

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



Evaluación de respuesta inmune protectora de vacuna oral de subunidad de la proteína inmunológica de superficie de *Streptococcus agalactiae* en modelo murino

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica Clínica por:

YESSICA LEYTON GALAZ

Director de Tesis: Dr. Abel E. Vásquez Veloso

Dr. Christian A.M. Wilson Moya

Santiago - CHILE

Marzo 2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato:

YESSICA LEYTON GALAZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización Bioquímica Clínica, en el examen público rendido el día: _____

Director de Tesis:

Dr. Abel E. Vásquez V.

Co-director de Tesis:

Dr. Christian A.M. Wilson M.

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. María Antonieta Valenzuela P.

Dr. Roberto Vidal A.

Dr. Dante Miranda W.

REALIZACIÓN

Este trabajo de tesis se realizó en la Sección de Biotecnología del Instituto de Salud Pública de Chile y en el Departamento de Microbiología y Genética Molecular del Centro Internacional de Salud Pública de la Universidad de Rutgers (Estados Unidos).

FINANCIAMIENTO

- Fondos aportados por el Instituto de Salud Pública de Chile a la Sección de Biotecnología
- Fondos aportados por la Vicerrectoría de Asuntos Académicos de la Universidad de Chile de acuerdo al concurso de “Ayudas para Estadías Cortas de Investigación para Tesistas de Doctorado y Magíster de la Universidad de Chile” (Convocatoria 2014 – 2015).

ABREVIATURAS

BSA:	Albúmina de Suero de Bovino
CAMP:	Christie Atkins Munch-Petersen
CBA:	Cytometric Bead Array
CC:	Clonal complex/ Complejo clonal
CDC:	Center for Disease Control and Prevention
CMSP:	Células Mononucleares de Sangre Periférica
EOD:	Early Onset Disease/ Enfermedad de inicio temprano
IgG:	Inmunoglobulina G
IgA:	Inmunoglobulina A
IPTG:	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
ISPCH:	Instituto de Salud Pública de Chile
LB:	Luria Bertani
LOD:	Late Onset Disease/ Enfermedad de inicio tardío
LysM:	Motivo Lisina
OD₆₀₀:	Densidad óptica a 600 nm
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PBS:	Phosphate buffered saline/Buffer fosfato salino
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PSI-BLAST:	Position-Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool
q-PCR:	PCR cuantitativo
rpm:	Revoluciones por minuto
rSIP:	Proteína SIP recombinante
SDS-PAGE:	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SGB:	<i>Streptococcus agalactiae</i>
SIP:	Surface Immunogenic Protein
ST:	Sequence Typing/ Tipo de secuencia

TLR2: Toll Like Receptor 2/ Receptor tipo toll 2

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Grupos de riesgo y enfermedades producidas por SGB	2
a) Mujeres embarazadas	2
b) Neonatos	2
c) Adultos	3
2. Epidemiología	4
3. Factores de riesgo	4
4. Patogénesis de SGB	5
5. Medidas preventivas para el manejo de las infecciones por SGB	7
a) <i>Screening</i> y profilaxis	7
b) Vacunas	8
6. Proteína SIP	10
7. Inmunización mucosal	12
a) Inmunización oral	13
8. Evaluación de respuesta inmune de un prototipo de vacuna	14
a) Análisis de la producción de anticuerpos por los Linfocitos B	14
b) Métodos para estudiar las respuestas de los Linfocitos T	14
c) Evaluación de infiltración de células del sistema inmune hacia el foco de infección.	16
II. HIPÓTESIS	17
III. OBJETIVOS	18
1. Objetivo general	18
2. Objetivos específicos	18

IV. MATERIALES Y MÉTODOS	19
1. Obtención de la proteína SIP recombinante	19
a) Expresión y purificación de la proteína SIP	19
b) Identificación de la proteína rSIP	20
i) Western blot	20
ii) Espectrometría de masas	20
2. Desarrollo de un modelo de infección intravaginal por SGB en ratones C57BL/6	22
a) Adaptación de una cepa de SGB III al modelo animal	22
b) Modelo de infección intravaginal	22
3. Evaluación de la respuesta inmune protectora de la colonización por SGB del tracto genitourinario de ratones vacunados oralmente con la proteína rSIP	24
a) Modelo de inmunización	24
b) Evaluación inmunológica	25
i) Preparación del suero	25
ii) ELISA para la detección de anticuerpos IgG anti-rSIP en suero	25
iii) ELISA para la detección de anticuerpos IgA anti-rSIP en suero	26
iv) Extracción de tracto genitourinario	26
v) Extracción de bazo	26
vi) Inmunofenotipificación de células de bazo y tracto genitouterino	27
vii) Cultivo de esplenocitos	27
viii) Cuantificación de citoquinas en sobrenadantes de cultivos de esplenocitos	28
ix) Evaluación de factores de transcripción en esplenocitos en cultivo	28
x) Análisis microbiológico	29
4. Estudio de la interacción de SGB y la barrera hematoencefálica humana	30
a) Cultivo de células endoteliales humanas	30
b) Cultivo de astrocitos humanos	30

c) Interacción de SGB con células endoteliales humanas <i>in vitro</i>	30
d) Interacción de SGB con uniones estrechas de células endoteliales humanas	31
e) Transmigración de células mononucleares a través de un modelo de barrera hematoencefálica <i>in vitro</i> expuesto a un inóculo de SGB	31
5. Análisis estadístico	33
V. RESULTADOS	34
1. Obtención de la proteína rSIP	34
a) Expresión y purificación de la proteína SIP	34
b) Identificación de la proteína rSIP	34
i) Western blot	34
ii) Espectrometría de masas	35
2. Desarrollo de un modelo de infección intravaginal por SGB en ratones C57BL/6	37
a) Adaptación de una cepa de SGB III al modelo animal	37
b) Modelo de infección intravaginal	39
3. Evaluación de la respuesta inmune protectora de la colonización por SGB del tracto genitourinario de ratones vacunados oralmente con la proteína rSIP	41
a) Evaluación inmunológica	41
i) ELISA para la detección de anticuerpos IgG anti-rSIP en suero	41
ii) ELISA para la detección de anticuerpos IgA anti-rSIP en suero	42
iii) Inmunofenotipificación de tracto genitouterino	43
iv) Inmunofenotipificación de bazo	44
v) Cuantificación de citoquinas en sobrenadantes de cultivos de esplenocitos	45
vi) Evaluación de factores de transcripción en esplenocitos en cultivo	47
vii) Análisis microbilógico	47

4. Estudio de la interacción de SGB y la barrera hematoencefálica humana	48
a) Interacción de SGB con células endoteliales humanas <i>in vitro</i>	48
b) Interacción de SGB con uniones estrechas de células endoteliales humanas	49
c) Transmigración de células mononucleares a través de un modelo de barrera hematoencefálica <i>in vitro</i> expuesto a un inóculo de SGB	50
VI. DISCUSIÓN	53
VII. CONCLUSIÓN	61
VIII. BIBLIOGRAFÍA	62
IX. ANEXOS	
Subtipificación Molecular de <i>S. agalactiae</i> por MLST	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Resumen de los principales grupos afectados por la infección por SGB, manifestaciones clínicas y sus frecuencias	3
Tabla 2:	Resumen de las principales ventajas de la inmunización oral	13
Tabla 3:	Principales citoquinas asociadas a las subpoblaciones TH1, TH2 y TH17 de los linfocitos TCD4+	15
Tabla 4:	Distribución de animales pertenecientes al modelo de infección intravaginal, inóculo intravaginal y tratamiento farmacológico administrado	23
Tabla 5:	Detalle de grupos, formulación, dosis y tratamientos aplicados a los animales del modelo de inmunización oral	25
Tabla 6:	Panel de inmunofenotipificación de muestras de bazo y tracto genitourinario	27
Tabla 7:	Detalle de secuencia de partidores, tamaño del fragmento amplificado y Condiciones de Amplificación para los genes β -actina, GATA-3 y t-bet	29
Tabla 8:	Análisis conductual de los animales del modelo de infección intravaginal	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Ciclo de vida de SGB como patógeno neonatal	7
Figura 2:	Secuencia de aminoácidos de la proteína SIP	10
Figura 3:	Estructura tridimensional de un LysM	11
Figura 4:	Esquema de procedimientos realizados a los animales pertenecientes al modelo de infección intravaginal	24
Figura 5:	Esquema ensayo de transmigración de células mononucleares de sangre periférica a través del modelo de barrera hematoencefálica in vitro	32
Figura 6:	SDS-PAGE de fracciones eluidas de la columna de afinidad Pro-Bond	34
Figura 7:	Western blot de la proteína rSIP purificada	35
Figura 8:	Espectrometría de masas de la proteína rSIP	36
Figura 9:	Análisis microbiológico de una cepa de SGB III adaptada a un modelo murino de infección intravaginal	37
Figura 10:	Análisis del alineamiento de la secuencia del rRNA 16S de la cepa de SGB adaptada al modelo animal, versus la base de datos de NCBI	38
Figura 11:	Verificación del estadio del ciclo estral	39
Figura 12:	UFC de SGB recuperadas del tracto genitourinario de ratones colonizados	41
Figura 13:	Absorbancia a 405 nm de diluciones seriadas de sueros de ratones inmunizados para la evaluación de los niveles de anticuerpos IgG anti-Rsip	42
Figura 14:	Absorbancia a 405 nm de diluciones seriadas de sueros de ratones inmunizados para la evaluación de los niveles de anticuerpos IgA anti-rSIP	43

Figura 15:	Infiltración de Neutrófilos en el tracto genitourinario de animales inmunizados	44
Figura 16:	Inmunofenotipificación de linfocitos T en bazo	45
Figura 17:	Niveles de expresión de citoquinas Th1, Th2 y Th17 determinadas mediante CBA en los grupos de animales inmunizados	46
Figura 18:	Evaluación de los niveles de expresión de los factores de transcripción T-bet y GATA-3, asociados a respuestas inmune del tipo Th1 y Th2	47
Figura 19:	Recuento de UFC de SGB en hisopados vaginales de ratones inmunizados	48
Figura 20:	Cultivo de células endoteliales desafiadas con SGB-FITC	49
Figura 21:	Niveles de expresión de proteínas de las uniones estrechas en cultivos de células endoteliales desafiadas con SGB	50
Figura 22:	Transmigración de CMSP a través del modelo BHEH <i>in vitro</i>	51
Figura 23:	Absorbancia a 620 nm de los compartimientos inferiores de modelos de BHEH expuestas a BSA conjugada a Evans Blue	52

RESUMEN

Streptococcus agalactiae (SGB) es una bacteria Gram positiva anaeróbica facultativa capaz de colonizar el tracto genitourinario de un 15 a un 40% de mujeres sexualmente activas. En la mayoría de los casos la infección con este patógeno es asintomática pero en neonatos puede originar sepsis, meningitis y neumonía.

A partir del año 1990 el CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) ha implementado una serie de protocolos de prevención dirigidos a mujeres embarazadas los cuales constan de pruebas microbiológicas realizadas entre las 35 y 37 semanas de gestación y la aplicación de antibióticos intraparto en mujeres colonizadas. A pesar de que medidas han tenido un alto impacto en la disminución de la incidencia de la infección por SGB este patógeno persiste como el único y más frecuente aislado desde la sangre o del fluido cerebroespinal de infantes menores de 3 meses de edad y de mujeres con infecciones intraparto en Estados Unidos y en otros países industrializados.

Numerosos estudios realizados a neonatos sanos nacidos de madres colonizadas con SGB indican que estos tienen niveles superiores de anticuerpos IgG transferidos transplacentalmente que aquellos que desarrollaron la infección. Basado en este hecho actualmente se trabaja arduamente en el desarrollo de una vacuna capaz proteger a mujeres embarazadas y sus infantes.

En la actualidad, vacunas en base a polisacáridos conjugados están en Fase clínica III, con el inconveniente de que la vacuna ensayada será serotipo dependiente y solamente inducirá una respuesta inmune protectora contra los serotipos incluidos en su formulación (3 de 10 serotipos).

Vacunas en base a proteínas conservadas de SGB se encuentran en estudio, una de ellas es la proteína SIP (*Surface Immunogenic Protein*), con la cual se trabaja en la Sección de Biotecnología del ISPCH.

En este estudio se evaluará la respuesta inmune protectora de un prototipo de vacuna en base a la proteína recombinante SIP de SGB, evaluando parámetros inmunológicos que permitan demostrar la inducción de inmunidad protectora en modelo ratón.

I. INTRODUCCIÓN

Streptococcus agalactiae, o estreptococo del grupo B, es un diplococo *Gram* (+), capsulado, anaeróbico facultativo, β -hemolítico en agar sangre de cordero, caracterizado por la presencia del antígeno polisacárido B de Lancefield en la pared celular (Lancefield y Hare, 1935; Fry, 1938; Kasper y Baker, 1979).

SGB fue descrito en primer lugar por Nocard y Mollereau (1887) como la causa de mastitis bovina contagiosa. Posteriormente, Lancefield y Hare (1935) lo aislaron desde hisopados vaginales. En los años 70s surge como el patógeno más frecuente en el periodo neonatal temprano y a partir de los 80s se le reconoce como el principal agente causante de sepsis neonatal y meningitis en países desarrollados (Kalliola y cols., 1999; Fluegge y cols., 2006; Neto, 2008).

En humanos, SGB es considerado oportunista, (Puopolo, 2014) ya que puede actuar como un organismo comensal o como patógeno (Montes y García-Arenzana, 2007). Se ha estimado que en países desarrollados entre un 20% y un 40% de mujeres sanas están colonizadas asintómicamente por este microorganismo en el tracto gastrointestinal y/o genitourinario (Chen y cols, 2013). Sin embargo, mujeres embarazadas, adultos inmunocomprometidos y ancianos son considerados población de alto riesgo para el desarrollo de la enfermedad invasiva por SGB (Le Doare y Heath, 2013).

En los aislados humanos de SGB se encontró que estos expresan un polisacárido capsular, el cual es considerado el principal factor de virulencia ya que ayuda al microorganismo a evadir los mecanismos de defensa del hospedero. La composición de los polisacáridos capsulares determinan 10 serotipos de SGB (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX) cada uno es antigénicamente y estructuralmente único (Le Doare y Heath, 2013). A pesar de que Baker y cols. (1973) demostraron que todos los serotipos son capaces de causar infección neonatal, los aislados del tipo III están significativamente incrementados entre los infantes con meningitis por SGB. Un estudio global de aislados invasivos mostró que el serotipo III fue el más frecuentemente identificado en todas las regiones (48,9%), seguido con los serotipos Ia (22,9%), V (9,1%), Ib (7%) y II (6,2%) (Le Doare y Heath,

2013). En Chile, se ha determinado que los serotipos Ia, II, III se presentan con mayor frecuencia, siendo el serotipo III el aislado más frecuentemente en pacientes que desarrollaron cuadros invasivos (Rojo y cols., 2008, Boletín ISPCH, 2012).

1- Grupos de riesgo y enfermedades producidas por SGB

En la tabla N°1 se enlistan los principales grupos de riesgo para el desarrollo de infección por SGB y las principales manifestaciones clínicas.

a) Mujeres embarazadas

Entre un 25 y un 35% de las mujeres embarazadas son portadoras de SGB en el tracto genital bajo o gastrointestinal. En estos casos la enfermedad se presenta típicamente como una infección del tracto genital, placenta, o del saco amniótico o como bacteriemia de fuente genitourinaria o desconocida. En teoría esta infección no produce muerte maternal, pero en un 60 % de ellas produce abortos espontáneos o muerte fetal (Chen y cols., 2013).

Cerca del 50% de las mujeres colonizadas transmiten el microorganismo verticalmente al tracto gastrointestinal o respiratorio alto de los neonatos, muchos de los cuales permanecen sanos y 1 al 2% desarrolla la enfermedad de inicio temprano (Edwards y cols. 2011).

b) Neonatos

Dos síndromes clínicos diferentes se identifican entre los neonatos de acuerdo a la edad de presentación; Enfermedad de inicio temprano (EOD, por sus siglas en inglés *Early Onset Disease*) y en Enfermedad de inicio tardío (LOD, por sus siglas en inglés *Late Onset Disease*) (Dermer y cols., 2004).

