de Biología Molecular*. Edición ampliada. Misiones, Argentina, Editorial Universitaria de Misiones, 2007, p. 23–39.
  19. <http://ncbi.nlm.nih.gov> (consultada Mar 2009).
  20. Siegel S. Prueba de probabilidad exacta de Fisher. En: *Estadística no paramétrica aplicadas a las ciencias de la conducta*. Editorial Trillas, 3ª Edición, México. p. 120–186. 1976.
  21. Persson E., Berg S., Bevanger L., Bergh K., Valsö Lyng R., Trollfors B. Characterisation of invasive group B *Streptococci* based on investigation of surface proteins and genes encoding surface proteins. *Clin. Microbiol. Infect.* 14(1):66–73. 2008.
  22. Fernandez M., Hickman, M.E., Baker C.J. Antimicrobial susceptibilities of Group B *Streptococci* isolated between 1992 and 1996 from patients with bacteremia or meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1517–9. 1998.
  23. Ko W.C., Lee H.C., Wang L.R., Lee C.T., Liu A.J., Wu J.J. Serotyping and antimicrobial susceptibility of group B *Streptococcus* an eight years period in Southern Taiwan. *Eur. J Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20: 334–9. 2001.
  24. Matsubara K., Nishiyama Y., Katayama K., Yamamoto G., Sugiyama M., Murai T., Baba K. Change of antimicrobial susceptibility of group B *Streptococci* over 15 years in Japan. *J. Antimicrob Chemother.* 48: 579–82. 2001.
  25. Brimil N., Barthell E., Heindrichs U., Kuhn M., Lütticken R., Speillerberg B. Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* colonization in Germany. *Int. J. Med. Microbiol.* 296(1):39–44. 2006.
- Ángela Keil<sup>1</sup>  
Bioquímica; Becaria CEDIT Cátedra de Bacteriología, Carrera de Bioquímica, FCEQyN, UNaM.
  - Margarita Laczeski<sup>1</sup>  
Bioquímica; Jefe de Trabajos Prácticos, Cátedra de Bacteriología, Carrera de Bioquímica, FCEQyN, UNaM; Categoría V Sistema de Incentivos Docentes–Investigadores.
  - Patricia Oviedo<sup>1</sup>  
Bioquímica; Magister en Gerenciamiento y Administración en Sistema de Salud; Jefe de Trabajos Prácticos, Cátedra de Bacteriología, Carrera de Bioquímica, FCEQyN, UNaM; Categoría III Sistema de Incentivos Docentes–Investigadores.
  - Eduardo Pegels<sup>1</sup>  
Licenciado en Bioquímica; Especialista en Microbiología Clínica; Jefe de Trabajos Prácticos Cátedra de Bacteriología, Carrera de Bioquímica, FCEQyN, UNaM; Categoría III Sistema de Incentivos Docentes–Investigadores.
  - Marta Vergara<sup>1</sup>  
Bioquímica; Master Internacional en Bacteriología y Microbiología; Especialista en Educación Superior; Profesora Titular Cátedra de Bacteriología, Carrera de Bioquímica, FCEQyN, UNaM; Categoría II Sistema de Incentivos Docentes–Investigadores.
  - Marina Quiroga<sup>1</sup>  
Bioquímica; Especialista en Microbiología Clínica; Doctora de la Universidad de Buenos Aires, área Microbiología; Profesora Adjunta Cátedra de Bacteriología, Carrera de Bioquímica, FCEQyN, UNaM; Categoría II Sistema de Incentivos Docentes–Investigadores.
  - María Isabel Fonseca<sup>2</sup>  
Licenciada en Genética; Ayudante de Primera Cátedra de Biología Molecular y Genética, Carrera de Bioquímica, FCEQyN, UNaM. Becaria CONICET, Categoría V Sistema de Incentivos Docentes–Investigadores.
1. Cátedra de Bacteriología. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Av. Mariano Moreno 1375 (3300), Posadas, Misiones, Argentina.
  2. Cátedra de Biología Molecular y Genética. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Av. Mariano Moreno 1375, (3300), Posadas, Misiones, Argentina.  
minesvergara1@yahoo.com.ar, marinaquiroga@fceqyn.unam.edu.ar.

Recibido: 06/08/10.

Aprobado: 02/11/10.