EOD se define como una infección que se presenta en los primeros 6 días de vida y que da cuenta de aproximadamente un 60 a un 70 % de todas las enfermedades por SGB. Los serotipos Ia, II, III y V son responsables de la mayor parte de EOD. La portación maternal de SGB en el tracto gastrointestinal y en el tracto genitourinario es un prerrequisito para EOD, donde la transmisión se produce verticalmente durante o justo antes del parto y es favorecida por complicaciones obstétricas (Whidbey y cols., 2013). La

enfermedad puede ocurrir rápidamente; los signos son evidentes en el parto o en 12 horas en el 90% de los casos y la presentación es típicamente con neumonía o sepsis (Le Doare y cols, 2013).

En contraste, LOD se presenta entre los 7 y 90 días del neonato, es causada principalmente por el serotipo III de SGB y es adquirida perinatalmente, nosocomialmente, a través de la leche materna o por el contacto con otras personas. En la mayoría de los casos se presenta con meningitis. (Le Doare y Heath, 2013)

c) **Adultos**

En adultos, la incidencia anual de la enfermedad invasiva por SGB es de ~30 por cada 100.000 y ha aumentado gradualmente. Pacientes diabéticos, enfermos de cáncer, cirrosis, infectados con VIH y personas mayores de 65 años están especialmente en riesgo.

Comúnmente SGB en adultos se presenta como infección de la piel o tejido blando, bacteriemia sin foco, neumonía y osteomielitis. Síndromes clínicos serios como meningitis y endocarditis son raros, pero están asociados con una considerable mortalidad y morbilidad (Randis y cols., 2014). Actualmente, no existe una estrategia para prevenir la enfermedad por SGB en adultos mayores, pacientes inmunocomprometidos y en adultos no embarazadas (Puopolo, 2014).

TABLA N°1
Resumen de los principales grupos afectados por la infección por SGB, manifestaciones clínicas y sus frecuencias

Población	Manifestaciones
EOD neonatal (<7 días de edad)	Bacteremia sin foco (83%), neumonía (9%), meningitis (7%)
LOD neonatal/ (7 a 90 días de edad)	Bacteremia sin foco (65%), meningitis (27%), celulitis (3%), neumonía (3%)
Niños / (desde 90 días de edad a 14 años)	Bacteremia sin foco (58%), meningitis (19%), neumonía (7%), artritis (5%), peritonitis (4%)
Adultos / (>15 años)	Bacteremia sin foco (48%), celulitis (22%), neumonía (11%), osteomielitis (9%), artritis (9%), peritonitis (3%), abscesos (3%)
Mujeres embarazadas	Endometritis o corioamnionitis con muerte fetal (50%), bacteriemia sin foco (31%), endometritis sin muerte fetal (8%), corioamnionitis sin muerte fetal (4%), neumonía (2%)

* Modificada de Chen y cols., 2013.

2- Epidemiología

En Chile, se ha descrito que la infección por SGB afecta entre 2 a 4 neonatos por cada 1000 recién nacidos, con una letalidad cercana al 15% (Guzmán y cols., 2001).

En el año 2010 la incidencia de EOD en EE.UU fue de 0,25 por 1000 nacidos vivos. Esto representa más del 80% de reducción de la incidencia de EOD desde los años 90 cuando se implementó un screening antenatal y con el uso de profilaxis antibiótica para todas las portadoras de SGB. La incidencia de LOD, sin embargo, permanece sin cambio (0,26 por cada 1000 nacidos vivos) (Melin y Efstratiou, 2013).

En Chile, al igual que en muchos otros países no se han implementado metodologías de pesquisa y de profilaxis en todos los centros de salud donde acuden mujeres embarazadas, debido a los costos que esto significa. Por lo tanto, no se dispone de información del real impacto de SGB a nivel mundial.

3- Factores de riesgo

El tracto gastrointestinal es el principal reservorio de SGB y la fuente de colonización vaginal en mujeres. Una inadecuada higiene local o algunas prácticas sexuales pueden incrementar el riesgo de colonización vaginal. Otros factores de riesgo asociados con la colonización maternal incluyen etnicidad (mujeres de raza negra), el uso de tampones u otros dispositivos intrauterinos, ausencia de lactobacilos en la flora gastrointestinal y pre-término del parto. La bacteriuria de SGB durante el embarazo está asociado con una abundante colonización, el principal factor de riesgo para la transmisión perinatal. Mujeres con bacteriuria demuestran una gran incidencia de pronósticos adversos: aborto, restricción del crecimiento intrauterino, pre-término del parto, corioamnionitis y ruptura prematura de membranas (Le Doare y Heath, 2013). Según Heath y cols. (2004) infantes nacidos de mujeres colonizadas tienen un incremento del riesgo de 29 veces de padecer EOD, comparado con infantes nacidos de mujeres no colonizadas.

Se ha demostrado que el principal factor de riesgo para el desarrollo de EOD y LOD son las bajas concentraciones de anticuerpos maternos IgG anti polisacáridos capsulares de SGB (Baker, 2013). Mujeres colonizadas con SGB que dieron a luz a infantes sanos

tienen concentraciones de IgG dirigidas contra polisacáridos capsulares significativamente mayores que mujeres cuyos infantes desarrollaron infecciones (LOD y EOD) (Baker y Kasper., 1976; Baker y cols., 1977).

A diferencia de EOD, LOD típicamente no es precedida por complicaciones obstétricas. Muy recientemente se ha esclarecido que el principal factor de riesgo para LOD es la extrema prematuridad (Baker, 2013). Este aumento del riesgo se debe probablemente por un descenso de la transmisión transplacental de anticuerpos protectores maternos (Chen y cols., 2013).

4- Patogénesis de SGB

SGB comúnmente reside como un organismo comensal en el tracto genital materno y/o gastrointestinal bajo, pero puede convertirse en un patógeno invasivo capaz de causar enfermedad invasiva severa (Kadioglu y cols., 2008). El desarrollo de la enfermedad por SGB refleja la capacidad de la bacteria de colonizar el epitelio vaginal, la penetración de las barreras epiteliales y placentarias, la resistencia a los mecanismos de defensa (*clearance*) del sistema inmune, permitiendo su sobrevivencia en el torrente sanguíneo y en caso de meningitis, la habilidad de penetrar la barrera hematoencefálica (Maisey y cols., 2009) (Figura 1). Para superar estos obstáculos, SGB regula la expresión de diversos factores de virulencia.

En primera instancia, es necesaria la colonización mucosal asintomática del tracto urogenital materno. SGB establece interacciones de baja afinidad entre el ácido lipoteicoico de la pared celular y células de la mucosa vaginal e interacciones de alta afinidad mediadas por proteínas hidrofóbicas de la superficie. Dichas interacciones involucran a proteínas de la matriz extracelular, tales como, fibrinógeno, fibronectina y laminina. La proteína C5a peptidasa además de su capacidad de interferir con el reclutamiento de neutrófilos hacia los sitios de infección mediante la inactivación del componente C5a del complemento tiene motivos de adhesión de alta afinidad a fibronectina (Beckmann, 2002).

Luego de la adherencia y colonización de SGB, el neonato se expone un gran inóculo debido una abundante colonización genital o por la entrada de SGB en el fluido amniótico

estéril a través de una ruptura de membrana prolongada u oculta. Para EOD se sabe que la bacteremia se produce por la inhalación de fluido amniótico infectado y/o secreciones hacia los pulmones donde se inician los mecanismos de invasión. SGB puede secretar toxinas o emplear factores de virulencia de la superficie celular para promover su entrada y sobrevivencia en células del huésped. La β -hemolisina/citolisina es una toxina formadora de poros asociada a la superficie de SGB capaz de lisar células epiteliales de los pulmones y células endoteliales, afectando su rol de barrera (Nizet, 1996; Gibson y cols., 1999). Dicha toxina además induce la liberación de IL-8, un potente quimioatrayente de neutrófilos (Doran, 2002; Randis y cols, 2014).

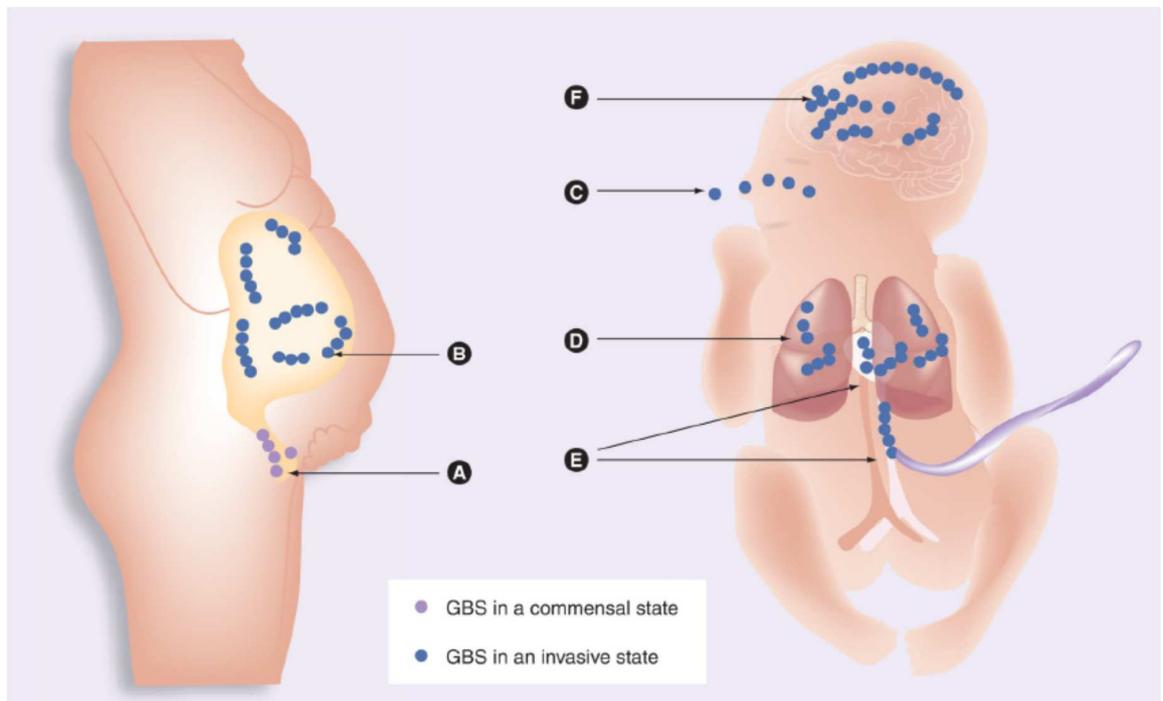
Una vez que SGB penetra las barreras celulares y llega al torrente sanguíneo se activa una amplia respuesta inmune para combatir la infección, en la cual células fagocíticas, tales como, neutrófilos y macrófagos juegan un rol crucial. La acción de estas células depende de la opsonización por anticuerpos específicos y por factores del complemento, los cuales se encuentran disminuidos en neonatos. El potencial de SGB para producir infecciones invasivas depende en gran parte de factores de virulencia que le permiten a la bacteria evadir la opsonofagocitosis o neutralizar la actividad bactericida de neutrófilos y macrófagos. Los polisacáridos capsulares ricos de ácido siálico de SGB son cruciales en esta etapa, ya que ayudan a evadir la fagocitosis al interferir con la deposición del componente C3 del complemento (Marques, 1992). Cuando SGB burla las barreras epiteliales y la respuesta inmune del huésped, se establece la bacteremia.

Para producir meningitis, SGB debe penetrar la barrera hematoencefálica, la cual está compuesta de células endoteliales microvasculares especializadas en mantener la homeostasis del sistema nervioso central y en impedir el paso de toxinas y microbios circulantes en la sangre. Los mecanismos moleculares que regulan la disrupción de la barrera hematoencefálica por bacterias y la penetración en el sistema nervioso central no están descritos.

FIGURA 1.

Ciclo de vida de SGB como patógeno neonatal: **A)** SGB reside en estado comensal en el tracto genital o gastrointestinal de mujeres embarazadas. **B)** SGB puede infiltrarse en el compartimento intrauterino. **C)** Neonatos aspiran SGB en el útero o en el canal de parto. **d)** SGB invade los pulmones del neonato. **e)** SGB entra en el torrente sanguíneo causando sepsis. **f)** SGB penetra la barrera hematoencefálica produciendo meningitis. (Simbología: ● SGB en estado comensal; ● SGB en estado invasivo)

*Modificada de Rajagopal, 2010.



5- Medidas preventivas para el manejo de las infecciones por SGB

a) Screening y profilaxis

Actualmente, mujeres embarazadas de 35 a 37 semanas de gestación se someten a un *screening* de rutina que consiste en cultivos microbiológicos vaginales y rectales. Las mujeres colonizadas con SGB reciben profilaxis con ampicilina, penicilina u otros antibióticos para disminuir el riesgo de transmisión vertical, según guías establecidas por la CDC. Esta terapia también se aplica a pacientes con complicaciones obstétricas (Shrag y Verani, 2013).

En Estados Unidos, la implementación de guías de *screening* y profilaxis permitió la disminución de más de un 80% de EOD entre los años 1990 y 2010. Sin embargo, estas medidas no produjeron una disminución en la incidencia o cambios en la severidad de las presentaciones clínicas de LOD durante el mismo periodo (Steinhoff, 2013).

A pesar de que la implementación de medidas de *screening* y profilaxis ha tenido un positivo impacto en la disminución de las enfermedades producidas por la infección con SGB existen limitaciones inherentes a esta metodología. Se ha descrito, que la colonización con SGB en el tracto genitourinario puede ser transitoria, intermitente o persistente lo que produce una gran cantidad de falsos negativos. Además, los partos precipitados impiden una profilaxis adecuada antes del parto. Finalmente, una estrategia de prevención basada en antibióticos es vulnerable a la resistencia antimicrobiana y a la producción de shocks anafilácticos en mujeres alérgicas (Schrag, 2013).

b) Vacunas

Actualmente, el desarrollo de una vacuna es la opción que más promete para la prevención de la infección por SGB en neonatos, dados los potenciales efectos adversos de la profilaxis con antibióticos intraparto y a que esta medida no es 100% efectiva (Burns y Plumbs, 2013)

El uso de vacunas en mujeres embarazadas ha demostrado múltiples beneficios para la madre y para el recién nacido, incluyendo el aumento de peso al nacer de infantes nacidos de mujeres inmunizadas (Steinhoff, 2013). Con los avances en vacunaciones que han controlado el riesgo para Influenza del tipo b y enfermedades meningocócica y neumocócica en niños, la principal causa de meningitis en pacientes pediátricos en EEUU es SGB (Muñoz y Ferrieri, 2013). Una vacuna para SGB administrada a mujeres embarazadas podría tener el potencial de prevenir la morbilidad de infecciones por SGB en madres con riesgo de prematuridad, evitar abortos involuntarios y muerte fetal, así como también proteger al infante de EOD y LOD a través de la adquisición pasiva de anticuerpos (Madhi y cols., 2013).

Novartis Vaccines and Diagnostics ha desarrollado una vacuna que contiene conjugados de polisacáridos capsulares de los serotipos Ia, Ib y III. Esta vacuna ha

demostrado ser segura e inmunogénica en mujeres embarazadas y no embarazadas y provee anticuerpos anticapsulares a los infantes nacidos de mujeres inmunizadas (Rappuoli y cols., 2011).

A pesar de que los polisacáridos capsulares de SGB son considerados el principal factor de virulencia, las vacunas basadas en estas estructuras tienen la limitante de que no pueden ser aplicadas universalmente, porque solo confieren protección contra los serotipos para los cuales fueron diseñadas y no presentan protección cruzada (Puopolo, 2014). Además, vacunas basadas en polisacáridos fueron incapaces de generar respuestas inmunes mucosales significativas (Kotloff y cols., 1996; Hunter y cols., 2001). Una respuesta inmune mucosal es crítica para eliminar completamente la colonización maternal y prevenir que la infección se transmita verticalmente a los niños durante el parto.

Debido a las limitantes de las vacunas basadas en polisacáridos capsulares se están investigando otros factores de virulencia con el objetivo de dilucidar nuevos antecedentes de la patogénesis de SGB y como posibles blancos terapéuticos (Edwards y Gonik, 2013). Recientemente se han descrito 3 variantes de proteínas filamentosas que son expuestas en la superficie celular que constituyen estructuras tipo *pili*. El *pili* de SGB está compuesto por 3 componentes que se encuentran solos o en combinación en todos los serotipos (Margarit y cols., 2009). El *pili* se presume que es un importante factor de virulencia y que juega un rol clave en la adherencia de SGB a las células epiteliales del hospedero y promueve la migración trans-epitelial.

Componentes de la pared celular, como por ejemplo las lipoproteínas ancladas en la membrana citoplasmática y el ácido lipoteicoico desencadenan respuestas inflamatorias en el huésped que pueden inducir sepsis al activar las células del sistema inmune mediante la activación del receptor tipo *toll 2* (TLR2) (Melin y Efstratiou., 2013; Henneke y cols., 2014)

Otros antígenos proteicos presentes en la superficie de SGB son considerados mejores candidatos para el desarrollo de una vacuna, ya que son altamente conservadas y no son específicas de un serotipo. Anticuerpos dirigidos contra estas proteínas pueden interferir con los factores de virulencia de SGB. Algunos ejemplos son: (1) La C5a peptidasa que inactiva el componente C5a del complemento, un importante

quimioatrayente de neutrófilos; (2) La proteína SIP, la cual es compartida por todos los aislados de SGB y ha mostrado una potente respuesta inmunológica en modelos animales (Brodeur y cols., 2000).

6- Proteína SIP

Un *screening* de inmunoblot para proteínas comunes de las cepas de SGB identificó a SIP (*Surface immunogenic protein*) como un agente potencial para generar inmunogenicidad contra los 10 serotipos (Brodeur y cols, 2000).

SIP es una proteína de aproximadamente 53 kD compuesta por 434 residuos de aminoácidos (Figura 2) codificados por un marco abierto de 1305 nucleótidos. Se ha establecido que el gen que codifica para esta molécula (*sip*) se encuentra altamente conservado en todos los serotipos de SGB (Brodeur y cols. 2000).

FIGURA 2

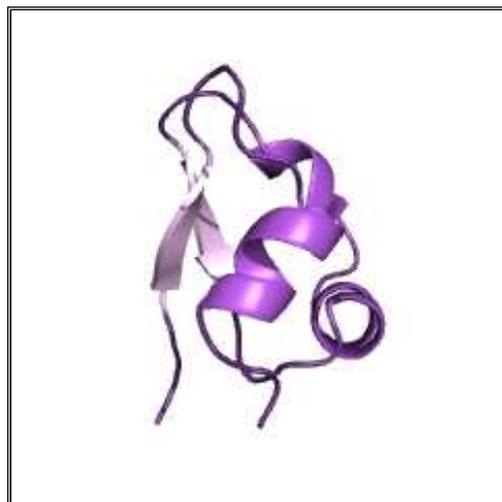
Secuencia de aminoácidos de la proteína SIP: En el cuadro se muestra la secuencia completa de aminoácidos de la proteína SIP desde su extremo N-terminal hasta su extremo C-terminal. En verde se destacan los 25 aminoácidos correspondientes al péptido señal y en rosado se destacan los aminoácidos que componen el LysM (Fuente: www.uniprot.org)

10	20	30	40	50
MKMNKKVLLT	STMAASLLSV	ASVQAQETDT	TWTARTVSEV	KADLVKQDNK
60	70	80	90	100
SSYTVKYGDT	LSVISEAMSI	DMNVLAKINN	IADINLIYPE	TTLTVTYDQK
110	120	130	140	150
SHTATSMKIE	TPATNAAGQT	TATVDLKTNQ	VSVADQKVSL	NTISEGMTPE
160	170	180	190	200
AATTIVSPMK	TYSSAPALKS	KEVLAQEQAV	SQAAANEQVS	PAPVKSITSE
210	220	230	240	250
VPAAKEEVKP	TQTSVSQSTT	VSPASVAAET	PAPVAKVAPV	RTVAAPRVAS
260	270	280	290	300
VKVVTPKVET	GASPEHVSAP	AVPVTTTSPA	TDSKLQATEV	KSVPVQAQKAP
310	320	330	340	350
TATPVAQPAS	TTNAVAAHPE	NAGLQPHVAA	YKEKVASTYG	VNEFSTYRAG
360	370	380	390	400
DPGDHGKGLA	VDFIVGTNQA	LGNKVAQYST	QNMAANNISY	VIWQQKFYSN
410	420	430		
TNSIYGPAANT	WNAMPDRGGV	TANHYDHVHV	SFNK	

En el extremo N-terminal SIP contiene un péptido señal de 25 aminoácidos el cual es escindido en la proteína madura. Esto indica que esta proteína es exportada fuera de la célula, donde puede asociarse con la pared celular de la bacteria y ser accesible a anticuerpos específicos (Brodeur y cols., 2000; Rioux y cols, 2001). Un análisis *in silico* (PSI-BLAST) realizado por Vidová y cols. (2009) indicó la presencia de un motivo Lisina (LysM) constituido por 45 aminoácidos aproximadamente, el cual está presente también en una amplia variedad de enzimas involucradas en la degradación de la pared celular de bacterias. Este motivo tiene una estructura secundaria del tipo “beta-alfa-alfa-beta” donde las 2 hélices alfa se ubican juntas a un costado de una estructura “hoja beta antiparalela” (Figura 3) (Rost y cols., 2004; Bennett-Lovsey y cols., 2008; Vidová y cols., 2009). El anclaje de varias proteínas a la pared celular de bacterias gram positivas ocurre a través del LysM, el cual se une con gran afinidad a peptidoglicano. Proteínas que contienen el LysM pueden distribuirse aleatoriamente en la superficie celular o pueden localizarse en regiones específicas como el septo (Scott y Barret, 2006).

FIGURA 3

Estructura tridimensional de un LysM: La figura representa la estructura tridimensional de un LysM de *E. coli*. (Fuente: Protein Data Bank <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)



Existe numerosa evidencia que apoya el uso de la proteína SIP como una eficiente vacuna para la infección con SGB: (1) Brodeur y cols. (2000) inmunizaron ratones CD-1 con la proteína SIP recombinante purificada y notaron una fuerte respuesta inmune humoral con anticuerpos reactivos contra la proteína SIP recombinante y contra la proteína SIP nativa de todas las cepas de SGB; (2) Rioux y cols. (2001) establecieron que SIP es considerablemente propenso a iniciar reacción inmune protectora contra infección letal con SGB de todos los serotipos, (3) Manning y cols. (2006) Evidenciaron la transferencia de anticuerpos desde ratonas preñadas a sus fetos y que estos anticuerpos específicos persisten por al menos 43 días y (4) estudios en humanos demostraron que naturalmente se producen anticuerpos anti-SIP en madres colonizadas.

7- Inmunización mucosal

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el uso de agujas y jeringas es el método de más usado para la administración intramuscular y subcutánea de vacunas. A pesar de ser un procedimiento de rutina se han descrito una serie de limitaciones: fobia y estrés en niños y adultos; daños tisulares en el sitio de punción y contagio con VIH y hepatitis B debido a la reutilización del material (Mitragotri, 2005). Otra de las limitantes de las vacunas administradas por vía parenteral es que sólo se ha observado inducción de inmunidad a nivel sistémico y una débil respuesta a nivel mucosal, específicamente en la secreción de inmunoglobulina A (IgA), lo que las hace menos efectivas contra infecciones en las superficies mucosas (Kumar y cols., 2016), siendo estas el principal portal de entrada de patógenos al organismo (Holmgren y Czerkinsky 2005).

Los tractos reproductivo, respiratorio y gastrointestinal al estar en contacto permanente con el medio ambiente están constantemente expuestos a microorganismos, tales como, virus, bacterias, hongos y parásitos. Por esta razón, el sistema inmune mucosal cuenta con mecanismos innatos y adaptativos especializados que contemplan el 80% de los inmunocitos del organismo para la protección contra infecciones.

Una vacuna administrada directamente en una superficie mucosa podría conferir inmunidad celular y humoral local, en otras membranas mucosales y eventualmente inducir inmunidad sistémica (Kozlowsky y cols.,1997; Holmgren y Czerkinsky 2005).

a) Inmunización oral

Diversos estudios evidenciaron una respuesta inmune humoral en intestino, glándulas salivales y mamarias, y en secreciones vaginales al inmunizar animales oralmente (Cui y cols., 1991; Srinivasan, 1995). Por esta razón, la vacunación oral surge como una prometedora alternativa para la prevención del contagio de enfermedades de transmisión sexual.

El potencial de la inmunización oral ha sido extensamente evaluado y demostrado en modelos animales. En humanos solo se han aprobado vacunas orales basadas en microorganismos vivos atenuados para polio, tifus y cólera (Hickey y cols., 2010).

A pesar de las múltiples ventajas que ofrece la inmunización oral (Tabla 2), este método continúa siendo un gran desafío para la comunidad científica, principalmente por el limitado conocimiento que se dispone de la inmunidad de las mucosas y por la incapacidad de determinar la cantidad de antígeno que ingresa al organismo, luego de la exposición al ambiente ácido y rico en enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal (Lavelle y O'Hagan, 2006; Silin y cols., 2007).

TABLA 2

Resumen de las principales ventajas de la inmunización oral

Ventaja	Referencia
Libre de agujas, útil para programas de inmunización masivos	Hickey y cols., 2010
No requiere la purificación extensiva del antígeno	Neutra y Kozlowski, 2006
Bajo costo de producción y fácil administración	Silin y cols., 2007
No requiere de dispositivos complejos	Mitragotri, 2005

8- Evaluación de respuesta inmune de un prototipo de vacuna

Uno de los principales objetivos del desarrollo de una vacuna es generar una respuesta inmune protectora capaz de impedir el contagio con un microorganismo infeccioso. Para ello es necesaria la acción orquestada de múltiples componentes del sistema inmune innato y adaptativo:

a) Análisis de la producción de anticuerpos por los Linfocitos B

Una importante característica de la respuesta inmune mucosal adaptativa es la producción local y sistémica de IgA. La síntesis de IgA es considerado el mecanismo humoral de defensa predominante en las superficies mucosas (Holmgren y Czerkinsky 2005) y su principal rol es prevenir el contacto directo entre patógenos y las superficies mucosas, proceso llamado 'exclusión inmune'.

La síntesis local de IgG también puede ocurrir en tejidos mucosales luego de la administración de un antígeno o vacuna en superficies mucosas (Kozlowski y cols., 1997). La IgG es susceptible a la degradación proteolítica, sin embargo, se ha encontrado que la IgG producida localmente o la proveniente del suero puede neutralizar patógenos que entran en la mucosa y previenen su diseminación sistémica (Neutra y Kozlowski, 2006).

Los niveles de IgG e IgA específicos contra un antígeno en suero y en secreciones mucosales pueden ser cuantificados mediante la técnica de ELISA.

b) Métodos para estudiar las respuestas de los Linfocitos T

Los linfocitos T vírgenes permanecen en órganos linfáticos secundarios, donde pueden entrar en contacto con antígenos para activarse y diferenciarse en linfocitos T efectores de la inmunidad celular (CD4+ y CD8+). Los linfocitos T CD4+ pueden a su vez diferenciarse en subpoblaciones de linfocitos T_{H1}, T_{H2} y T_{H17} con diferentes funciones efectoras según señales procedentes del receptor de los linfocitos T, citoquinas y factores de transcripción. Se induce la expresión del factor de transcripción T-bet en linfocitos T CD4+ vírgenes cuando reconocen al antígeno y son expuestos a INF- γ , diferenciándose en linfocitos T_{H1} cuya principal función es estimular la función microbicida de los fagocitos (microorganismos intracelulares). La diferenciación a linfocitos T_{H2} se produce en respuesta a señales provenientes del receptor de linfocitos T, la citoquina IL-4 y los factores

de transcripción GATA-3 y STAT-6 y su función efectora se relaciona con patógenos extracelulares. Los linfocitos T_H17 dependen del factor de transcripción ROR γ T y son particularmente eficaces contra infecciones por hongos y bacterias extracelulares mediante el reclutamiento de neutrófilos por IL-17.

Tras la inmunización con un antígeno, se pueden extraer poblaciones policlonales de linfocitos T a partir de la sangre y de los órganos linfáticos periféricos. La inmunización permite multiplicar el número de linfocitos específicos frente al antígeno, los cuales posteriormente pueden reestimularse *in vitro*.

Mediante citometría de flujo es posible analizar el fenotipo de poblaciones de linfocitos T efectores (cooperadores y citotóxicos) presentes en el bazo de animales inmunizados según la presencia de las moléculas CD3, CD4 y CD8. Por otra parte, mediante CBA es posible cuantificar citoquinas específicas relacionadas con las subpoblaciones T_H1, T_H2 y T_H17 de los linfocitos TCD4⁺ en sobrenadantes de cultivos de esplenocitos reestimulados (Tabla 3). Dicha información puede contrastarse con la evaluación de los niveles de expresión de los factores de transcripción T-bet y GATA-3 mediante q-PCR.

TABLA 3

Principales citoquinas asociadas a las subpoblaciones T_H1, T_H2 y T_H17 de los linfocitos TCD4⁺

Citoquina	Principal función	Subpoblación T CD4⁺
IL-2	Factor de crecimiento, supervivencia y diferenciación de linfocitos T	Treg.
IL-4	Diferenciación de linfocitos T CD4 ⁺ a T _H 2	T _H 2
IL-6	Estimula la producción de neutrófilos y estimula el crecimiento de linfocitos B	T _H 2
IFN-γ	Activación de macrófagos y diferenciación de linfocitos T CD4 ⁺ a T _H 1	T _H 1
TNF	Estimula la atracción de neutrófilos y monocitos a los sitios de infección	T _H 1
IL-17A	Induce reacciones inflamatorias ricas en neutrófilos	T _H 17
IL-10	Inhibidor de macrófagos y células dendríticas	T _H 1

c) Evaluación de infiltración de células del sistema inmune hacia el foco de infección

El tracto genital femenino, a pesar de ser el portal de entrada de infecciones sexualmente transmitidas es un tejido restrictivo para la migración de células del sistema inmune (Shin e Iwasaki, 2012).

Idealmente, el prototipo de vacuna contra SGB debe ser capaz de inducir la infiltración hacia el tracto genitourinario de células fagocíticas capaces de identificar, ingerir y destruir al microorganismo.

Mediante citometría de flujo de células del tracto genitouterino es posible evaluar la infiltración de linfocitos T (CD3, CD4 y CD8), células dendríticas (CD11c y CD86) y polimorfonucleares (CD11b y Ly-6G).

II. HIPOTESIS

En modelo murino, la vacuna oral en base a la proteína inmunológica de superficie (SIP) tiene un efecto protector contra la colonización de *Streptococcus agalactiae* en el tracto genitourinario y en el sistema nervioso central.

III. OBJETIVOS

1- Objetivo general

Evaluar la respuesta inmune protectora contra la colonización de *Streptococcus agalactiae* del tracto genitourinario en ratones vacunados oralmente con la proteína inmunológica de superficie (SIP).

2- Objetivos específicos

- a) Expresar y purificar la proteína SIP recombinante.
- b) Desarrollar un modelo de infección de SGB reproducible en tracto genitourinario de ratones C57BL/6
- c) Evaluar la respuesta inmune protectora de la colonización por SGB del tracto genitourinario de ratones vacunados oralmente con la proteína SIP
- d) Estudiar la interacción de SGB y la barrera hematoencefálica humana

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1- Obtención de la proteína SIP recombinante

a) Expresión y purificación de la proteína SIP

Se inoculó una colonia de bacterias *E. coli* BL21 Codon Plus previamente transformadas con el plásmido pET21a-sip en un matraz Erlenmeyer con 100 ml de medio Luria Bertani (LB) suplementado con Ampicilina (100 µg/ml), Cloranfenicol (34 µg/ml), Estreptomicina (75 µg/ml) y Glucosa (40% v/v). Se incubó toda la noche con agitación de 220 rpm a 37°C.

Al siguiente día, se tomaron 2 alícuotas de 5 ml y se inocularon en matraces Erlenmeyer de 2 L conteniendo 500 ml de medio LB suplementado con Glucosa al 40% v/v y se incubaron con agitación de 220 rpm a 37°C hasta OD₆₀₀ de 0,5. La expresión de la proteína SIP recombinante (rSIP) se indujo con IPTG (Invitrogen) a una concentración de 0,8 mM durante 2 horas con agitación de 220 rpm a 37°C. Luego, se centrifugó los cultivos inducidos a 6000 x g y 4°C durante 10 min.

Por cada gramo de sedimento bacteriano se adicionó 8 ml de tampón Nativo 1X (0,5 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0) y se resuspendió. Se adicionó 8 mg de lisozima (Sigma-aldrich) y se incubó en hielo 30 min. Se sonicó a alta intensidad en 5 ciclos de 10 seg. en hielo, se adicionó 80 µg de DNAsa (Invitrogen) y se incubó 15 min en hielo. Luego, se centrifugó a 3000 x g por 15 min y se recuperó el sobrenadante.

Se cargó 8 ml de sobrenadante del lisado bacteriano en una columna con resina ProBond quelante de Níquel de Invitrogen, previamente empacada y lavada con tampón nativo 1X. Se incubó 40 min. agitando suavemente y se lavó 3 veces con 8 ml de buffer de lavado (Buffer nativo 1X, 20 mM Imidazol). La proteína rSIP se eluyó con 10 ml de buffer de elusión (Buffer nativo 1X, 250 mM de Imidazol). Las fracciones colectadas fueron analizadas mediante SDS-PAGE de 12,5%, dializadas utilizando una membrana microporosa (modelo Spectra/Por[®],Spectrumlabs) toda la noche a 4°C y concentradas con polietilenglicol (Sigma).

La cantidad de proteína total purificada se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

b) Identificación de la proteína rSIP

i) Western Blot

Se cargó una alícuota de la proteína rSIP (40 µg) purificada y concentrada en un gel de poliacrilamida de 12,5%, se corrió a 200 V durante 90 min y luego se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada toda la noche con PBS-BSA 5% a 4°C, lavada 3 veces con PBS-Tween 0,05%, 3 veces con PBS1X e incubada durante 1 hr. a temperatura ambiente con un suero policlonal de conejo anti-rSIP (suero obtenido en la Sección de Biotecnología del ISPCH) en una dilución 1:1000 en PBS-BSA1%. Se lavó nuevamente la membrana con PBS-Tween 0,05% y PBS y se incubó con anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a la enzima fosfatasa alcalina (Sigma) en una dilución 1:1000 en PBS-BSA1% 1 hr. a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó la membrana con PBS-Tween 0,05% y PBS y se reveló en oscuridad con el sustrato para fosfatasa alcalina B.C.I.P/N.B.T (Calbiochem).

ii) Espectrometría de Masas

Se cargó 3 alícuotas de la proteína rSIP (40 µg) purificada y concentrada en un gel de poliacrilamida de 12,5%, se corrió a 200 V durante 90 min y se tiñó con Azul de Coomassie. Se extrajo cuidadosamente las bandas de 53 kD aproximadamente evitando la contaminación con colágeno y se analizó en el Laboratorio de Espectrometría de Masas de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile mediante el procedimiento descrito a continuación:

Las bandas teñidas mediante azul de coomassie se lavaron 3 veces con agua nanopura durante 30 min a temperatura ambiente, luego la tinción azul de coomassie se removió mediante la utilización de bicarbonato de amonio 200 mM preparado en acetonitrilo 50% v/v durante 30 min a 37°C. A continuación las bandas se incubaron con ditiotreitól 10 mM preparado en bicarbonato de amonio 200 mM durante 30 min a 37°C. Luego se alquilaron con yodoacetamida 55 mM preparada en bicarbonato de amonio 200 mM durante 30 min a

37°C (en oscuridad). Las bandas se deshidrataron con acetonitrilo y se secaron a temperatura ambiente durante 10 min y luego se colocaron en hielo. A cada banda se agregó 8 µL de tampón de proteólisis bicarbonato de amonio 50 mM/acetonitrilo 10% v/v que contenía 0.042 µg/µL de tripsina (Promega Corp., WI-USA) y se incubó en hielo durante 45 min. Luego, se adicionó tampón de proteólisis (sin tripsina) de modo de sumergir completamente cada banda y se incubó durante toda la noche a 37°C. Se recuperaron los proteolizados (sobrenadantes) y sobre las bandas se realizaron dos extracciones con acetonitrilo 60% v/v y ácido fórmico 0.1% v/v y una extracción con acetonitrilo. Los sobrenadantes y extractos de cada muestra se combinaron y se llevaron a sequedad a temperatura ambiente en SpeedVac (Savant Instruments Inc., NY-USA). Las muestras se resuspendieron en 12 µL de ácido fórmico 0.1% v/v y metanol 3% v/v.

Para la obtención de espectros se mezcló 1 µL de cada muestra con 1 µL de la matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (preparada a una concentración de 10 mg/mL en acetonitrilo 50%v/v y ácido fórmico 0.1% v/v) en una placa porta muestra micro scout (Bruker Daltonics Inc., MA-USA).

La adquisición de espectros de masas se realizó en un equipo MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics Inc., MA-USA) en modo ion positivo mediante detección por reflexión. Previo a la obtención de los espectros se realizó una calibración del equipo con un estándar externo correspondiente a una mezcla de péptidos de masas 1000-3000 Da. Para el control del espectrómetro se utilizó el programa flexControl 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania).

Los espectros finales corresponden a la suma de 15 barridos de 30 impactos de láser (450 impactos de láser en total) aplicados en diferentes puntos tomados al azar de cada muestra depositada en la placa porta muestra.

Para el análisis de los espectros se utilizó el programa mMass versión 5.5.0 [Strohalm et al., 2008; Strohalm et al., 2010; Niedermeyer y Strohalm, 2012]. Para la detección de las señales m/z monoisotópicas se utilizó el algoritmo MALDI-TOF Peptides utilizando los parámetros por defecto. Luego se realizó una calibración interna utilizando la opción In-Gel (Trypsin) – MALDI Pos Mo. Las señales detectadas se utilizaron para la identificación de las muestras a través de la herramienta Mascot PMF de mMass, considerando las siguientes restricciones: base de datos, NCBI; enzima de proteólisis, tripsina; pérdida de cortes, 1;

modificación fija, carbamidometilación (alquilación con yodoacetamida); modificación variable, oxidación de metionina; masa, monoisotópica; tolerancia de masa, 0.1-0.3 Da. Se realizaron búsquedas sin restricción por taxonomía (All entries) y restringidas a Firmicutes.

2- Desarrollo de un modelo de infección intravaginal por SGB en ratones C57BL/6

a) Adaptación de una cepa de SGB III al modelo animal

Un aislado nacional de SGB de serotipo III proveniente de un cuadro invasivo, gentilmente facilitado por la Sección de Microbiología del ISPCH fue crecido en medio Todd Hewitt estéril suplementado con Ácido Nalidíxico hasta OD₆₀₀ de 0,6. Una alícuota de 1ml del cultivo se centrifugó a 10.000 rpm durante 1min. y se resuspendió en 1ml de Gelatina (Sigma-aldrich) al 5% *p/v*. Se inoculó 100 µL de esta suspensión en el tracto genitourinario de 6 ratones hembra C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad provenientes del Bioterio del ISPCH. Los animales fueron mantenidos con suministro de agua y comida *ab libitum* durante 16 días, luego fueron anestesiados con Ketamina y Xilacina a una dosis de 100 mg/Kg y 50 mg/Kg, respectivamente y se les introdujo una tórula de Alginato de Calcio en el tracto genitourinario la cual fue sometida a análisis microbiológico (β -hemólisis, test de CAMP, siembra en agar granada y cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)).

La cepa de SGB III recuperada e identificada fue respaldada y crecida en las condiciones anteriormente descritas y se realizó otro pasaje en el tracto genitouterino de ratones hembra C57BL/6. Transcurridos 16 días, los animales fueron anestesiados y muestreados como se describió previamente. La cepa recuperada, fue sometida a análisis microbiológico, subtipificación molecular mediante MLST (Jones y cols., 2003) y secuenciación del rRNA 16S en un analizador ABI PRISM 310 de Applied Biosystems.

b) Modelo de infección intravaginal

En este modelo se utilizaron 10 ratones hembras C57BL6 de 6 a 8 semanas de edad, los cuales fueron distribuidos en 3 grupos experimentales: Control cero, control gelatina e infectados con SGB (Tabla 4) (Figura 4). Los animales fueron tratados con gentamicina a

una dosis de 100 mg/Kg durante 5 días, con el fin de disminuir la flora comensal vaginal y recibieron una dosis de 0,1 mg de 17β-estradiol el cuarto día del modelo para sincronizar el ciclo estral en estro. El quinto día del modelo, los animales fueron inoculados intravaginalmente con 100 μL de Gelatina 5% *p/v* o con 10⁸ UFC de SGB III adaptada al modelo animal en Gelatina al 5% *p/v*. Los días 8, 10, 12, 15, 17 y 19 se tomaron muestras de torulado vaginal de los animales y se realizó análisis microbiológico (β-hemólisis, test de CAMP, siembra en agar granada y cuantificación de UFC). Durante los 19 días que duró el modelo, los animales fueron pesados diariamente y se les realizó un análisis conductual según parámetros establecidos por CONICYT (2009). El día 19, día que finalizó el modelo, se extrajo sangre desde el seno retroorbital para la determinación de anticuerpos mediante ELISA.

Los procedimientos descritos anteriormente que involucran el uso de animales de experimentación están aprobados por el CICUAL del ISPCH.

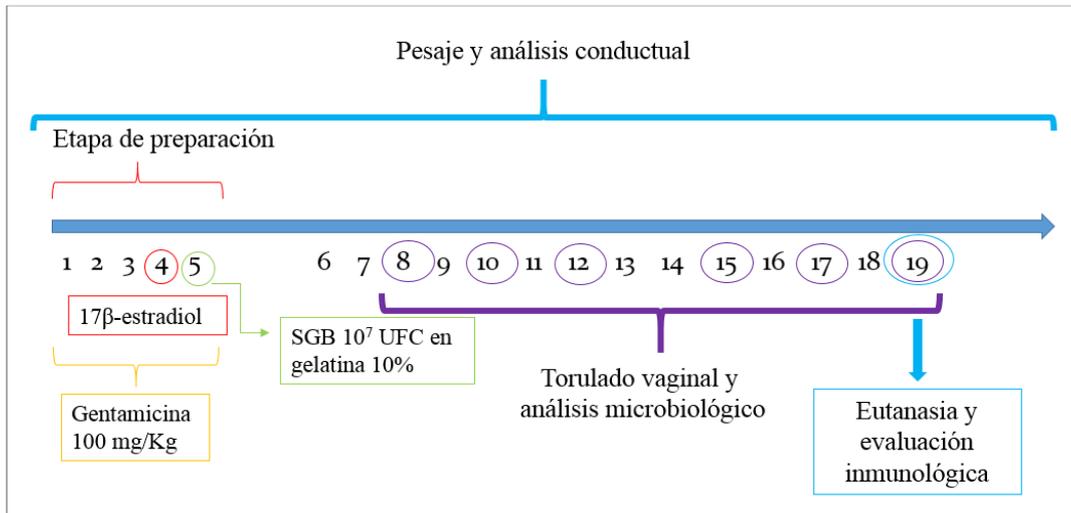
TABLA 4

Distribución de animales pertenecientes al modelo de infección intravaginal, inóculo intravaginal y tratamiento farmacológico administrado.

Grupo	n	Inóculo intravaginal	Tratamiento antibiótico	Sincronización de celo
Control cero	1	-	-	-
Control Gelatina	3	100μL gelatina	100 mg/Kg	0,1mg 17β-estradiol
Infectados SGB	6	10 ⁸ UFC SGB en 100μL gelatina	100mg/Kg	0,1 mg 17β-estradiol

FIGURA 4

Esquema de procedimientos realizados a los animales pertenecientes al modelo de infección intravaginal.



3- Evaluación de la respuesta inmune protectora de la colonización por SGB del tracto genitourinario de ratones vacunados oralmente con la proteína rSIP

a) Modelo de inmunización

El modelo de inmunización aplicado fue modificado de Vásquez y cols., 2014. Este modelo se compone de 30 ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad, los cuales fueron aleatoriamente distribuidos en 6 grupos experimentales de 5 individuos cada uno (Tabla 5). Los días 1, 3, 5, 19 y 26 los animales fueron mantenidos 5 horas en ayuno y se les suministró *boosters* de 100 µL de una vacuna administrada vía oral mediante la utilización de una sonda orogástrica. Desde el día 29 hasta el día 33 los animales recibieron una dosis diaria de gentamicina de 100 mg/kg y una dosis de 0,1 mg de 17β-Estradiol el día 32 del modelo. El día 33 se inóculo 10⁸ UFC de SGB en gelatina al 10% en el tracto genitourinario de todos los animales, a excepción de los que componen los grupos II y VII.

Este modelo finalizó el día 38; día en el cual los animales fueron anestesiados y eutanasiados por dislocación cervical; obteniendo muestras de hisopado vaginal, de sangre, bazo y fecas para la evaluación inmunológica.

TABLA 5

Detalle de grupos, formulación - dosis y tratamientos aplicados a los animales del modelo de inmunización oral

Grupo	Nombre	Formulación	Boosters	Desafío con SGB	Evaluación inmunológica
I	Sin inmunizar	-	-	✓	✓
II	Basal	-	-	✓	✓
III	PBS	PBS 1x	✓	✓	✓
IV	SIP	10 µg/raton	✓	✓	✓
V	ALUM	200 µg/raton	✓	✓	✓
VI	SIP+ALUM	10 µg/raton de SIP + 200 µg/raton de ALUM	✓	✓	✓

b) Evaluación inmunológica

i) Preparación del suero

El primer y el último día del modelo los animales fueron anestesiados con Ketamina (100mg/Kg) / Xilacina (50mg/Kg) y se les introdujo un capilar en el seno retroorbital para la obtención de muestras de sangre, las cuales fueron incubadas en un baño termorregulado a 37°C durante 30 minutos. Se separó el plasma y se centrifugó a 4000 rpm durante 8 min. a 4°C y el suero obtenido se almacenó a -20°C para su posterior análisis mediante ELISA.

ii) ELISA para la detección de anticuerpos IgG anti-rSIP en suero

Los detección de anticuerpos IgG séricos se llevó a cabo mediante ELISA indirecto. Para ello se activó una placa Nunc de 96 pocillos con 1µg de la proteína rSIP por pocillo en un volumen de 100µL toda la noche a 4°C. Luego, se lavó la placa 3 veces con PBS-Tween 0,05% y 2 veces con PBS1X y se bloqueó durante una hora a 37°C con PSS-BSA3%. Sé lavó nuevamente la placa y se agregó las muestras de suero por triplicado en diluciones 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 y 1/3200 en PBS-BSA1%, las cuales se incubaron 1 hr. a 37°C. Luego de otro ciclo de lavado, se agregó el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a Fosfatasa alcalina en una dilución 1:1000 en PBS-BSA1% y se incubó durante 1hr. a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavó la placa y se agregó 200 µL de buffer sustrato *p*-Nitrofenilfosfato (Sigma) a una concentración de 0,33mg/ml disuelto en buffer 1M de dietanolamina con 0,5mM de MgCl₂ y se incubó 30 min. en oscuridad. La reacción se detuvo con 50µL de NaOH 3M y se leyó absorbancia a 405nm en lector de placas de ELISA Spectro Star Nano (BMG Labtech).

iii) ELISA para la detección de anticuerpos IgA anti-rSIP en suero

Los detección de anticuerpos IgA séricos se llevó a cabo mediante ELISA indirecto. Para ello se activó una placa Nunc de 96 pocillos con 1µg de la proteína rSIP por pocillo en un volumen de 100µL toda la noche a 4°C. Luego, se lavó la placa 3 veces con PBS-Tween 0,05% y 2 veces con PBS1X y se bloqueó durante una hora a 37°C con PSS-BSA3%. Sé lavó nuevamente la placa y se agregó las muestras de suero por triplicado en diluciones 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 y 1/1600 en PBS-BSA1%, las cuales se incubaron 1 hr. a 37°C. Luego de otro ciclo de lavado, se agregó el anticuerpo anti-IgA de ratón conjugado a fosfatasa alcalina en una dilución 1:1000 en PBS-BSA1% y se incubó durante 1hr. a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavó la placa y se agregó 200 µL de buffer sustrato *p*-Nitrofenilfosfato (Sigma) a una concentración de 0,33mg/ml disuelto en buffer 1M de dietanolamina con 0,5mM de MgCl₂ y se incubó 30 min. en oscuridad. La reacción se detuvo con 50µL de NaOH 3M y se leyó absorbancia a 405nm en lector de placas de ELISA Spectro Star Nano (BMG Labtech).

iv) Extracción de tracto genitourinario

Se extrajo asépticamente el tracto genitouterino de los animales pertenecientes al modelo de inmunización y se depositaron en pacas de cultivo de 6 pocillos con medio RPMI 1640 suplementado con Bicarbonato de Sodio, HEPES, Penicilina/Estreptomicina, aminoácidos no esenciales, suero fetal bovino, β-Mercaptoetanol y Piruvato. Usando tijeras quirúrgicas se cortó el tejido en pequeños fragmentos de 1x1 mm, se agregó Colagenasa (MPBIO) y se incubó en shacker a 37°C y 750 rpm durante 2 hrs. Transcurrido el tiempo de incubación se pasó los fragmentos digeridos por un filtro para células (*Cell Strainer*) (Falcon) de 45µM y se centrifugó a 1800 rpm durante 5 min. El pellet celular se lavó con 30 ml de PBS-FBS y se centrifugó a 1800 rpm por 5 min. Finalmente, las células fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 suplementado y contadas en cámara de Neubauer con Azul de Tripán (Strober, 2001).

v) Extracción de bazo

Se extrajo asépticamente el bazo de los animales pertenecientes al modelo inmunización y se depositaron en placas de cultivo de 6 pocillos con medio RPMI 1640

suplementado frío. Los órganos fueron perfundidos con jeringas de tuberculina de 1 ml y macerados con portaobjetos esmerilados. Luego de centrifugar a 400 x g durante 6 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lisaron los glóbulos rojos presentes en el sedimento con 3 ml de ACK (NH₄Cl, KHCO₃, EDTA di-sódico), agitando suavemente por inversión. Se centrifugó a 1800 rpm durante 6 min a 4°C, se lavó 2 veces el pellet con RPMI 1640 suplementado, se centrifugó y se resuspendió el pellet celular en medio RPMI 1640 suplementado. Finalmente, y se contaron las células obtenidas en cámara de Neubauer con Azul de Tripán (Strober, 2001).

vi) **Inmunofenotipificación de células de bazo y de tracto genitourinario**

Una vez contadas las células de bazo y tracto genitourinario se alicuotaron en tubos Eppendorf (10⁶ cels. en 100 µL) y se marcaron con 0,6 µL de anticuerpos BD Pharmingen marcados con fluorosforos según como se indica en la tabla 6. Luego de 30 min de incubación en oscuridad se agregó 1ml de PBS-BSA1% y se centrifugó a 400 x g por 5 min a 4°C. Finalmente, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 200 µL de PBS con Formalina 1% y se almacenaron a 4% en oscuridad hasta ser analizadas en un citómetro de flujo BD FACSCANTO II.

TABLA 6

Panel de inmunofenotipificación de muestras de bazo y tracto genitourinario

Órgano	Población celular	Marcadores
Bazo (10 ⁶ cels/100 µL)	Linfocitos T	0,6 µL anti-CD3 APC 0,6 µL anti-CD4 PE 0,6 µL anti-CD8 FITC
Tracto genitourinario (10 ⁶ cels/100 µL)	Neutrófilos	0,6 µL anti-CD11b FITC 0,6 µL anti Ly-6G APC

vii) **Cultivo de esplenocitos**

Células de bazo obtenidas en la sección 'v' fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos (2x10⁶ cels/pocillo) y fueron estimuladas con 1µg de rSIP e incubadas en estufa con suministro de CO₂ durante 72 horas a 37°C. Como control negativo se estimuló células

de bazo con la proteína recombinante PSA y como control positivo se estimuló con anticuerpos anti-CD3 (100 ng) y anti-CD28 (20µg) (BioLegend).

viii) Cuantificación de citoquinas en sobrenadantes de cultivos de esplenocitos

Se colectó los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos de la sección 'vii' y se analizaron con el kit de citoquinas BD Cytometric Bead Array (CBA) Th1/Th2/Th17 para la cuantificación de IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF, IL-17A e IL-10 según instrucciones del fabricante.

Brevemente, se reconstituyeron los estándares liofilizados y de diluyeron serialmente (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256). Luego se mezclaron los *beads* o esferas de captura recubiertos con anticuerpos específicos para cada citoquina con la sobrenadantes de esplenocitos o con los estándares y posteriormente con el reactivo de detección que contiene anticuerpos conjugados con PE. Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACS VERSE utilizando el software FCAP array

ix) Evaluación de factores de transcripción en esplenocitos en cultivo

Células de bazo en cultivo mencionadas en la sección 'vii' se centrifugaron a 12000 x g durante 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante, se les agregó 600 µL de TRIZOL® y se incubó a temperatura ambiente 5 min. Se agregó 120 µL de cloroformo y se agitó enérgicamente por 15 segundos, luego se incubó a temperatura ambiente por 3 min y se centrifugó a 12000 x g por 15 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se mezcló con 600 µL de isopropanol al 100% y se incubó 10 min a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 12000 x g por 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet con 600 µL de etanol 75%, se resuspendió agitando con vortex y se centrifugó a 7500 x g por 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se secó y se resuspendió en 30 µL de agua libre de RNAsa.

El RNA obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría con un equipo Thermo Scientific, modelo Evolution 60 y se almacenó a -80°C.

Se sintetizó cDNA a partir del RNA extraído mediante el kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) siguiendo instrucciones del fabricante, el cual se utilizó como molde para la amplificación de los genes t-bet, GATA-3 mediante RT-PCR. El gen β -

actina fue amplificado como *housekeeping*. Las condiciones de amplificación se enlistan en la tabla 7.

TABLA 7

Detalle de secuencia de partidores, tamaño del fragmento amplificado y condiciones de Amplificación para los genes β -actina, GATA-3 y t-bet.

Gen amplificado	Secuencia partidores	Tamaño fragmento amplificado	T° annealing	Conc. Partidores (mM)
β- actina	F 5'-AGCTGCGTTTTACACCCTTT-3' R 5'-AAGCCATGCCAATGTTGTCT-3'	81	60	500
t-bet	F 5'-GCTGAATTGGAAGGTGCCCACTAA-3' R 5'-TATACAGGGAAGGGATGGGGAAGA-3'	83	62	500
GATA3	F 5'-AAGAAAGGCATGAAGGACGC-3' R 5'-GTGTGCCCATTTGGACATCA-3'	101	60	400

x) Análisis microbiológico

Las tómulas de Alginato de Calcio introducidas en el tracto genitouterino de los animales del modelo de inmunización se sumergieron en 300 μ L medio Todd Hewitt suplementado con Ácido Nalidíxico y se agitó en vortex durante 30 seg sin producir espuma. Una alícuota de 50 μ L se sembró en agar tripticasa de soya con 5% de sangre de cordero para la detección de colonias β -hemolíticas de SGB. Por otra parte, se sembró por agotamiento de estrías cada una de las muestras en agar granada (Biomérieux) para la detección de colonias de SGB de color naranja. Adicionalmente, la identidad de colonias β -hemolíticas se verificó mediante test de CAMP.

La cuantificación de UFC de SGB recuperadas en el tracto de animales inmunizados y de los grupos controles se realizó mediante dilución seriada de la muestra original y siembra homogénea en agar TS con 5% de sangre de cordero.

4- Estudio de la interacción de SGB y la barrera hematoencefálica humana

a) Cultivo de Células Endoteliales humanas

Las células endoteliales fueron obtenidas desde cordón umbilical perfundido con colagenasa II (2mg/ml). Las células fueron crecidas en botellas de cultivo recubiertas con gelatina al 0,2% en medio M199 suplementado con 20% de suero de ternero, 5% de suero humano inactivado por calor, 1% de Penicilina/Estreptomicina y 12ng/ml de factor de crecimiento de células endoteliales (Eugenin y Berman, 2003).

b) Cultivo de Astrocitos humanos

Los astrocitos fueron obtenidos a partir de tejido de sistema nervioso central fetal humano, el cual fue separado de las meninges y digerido con tripsina (0,25%) y DNasa (1%) por 1 hr a 37°C con agitación constante. La suspensión celular resultante se pasó a través de filtros de 250 y 150 μ m. Las células fueron sedimentadas y resuspendidas en medio DMEM con 25 mM de HEPES, 10% de suero fetal bovino, 1% Penicilina/Estreptomicina y 1% de aminoácidos no esenciales (Eugenin y Berman, 2003)

c) Interacción de SGB con células endoteliales humanas *in vitro*

Se cultivó células endoteliales humanas y se crecieron a un 80% de confluencia en placas de cultivo de 6 pocillos recubiertos con 0,2% de gelatina en medio M199 suplementado.

Por otra parte, se realizó un inóculo de SGB III en medio Todd Hewitt suplementado con ácido nalidíxico y se creció hasta OD₆₀₀ de 0,6. Una alícuota de 100 μ L del cultivo bacteriano se centrifugó a 1000 rpm durante 1 min y el pellet bacteriano se resuspendió en medio M199 suplementado. Se añadió 0,01 mg de FITC y la suspensión se incubó 60 min en shaker a 37°C.

Finalmente, se agregó una alícuota de 20 μ L de la suspensión bacteriana (SGB-FITC) a los cultivos de células endoteliales y se mantuvieron durante 24 en incubadora acoplada a un microscopio de fluorescencia a 37°C y 5% de CO₂.

d) Interacción de SGB con uniones estrechas de células endoteliales humanas

Se cultivaron células endoteliales humanas en botellas de 50 ml recubiertas de gelatina al 0,2% en medio M199 suplementado hasta 80-90% de confluencia y se expusieron a un inóculo de 50 μ L de SGB de OD₆₀₀ 0,6. Como control negativo, cultivos de células endoteliales fueron expuestos a 50 μ L de medio Todd Hewitt estéril. Transcurridas 1, 8 y 24 hrs de incubación una botella de células endoteliales desafiadas con SGB y una botella de células endoteliales control se lavaron con PBS1X, se agregó 300 μ L de buffer de solubilización con inhibidor de proteasas y se raspó con espátula (*scraper*). La concentración de proteína total presente en cada muestra determinó mediante el método de Bradford.

Se cargó 80 μ g de proteína en 4 geles de electroforesis de 4-20% (BioRad Mini-PROTEAN TGX) y se corrió a 80V durante 90 minutos. Luego, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa para la detección de las proteínas GAPDH, ZO-1, Ocludina y Claudina mediante Western blot.

e) Transmigración de células mononucleares a través de un modelo de barrera hematoencefálica *in vitro* expuesto a un inóculo de SGB

Para el montaje del modelo *in vitro* de barrera hematoencefálica humana (BHEH) se aspiró el medio de astrocitos en cultivo, se agregó tripsina (Gibco) y se incubó 15 min a 37°C. Se centrifugó la suspensión a 1000 rpm durante 5 min y el pellet se resuspendió en medio M199. El número de células presente en la muestra se determinó en cámara de Neubauer con Azul de Tripán (Strober, 2001).

Se agregó 3×10^5 astrocitos en la parte inferior de sistemas de migración (Transwell o inserts) provistos de una membrana porosa de 3 μ M previamente recubierta con 0,2% de gelatina. Cada 15 minutos y durante 5 horas se agregó medio M199 a 37°C para fijar las células a la membrana.

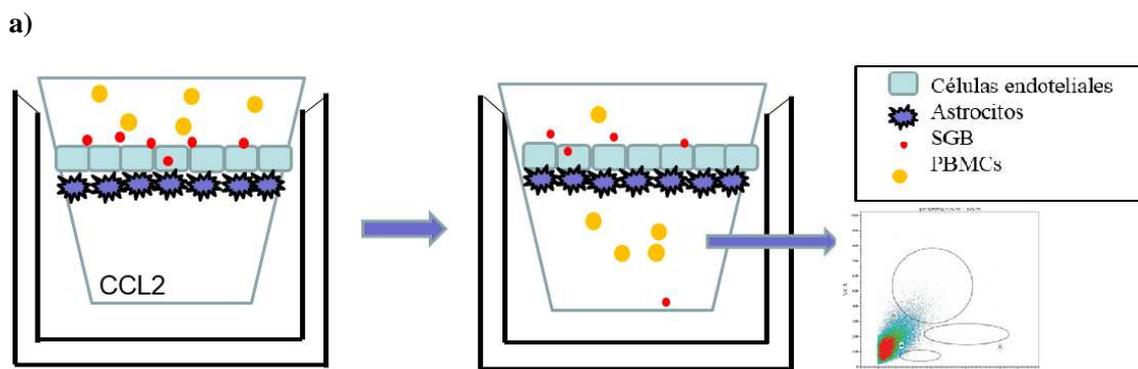
Transcurridas 5 hrs de incubación, se aspiró el medio de un cultivo de células endoteliales, se tripsinizó, centrifugó y se resuspendió el sedimento en medio M199 suplementado. El número de células presente en la muestra se determinó en cámara de Neubauer con Azul de Tripán (Strober, 2001).

Se agregó 1×10^4 células endoteliales en la parte superior de los ‘inserts’ con astrocitos y se transfirieron a una placa de 24 pocillos con 500 μ L de medio M199 suplementado. Los cultivos se incubaron durante 3 días para inducir la expresión de los transportadores Glut-1 y γ -glutamilttransferasa y para generar resistencia a la albúmina.

Transcurridos los 3 días de incubación, los ‘inserts’ fueron transferidos a una placa con 500 μ L de medio M199 bajo en suero y fueron expuestos a 3×10^5 células mononucleares de sangre periférica (CMSP), 100 ng de CCL2 y/o SGB durante 24 horas, según se indica en la figura 5.

FIGURA 5

Esquema ensayo de trans migración de células mononucleares de sangre periférica a través del modelo de barrera hematoencefálica *in vitro*: a) representación esquemática del modelo de barrera hematoencefálica *in vitro*: Co-cultivo de células endoteliales y astrocitos en lados opuestos de una membrana de 3 μ M. Se evaluó mediante citometría de flujo el número de CMSP capaces de trasmigrar en presencia de SGB b) Disposición de ‘inserts’ en una placa de cultivo de 24 pocillos.



b)

	1	2	3	4	5	6
A	Control	Control	Control	Control CCL2	Control CCL2	Control CCL2
B	SGB	SGB	SGB	SGB CCL2	SGB CCL2	SGB CCL2
C	CMSP	CMSP	CMSP	CMSP CCL2	CMSP CCL2	CMSP CCL2
D	CMSP SGB	CMSP SGB	CMSP SGB	CMSP SGB CCL2	CMSP SGB CCL2	CMSP SGB CCL2

Transcurridas 24 hrs de incubación, se colectó el medio de cultivo del compartimiento inferior de los 'inserts' y se analizó mediante citometría de flujo para el conteo de CMSP que transmigraron a través del modelo de BHEH.

Alternativamente, se realizó un análisis de permeabilización del modelo de BHEH. Para ello se lavó los 'inserts' con medio DMEM libre de Fenol red y se traspasaron a una nueva placa de cultivo de 24 pocillos con 400 μ L de medio DMEM libre de fenol red. Se agregó 200 μ L de BSA conjugada a Evans blue 0,45% en el compartimiento superior de los 'inserts', se incubó 30 min a 37°C y se midió absorbancia a 620nm del compartimiento inferior

5- Análisis estadístico

El análisis estadístico comparativo entre los resultados obtenidos fue realizado mediante ANOVA. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos (*), $p < 0,01$ muy significativos (**) y $p < 0,001$ altamente significativos (***)

V. RESULTADOS

1- Obtención de la proteína rSIP

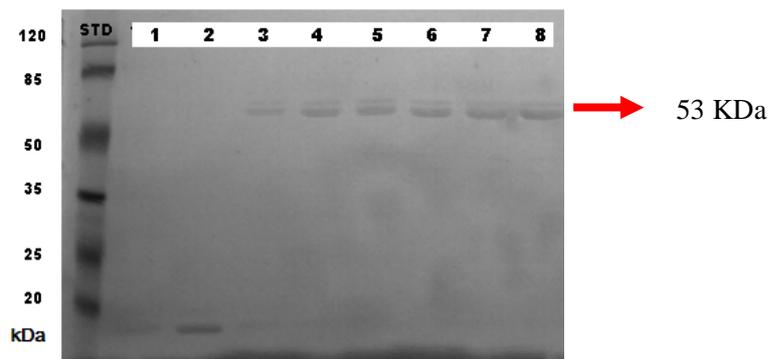
a) Expresión y purificación de la proteína SIP

El análisis de un gel de electroforesis de poliacrilamida al 12,5% de las fracciones eluidas de la columna Pro Bond indica la presencia de una doble banda de 53 kD, las cuales presumiblemente corresponden a la proteína rSIP. (Figura 6).

El proceso de expresión y purificación permitió obtener 2 mg de proteína rSIP (1mg/litro de fermentación), los cuales fueron suficientes para el desarrollo de este trabajo de tesis.

FIGURA 6

SDS-PAGE de fracciones eluidas de la columna de afinidad Pro-Bond: La proteína rSIP fue eluida de la columna con la adición de Imidazol 250 mM. Los carriles 1-8 corresponden a fracciones de 1ml colectadas, en donde se observa la presencia de rSIP de 53 KDa a partir del carril 3.



b) Identificación de la proteína rSIP

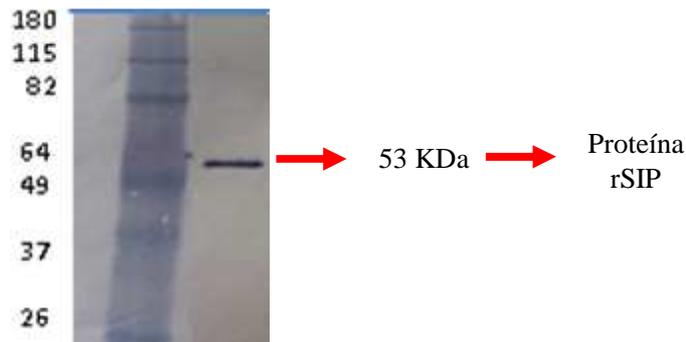
i) Western Blot

La identificación de la proteína obtenida en el proceso de expresión y purificación se llevó a cabo en primera instancia mediante Western Blot utilizando un suero policlonal anti-rSIP de conejo, producido anteriormente en la Sección de Biotecnología del ISPCH.

En la figura 7 se aprecia que la banda de 53KDa observada mediante SDS-PAGE es reconocida por los anticuerpos anti-SIP presentes en el suero, confirmando la identidad de la proteína rSIP.

FIGURA 7

Western blot para la identificación de la proteína rSIP purificada: Carril 1: Marcador de peso molecular Kaleidoscope®. Carril 2: Proteína rSIP purificada y concentrada



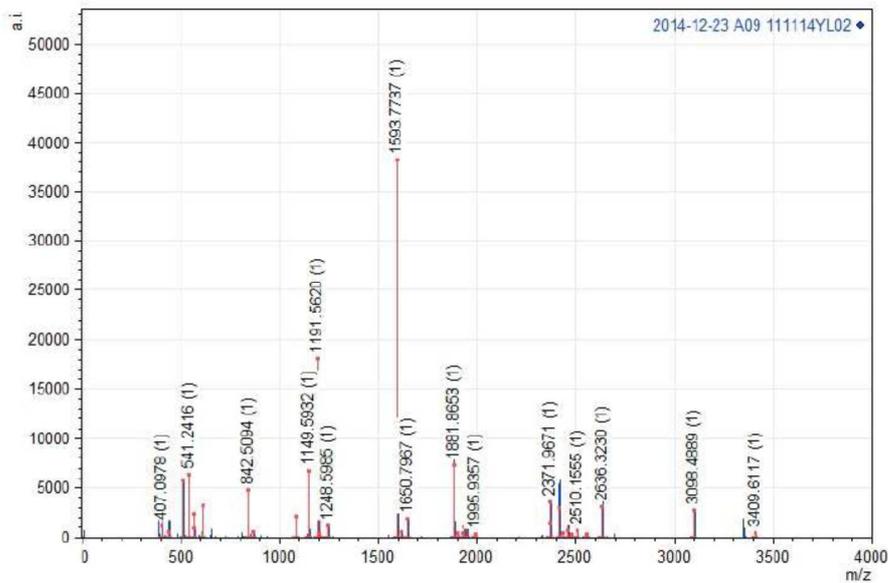
ii) Espectrometría de Masas

La identificación de la proteína rSIP también se llevó a cabo mediante espectrometría de masas. Se analizó por triplicado las dos bandas de 53 KDa observadas en el gel de electroforesis de poliacrilamida. La búsqueda en la base de datos de NCBI (todas las entradas y restringido a Firmicutes) de las señales obtenidas indicó que las 3 muestras analizadas corresponden a la proteína SIP de *Streptococcus agalactiae* registrada en NCBI como: “Peptidoglycan-binding protein LysM”. El espectro de masas y el resultado del análisis bioinformático se muestran en la figura 8.

FIGURA 8

Espectrometría de masas para la confirmación de la identidad de la proteína rSIP. a) Espectro de masas de rSIP b) Análisis de la huella peptídica mediante MALDI-MS.

a)



b)

Muestra 1

Base de datos	Taxonomía	Identificación
Mascot (NCBI)	All entries	Peptigoglycan-binding protein LysM, partial [<i>Streptococcus agalactiae</i>] Sip [<i>Streptococcus agalactiae</i>]
Mascot (NCBI)	Firmicutes	Peptigoglycan-binding protein LysM [<i>Streptococcus agalactiae</i>] Peptigoglycan-binding protein LysM, partial [<i>Streptococcus agalactiae</i>] Sip [<i>Streptococcus agalactiae</i>] Peptigoglycan-binding protein LysM [<i>Streptococcus agalactiae</i>]

Muestra 2

Base de datos	Taxonomía	Identificación
Mascot (NCBI)	All entries	Peptigoglycan-binding protein LysM, partial [<i>Streptococcus agalactiae</i>] Peptigoglycan-binding protein LysM [<i>Streptococcus agalactiae</i>]
Mascot (NCBI)	Firmicutes	Peptigoglycan-binding protein LysM, partial [<i>Streptococcus agalactiae</i>] Peptigoglycan-binding protein LysM [<i>Streptococcus agalactiae</i>] Sip [<i>Streptococcus agalactiae</i>]

Muestra 3

Base de datos	Taxonomía	Identificación
Mascot (NCBI)	All entries	Peptigoglycan-binding protein LysM, partial [<i>Streptococcus agalactiae</i>] Sip [<i>Streptococcus agalactiae</i>]
Mascot (NCBI)	Firmicutes	Peptigoglycan-binding protein LysM [<i>Streptococcus agalactiae</i>] Peptigoglycan-binding protein LysM, partial [<i>Streptococcus agalactiae</i>] Sip [<i>Streptococcus agalactiae</i>] Peptigoglycan-binding protein LysM [<i>Streptococcus agalactiae</i>]

2- Desarrollo de un modelo de infección intravaginal por SGB en ratones C57BL/6

a) Adaptación de una cepa de SGB III al modelo animal

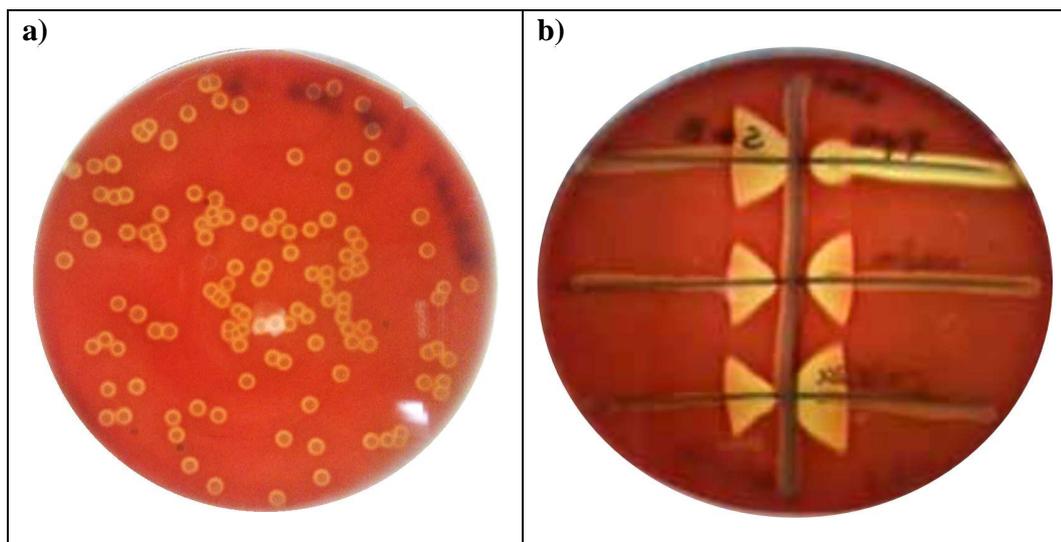
La cepa de SGB utilizada en este estudio corresponde a un aislado clínico de serotipo III cuya identidad se confirmó en el Laboratorio de Referencia nacional de cocáceas gram positivas del ISPCH mediante el análisis del tipo de hemólisis, tinción de gram, prueba de la catalasa, test de CAMP, hidrólisis de hipurato de sodio y la detección del antígeno específico de grupo B mediante aglutinación por látex.

Debido a que SGB no habita comensalmente el tracto genitouterino de ratones fue necesaria la adaptación de la cepa a nuestro modelo animal realizando dos pasajes de 16 días, en los cuales fue posible mantener una colonización constante.

La identidad de la cepa adaptada se confirmó en primera instancia mediante análisis microbiológicos, los cuales fueron positivos para SGB (Figura 9).

FIGURA 9

Análisis microbiológico de una cepa de SGB III adaptada a un modelo murino de infección intravaginal. a) análisis de tipo de hemólisis: las colonias de SGB son β -hemolíticas al ser sembradas en agar sangre. b) Test de CAMP: Las colonias de SGB se observan como una punta de flecha, versus una cabeza de fósforo de un control negativo de *Streptococcus pyogenes*. c) Las colonias de SGB son de color naranja al ser sembradas en agar granada.





Por otra parte, se realizó la identificación de la cepa de SGB adaptada al modelo animal, mediante la secuenciación del rRNA 16S. La secuencia obtenida se alineó con la base de datos de NCBI mostrando 100% de identidad y similaridad con rRNA16S de otras cepas de SGB (Figura 10) y se registró en la base de datos de secuencias nucleotídicas de NCBI con el código GenBank: KU736792.1 (Soto y cols, 2016).

FIGURA 10

Análisis del alineamiento de la secuencia del rRNA 16S de la cepa de SGB adaptada al modelo animal, versus la base de datos de NCBI.

Query-Name	Score	E-Value	%-Ident	%-Simil	Q-Begin	Description
SGBIII-ISP	868	0	100%	100%	1	Streptococcus agalactiae 2603V/R strain 2603V/R 16S ribosomal RNA, complete sequence
SGBIII-ISP	868	0	100%	100%	1	Streptococcus agalactiae strain JCM 5671 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
SGBIII-ISP	868	0	100%	100%	1	Streptococcus agalactiae strain ATCC 13813 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
SGBIII-ISP	868	0	100%	100%	1	Streptococcus agalactiae strain JCM 5671 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
SGBIII-ISP	860	0	100%	100%	4	Streptococcus agalactiae strain ATCC 13813 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

El análisis de subtipificación molecular de SGB por MLST determinó que la cepa presenta un perfil alélico adhP 2, pheS 1, atr 1, glnA 2, sdhA 1, glcK 1, tkt 1. Dicho perfil corresponde al tipo de secuencia 17 (ST17), perteneciente al complejo clonal 17 (CC17) el cual se determinó mediante un análisis bioinformático con la base de datos internacional (Anexo 1). El ST17 es considerado hipervirulento y se asocia con el desarrollo de cuadros invasivos en neonatos.

b) Modelo de infección intravaginal

En la etapa de preparación de 5 días del modelo murino de infección intravaginal los animales recibieron una dosis diaria de gentamicina de 100 mg/Kg con el fin de disminuir la flora comensal. El antibiótico, permitió inhibir el crecimiento de *Proteus* y de otras bacterias gram negativas, las cuales interfieren con el crecimiento y colonización de SGB en el tracto genitouterino.

Además, los animales recibieron una dosis de 17 β -estradiol para sincronizar el ciclo estral en estro. El estadio del ciclo estral se verificó mediante un método de observación visual y uno citológico (Goldman y cols., 2007; Byers y cols., 2012) (Figura 11).

FIGURA 11

Verificación del estadio del ciclo estral. a) Método de observación visual: en Estro, las hembras son más receptivas a los machos, por lo que se aprecia claramente la abertura vaginal e hinchazón. b) Método citológico: Se caracteriza por la presencia de células epiteliales cornificadas.

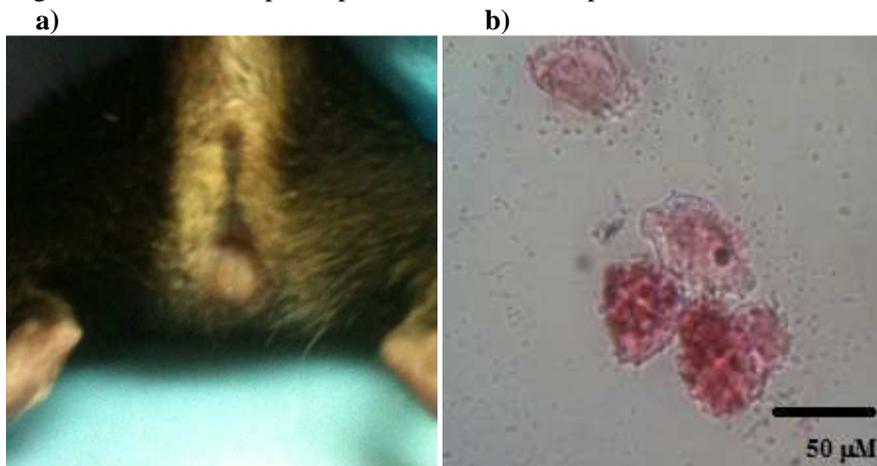


Foto zona caudal de un ratón C57BL/6 en Estro

Células epiteliales cornificadas frotis vaginal raton C57BL/6 (40x, H&E)

Los roedores, específicamente los ratones son animales muy sociables con una conducta y jerarquía establecida. Un animal sano está atento al medio, interactúa con sus pares, responde al enriquecimiento ambiental, se alimenta de forma constante y está en permanente acicalamiento (CONICYT, 2009).

Mediante el análisis conductual se observó que los animales se comportaron normalmente en relación al grupo control (Tabla 8). Los animales no presentaron cambios notorios en su alimentación, actividad, pelaje y postura durante el experimento, pero después de los primeros manejos que recibieron tuvieron una tendencia a estar más inquietos y con vocalizaciones. Este hecho se atribuye a los numerosos procedimientos invasivos a los que fueron sometidos (Anestesia, infección y muestreo).

En el transcurso del modelo de infección, los animales se pesaron diariamente. Todos aumentaron de peso normalmente en relación al inicial (~8%) y no se observaron diferencias significativas entre los grupos analizados (datos no mostrados).

En el ELISA de las muestras de suero no fue posible detectar anticuerpos IgG anti-SIP en ninguno de los animales de modelo (datos no mostrados).

TABLA 8

Análisis conductual de los animales del modelo de infección intravaginal

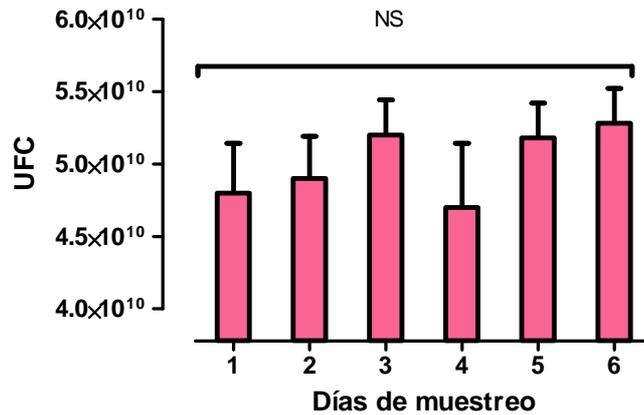
Grupos	Apetito	Actividad	Acicalamiento	Postura	Respuesta al manejo
Control Ambiental	+	+	+	+	+
Control Gelatina	+++	++	+	+	++
Infectados con SGB	+++	++	++	++	++++

Normal (+), Escasos cambios (++), Medianos cambios (+++), Notorios cambios (++++)
Modificado de CONICYT, 2009

A los hisopados vaginales se les realizó análisis microbiológico como se describió en la sección anterior y además se realizó la determinación del número de UFC presentes en cada muestra mediante dilución seriada y siembra homogénea en agar sangre (Figura 12). En este análisis se observa que los animales del grupo “infectados con SGB” permanecen colonizados durante el periodo de experimentación, no observándose diferencias significativas entre el número de UFC recuperadas en los 6 días de muestreo.

FIGURA 12

UFC de SGB recuperadas del tracto genitourinario de ratones colonizados: No existe diferencia estadísticamente significativa (NS) entre los días muestreados para los 6 animales muestreados ($p=0,5897$)



3- Evaluación de la respuesta inmune protectora de la colonización por SGB del tracto genitourinario de ratones vacunados oralmente con la proteína rSIP

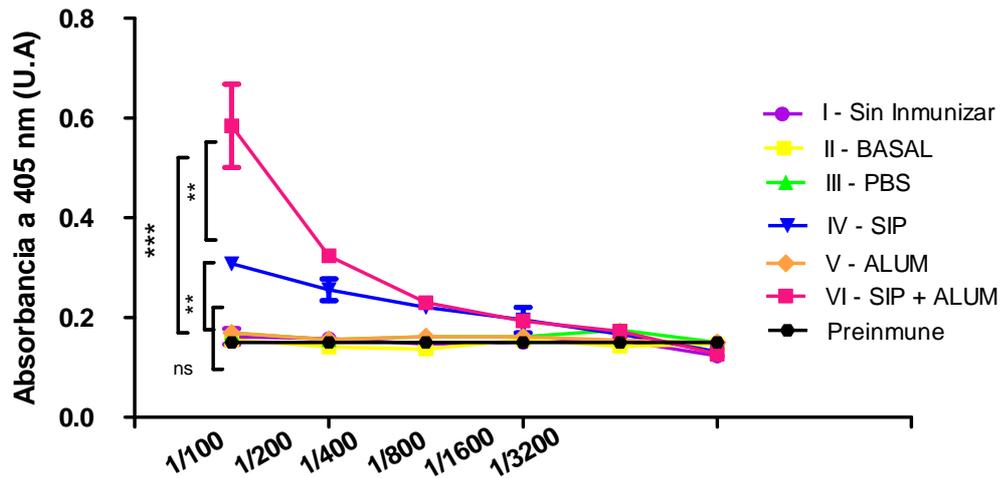
a) Evaluación inmunológica

i) ELISA para la detección de anticuerpos IgG anti-rSIP en suero

El análisis de los resultados de la detección de anticuerpos IgG anti-rSIP en suero mediante ELISA, reveló la ausencia de este tipo de inmunoglobulinas en los animales de los grupos controles (Sin inmunizar, basal, PBS, ALUM y preinmune), no observándose diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p>0,05$). Sin embargo, fue posible detectar niveles significativos de anticuerpos en sueros de animales inmunizados solo con la proteína rSIP ($p=0,0004$) y en los animales inmunizados con el prototipo de vacuna oral en base a SIP y ALUM, siendo esta diferencia muy significativa con respecto al grupo IV-SIP ($p=0,0004$) y altamente significativa con respecto a los grupos controles (Figura 13).

FIGURA 13

Absorbancia a 405 nm de diluciones seriadas de sueros de ratones inmunizados para la evaluación de los niveles de anticuerpos IgG anti-rSIP. Cada medición fue realizada por cuadruplicado.

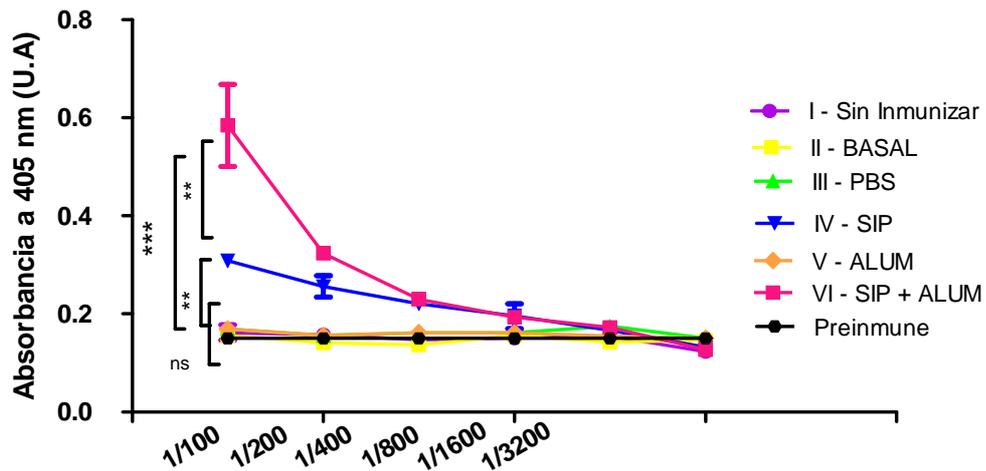


ii) ELISA para la detección de anticuerpos IgA anti-rSIP en suero

El análisis de los resultados de la detección de anticuerpos IgA anti-rSIP en suero mediante ELISA, reveló la ausencia de este tipo de inmunoglobulinas en los animales de los grupos controles (Sin inmunizar, basal, PBS, ALUM y preimmune), no observándose diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p > 0,05$). Sin embargo, al igual que en el caso anterior, fue posible detectar niveles significativos de anticuerpos en sueros de animales inmunizados solo con la proteína rSIP ($p < 0,01$) y en los animales inmunizados con el prototipo de vacuna oral en base a SIP y ALUM, siendo esta diferencia muy significativa con respecto al grupo IV-SIP ($p < 0,001$) y altamente significativa con respecto a los grupos controles (Figura 14).

FIGURA 14

Absorbancia a 405 nm de diluciones seriadas de sueros de ratones inmunizados para la evaluación de los niveles de anticuerpos IgA anti-rSIP. Cada medición fue realizada por cuadruplicado.

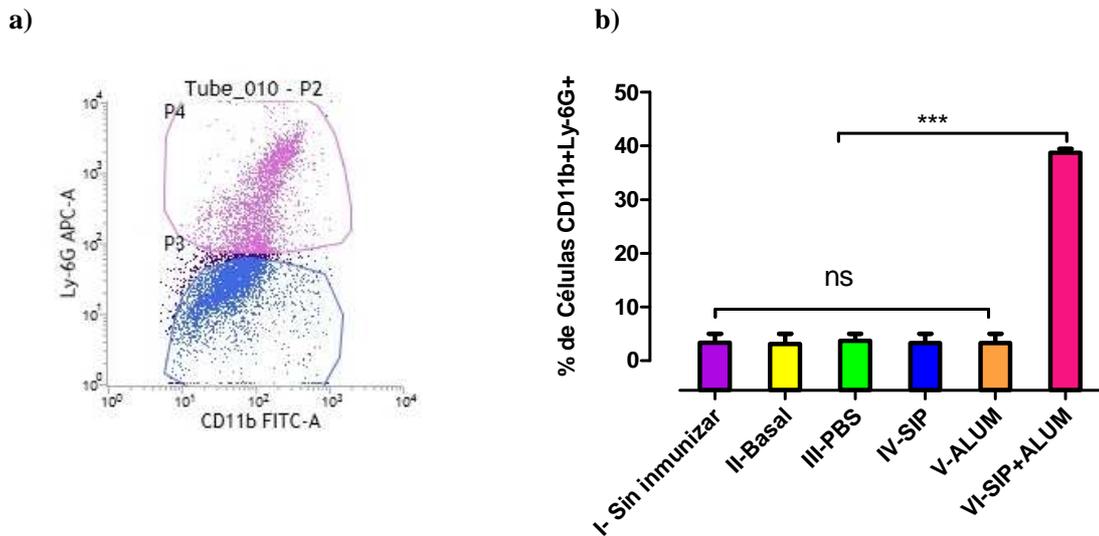


iii) Inmunofenotificación de tracto genitouterino

El desarrollo de cuadros invasivos por SGB se atribuye principalmente a una deficiente infiltración de neutrófilos en los tejidos infectados producto de la acción de factores de virulencia presentes en la superficie celular que interfieren con este proceso. Mediante el análisis de inmufenotipificación por Citometría de flujo fue posible evidenciar un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,001$) en la infiltración de neutrófilos en el tracto genitouterino de los animales inmunizados oralmente con la proteína SIP y el adyuvante ALUM (Figura 15). La infiltración de neutrófilos en los restantes grupos del modelo fue indetectable.

FIGURA 15

Infiltración de Neutrófilos en el tracto genitourinario de animales inmunizados: a) Esquema de “dots” CD11b vs Ly-6G para la determinación de PMN. La población delimitada por el *gate* morado corresponde a células doblemente positivas para Ly-6G y CD11b. b) porcentaje de células doblemente positivas para CD11b/Ly-6G en tracto genitourinario. Los valores representados corresponden a promedio de los 5 animales analizados en cada grupo inmunizado.

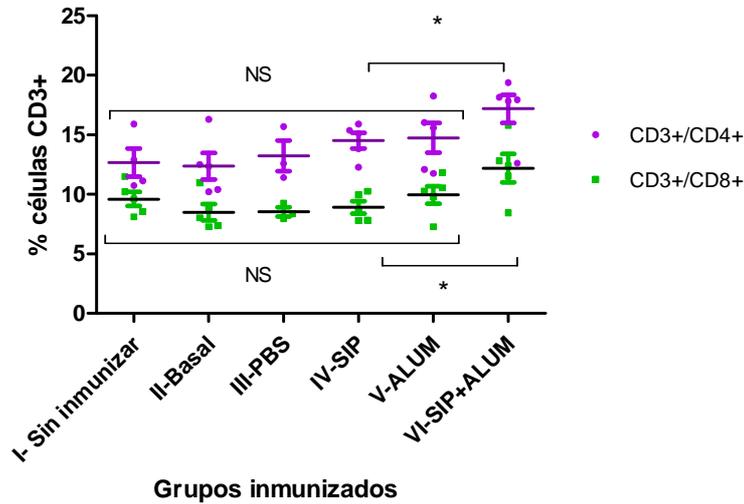


iv) Inmunofenotipificación de Bazo

La inmunización oral de los animales con rSIP y ALUM indujo además un aumento estadísticamente significativo de linfocitos T helper CD3+CD4+ y citotóxicos CD3+CD8+ ($p < 0,05$) en bazo, con respecto a los restantes grupos analizados (Figura 16).

FIGURA 16

Inmunofenotipificación de Linfocitos T en bazo. Se observa un aumento significativo de linfocitos T CD4+ y CD8+ en bazos de animales inmunizados con SIP-ALUM. Se representan los valores determinados para los 5 animales de cada grupo.



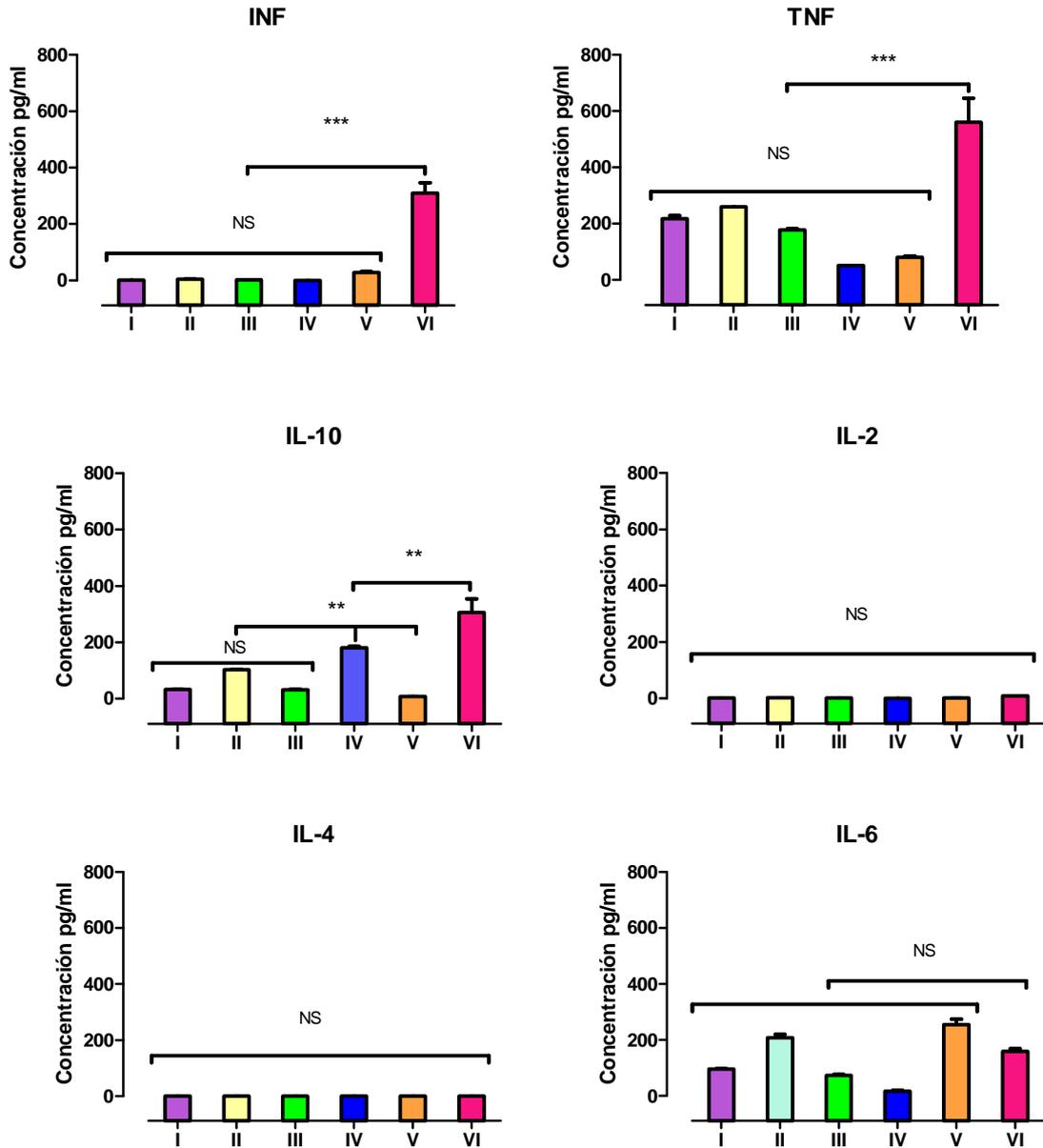
v) Cuantificación de citoquinas en sobrenadantes de cultivos de esplenocitos

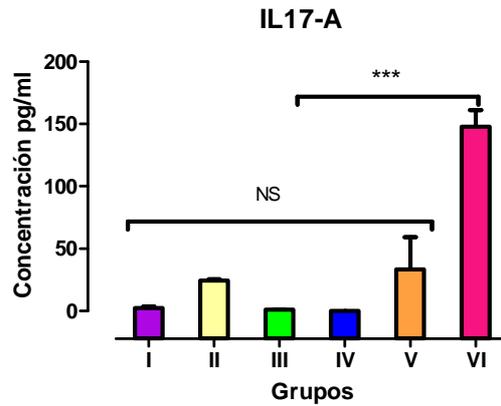
Los sobrenadantes de los esplenocitos cultivados y estimulados con la proteína rSIP fueron utilizados para detectar y cuantificar las citoquinas INF, TNF, IL-10, IL-4, IL6, IL17A e IL2, utilizando el kit Th1/Th2/Th17 CBA (*Citometric Bead Array*) de BD.

De este análisis es posible observar que existe un aumento significativo de la secreción de las citoquinas INF y TNF ($p < 0,001$ y $p < 0,001$) relacionadas con la respuesta del tipo Th1 y un aumento significativo de IL-10 e IL-17A ($p < 0,01$) (Figura 17). No se observaron diferencias significativas entre los grupos analizados para las restantes citoquinas analizadas.

FIGURA 17

Niveles de expresión de citoquinas Th1, Th2 y Th17 determinadas mediante CBA en los grupos de animales inmunizados: Se observa un incremento significativo en INF, TNF e IL-10 en el grupo VI SIP+ALUM.



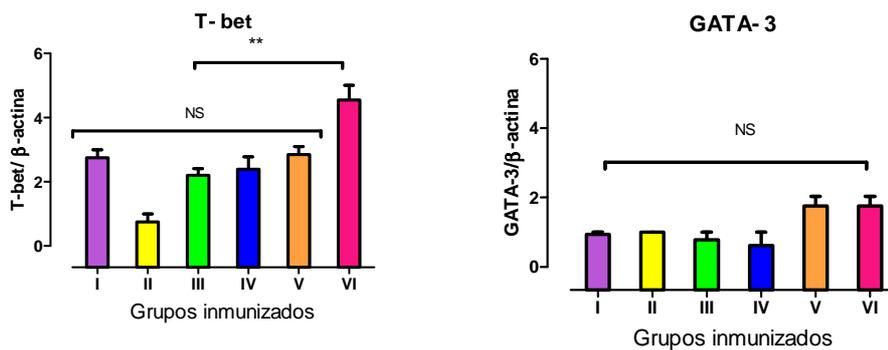


vi) Evaluación de factores de transcripción en esplenocitos en cultivo

Los esplenocitos cultivados de los diferentes grupos experimentales fueron utilizados para analizar la expresión de factores de transcripción relacionados con respuesta inmune del tipo Th1/Th2 (Figura 18). Se observó un aumento significativo en T-bet ($p < 0,001$), lo cual se relaciona con la respuesta del tipo Th1. Este resultado se correlaciona con el análisis de secreción de citoquinas en cultivos de esplenocitos.

FIGURA 18

Evaluación de los niveles de expresión de los factores de transcripción T-bet y GATA-3, asociados a respuestas inmune del tipo Th1 y Th2



vii) Análisis microbiológico

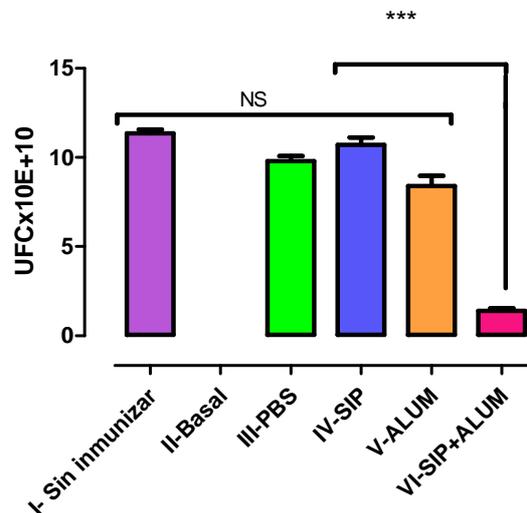
El análisis microbiológico de hisopados vaginales de los animales del modelo de inmunización reveló la presencia de SGB en grupos controles en cantidades similares a las

recuperadas en el modelo de infección intravaginal descrito previamente. En contraste, en los hispados vaginales de los animales inmunizados con SIP y Alum se recuperaron cantidades significativamente menores ($p < 0,001$) (Fig. 19).

Este resultado, en conjunto con los presentados anteriormente apoyan la hipótesis de este trabajo, en donde se afirma que el prototipo de vacuna en base a la proteína SIP y Alum tienen un efecto protector contra la colonización de SGB en el tracto genitouterino.

FIGURA 19

Recuento de UFC de SGB en hispados vaginales de ratones inmunizados



4- Estudio de la interacción de SGB y la barrera hematoencefálica humana

a) Interacción de SGB con células endoteliales humanas *in vitro*

Las células endoteliales son unos de los componentes más importantes de la BHEH y participan activamente en la regulación del paso de solutos desde el torrente sanguíneo hacia el Sistema Nervioso Central.

Las células endoteliales se cultivaron a un 80-90% de confluencia y fueron expuestas durante 24 horas a un inóculo de SGB de 10^4 UFC marcado con FITC y mediante un

microscopio de fluorescencia con suministro constante de CO₂ y control de temperatura se tomaron imágenes cada 3 minutos.

Se observó que SGB se agrupa en *clusters* alrededor de las células endoteliales, induciéndoles cambios morfológicos, disgregación y muerte celular (Figura 20).

FIGURA 20

Cultivo de células endoteliales desafiadas con SGB-FITC: En los círculos rojos se aprecia: a) Agrupación de SGB en torno a las CE transcurrida una hora de incubación; b) Cambios morfológicos en las CE transcurridas 8 horas y c) muerte celular luego de 24 horas de incubación.



b) Interacción de SGB con uniones estrechas de células endoteliales humanas

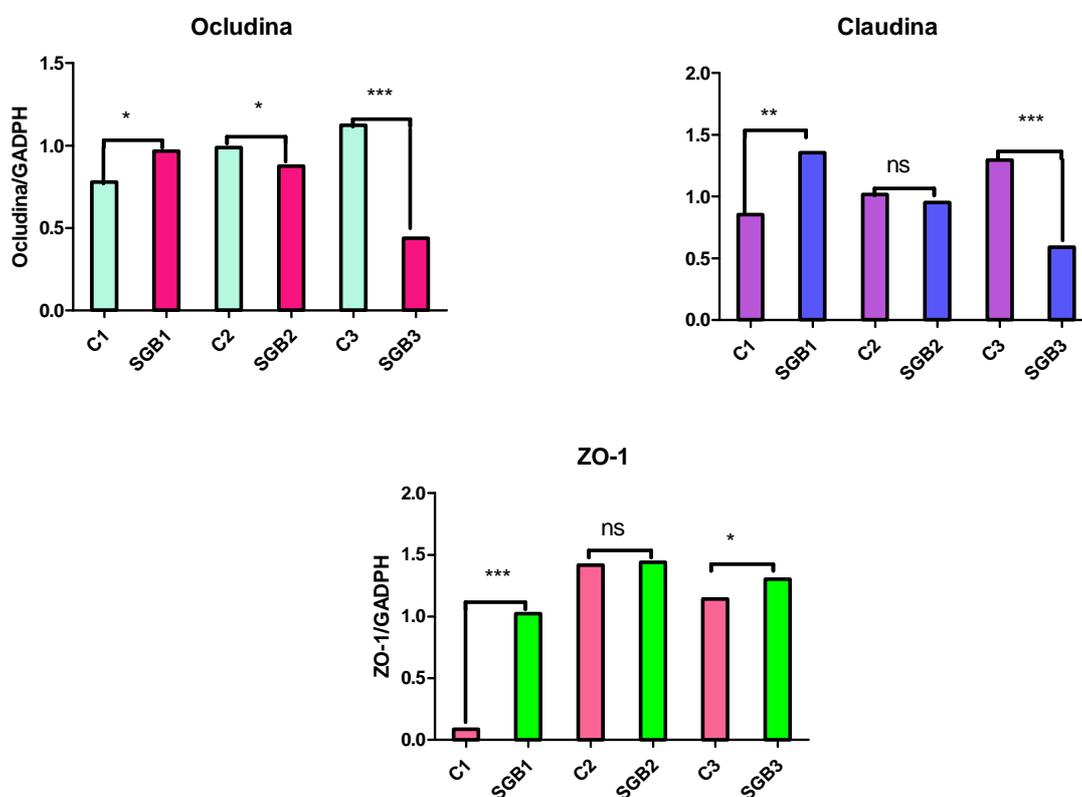
Las células endoteliales de la BHEH están estrechamente unidas por uniones intercelulares llamadas *Tight Junctions* o uniones estrechas, las cuales son altamente responsables de la baja permeabilidad de esta.

Se cultivaron CE en 8 botellas de 50 ml a una confluencia de 80-90%. Tres cultivos fueron infectados con SGB III, 2 con SGB ATCC con 10⁴ UFC y 3 no fueron infectadas y usadas como control. Después de 4, 8 y 20 se colectaron fracciones celulares de 1 botella por grupo y se analizaron por Western blot para observar la presencia de las proteínas ZO-1, ocludina y claudina, las cuales componen las uniones estrechas. Se observó una disminución significativa en la presencia de ocludina y claudina en los cultivos celulares infectados con SGB ($p < 0,001$ y $p < 0,001$) y un aumento de ZO-1 ($p < 0,05$) (Fig. 21), lo que sugiere que esta

bacteria afecta la integridad de las proteínas que conforman las uniones estrechas. Específicamente, se observa una disminución de ocludina y claudina que se encuentran en la fracción extracelular y un aumento de la proteína ZO-1, presente en la fracción intracelular.

FIGURA 21

Niveles de expresión de proteínas de las uniones estrechas en cultivos de células endoteliales desafiadas con SGB: a) Ocludina, b) Claudina y c) ZO-1. Simbología. C1: control/ 4 horas; SGB1: cultivos infectados con SGB 4 horas; C2 control/ 8 horas; SGB2: cultivos infectados con SGB 8 horas; C3: control/20 horas y SGB3 cultivos infectados con SGB 20 horas.



c) Transmigración de células mononucleares a través de un modelo de barrera hematoencefálica *in vitro* expuesto a un inóculo de SGB

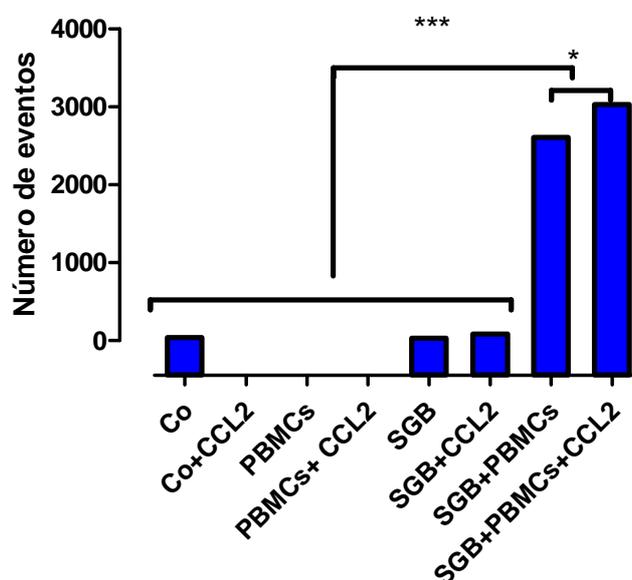
Posteriormente se implementó un modelo *in vitro* de BHEH con co-cultivos de células endoteliales y astrocitos humanos en lados opuestos de una membrana de 3 μ M, modelo desarrollado en el laboratorio del Dr. Eliseo Eugenin, Universidad de Rutgers.

El modelo de BHEH fue expuesto a SGB (10^4 UFC) y 3×10^5 de células mononucleares de sangre periférica y mediante citometría de flujo se evaluó su capacidad de transmigrar hacia el compartimiento inferior en diferentes condiciones experimentales (Figura 22).

Se observó que en presencia de SGB se detecta un mayor número de CMSP en el compartimiento inferior, lo cual se relaciona directamente por una permeabilización del modelo de BHEH.

FIGURA 22

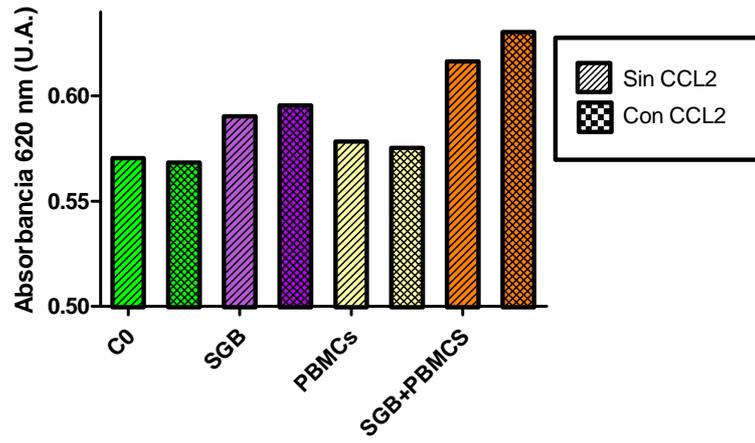
Transmigración de CMSP a través del modelo BHEH *in vitro*. Cada condición fue evaluada por triplicado.



El aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en presencia con SGB se evidenció también mediante un ensayo de permeabilidad de BSA conjugada con Evans Blue. Un aumento de la absorbancia a 620 nm en el compartimiento inferior de los modelos expuestos a SGB implica un aumento de la permeabilidad al colorante (Figura 23).

FIGURA 23

Absorbancia a 620 nm de los compartimientos inferiores de modelos de BHEH expuestas a BSA conjugada a Evans Blue. Cada barra representa la absorbancia de un pool de 3 réplicas.



VI. DISCUSIÓN

A pesar de que SGB es un organismo comensal, la infección por este patógeno tiene un importante impacto sobre la salud humana. Mujeres embarazadas, neonatos, adultos mayores y pacientes inmunosuprimidos representan un alto riesgo de padecer enfermedades invasivas. En Chile y en otros países del mundo, las infecciones por SGB representan además una problemática social, debido a que las personas de nivel socioeconómico bajo poseen mayor riesgo de contraer este patógeno y los centros públicos de salud no tienen implementadas metodologías de *screening* y profilaxis.

En la década del 90 surge la opción de generar una vacuna contra SGB como la opción más prometedora para esta problemática. Desde entonces se ha trabajado arduamente en el desarrollo de vacunas en base polisacáridos capsulares administradas por las vías intramuscular e intraperitoneal. Actualmente, *Novartis Vaccines and Diagnostics* está realizando estudios clínicos en Fase II para evaluar la seguridad e inmunogenicidad de una vacuna trivalente (Ia, Ib y III). Sin embargo, esta vacuna tiene la limitante de que solo protegería contra la infección por SGB de los serotipos contra los cuales fue formulada y no sería lo suficientemente efectiva para generar una respuesta inmune mucosal robusta. Cabe además destacar que en SGB se ha descrito un fenómeno llamado *switching* capsular que ocurre *in vivo* en donde se produce intercambio de material genético de la porción central del operón *cps* entre cepas de distintos serotipos. (Kelly y cols. 1994; Martins y cols., 2010). Bellais y cols. (2012) reportaron el reemplazo de una porción de 35,5 kb perteneciente al locus *cps* de una cepa de SGB III generando un cambio de serotipo a SGB IV. Este serotipo de SGB es el más frecuente en mujeres embarazadas colonizadas en Emiratos Árabes y en Estados Unidos es considerado como patógeno emergente. No existe evidencia de vacunas en base a SGB IV.

En este trabajo se evaluó el efecto protector de un prototipo de vacuna oral en base a rSIP con el adyuvante ALUM. La proteína SIP fue identificada por Brodeur y cols. (2000), quienes evidenciaron su presencia en todos los serotipos analizados. Otros estudios demostraron que esta proteína induce una respuesta inmune humoral mucosal y sistémica cuando es administrada por la vía nasal (Manning y cols, 2006; Xue, 2010). El adyuvante

ALUM está aprobado para ser testeado en humanos y es el más ampliamente usado debido a su bajo costo, seguridad e inmunogenicidad. Compuestos en base a Aluminio son abundantes en el medio ambiente y son ingeridos diariamente en el agua y en la comida, lo que avala su uso en una vacuna administrada oralmente (He y cols., 2005).

SGB al ser un patógeno que utiliza las superficies mucosas para ingresar al organismo requiere de una inmunidad mucosal fortalecida para prevenir su colonización y el desarrollo de la enfermedad invasiva. Holmgren y col. (2005) describen un sistema de compartimentalización del sistema inmune mucosal en donde la administración de un antígeno en una superficie mucosa puede inducir la secreción de anticuerpos IgA en superficies mucosas distantes. Inmunizando oralmente se produce la captación del antígeno en la cavidad oral y en la primera porción del intestino, pero es posible inducir la producción de anticuerpos IgA en las secreciones salivares, intestinales, vaginales y de las glándulas mamarias (Holmgren y cols., 1992; McGhee y cols., 1992; Mestecky, 1987; Zhu y cols., 2012). Por lo tanto, la vía oral de administración representa un atractivo método para vacunas contra patógenos transmitidos sexualmente, incluyendo SGB.

Con el fin de desarrollar un modelo murino de infección por SGB para la evaluación pre-clínica del prototipo de vacuna se adaptó un aislado nacional de una cepa de SGB de serotipo III, realizando dos pasajes de 16 días en el tracto genitouterino de ratones C57BL/6. El análisis de subtipificación molecular por MLST de esta cepa indicó que tiene un perfil adhP 2, pheS 1, atr 1, glnA 2, sdhA 1, glcK 1, tkt 1, correspondiente al CC 17. Se ha demostrado que cepas pertenecientes al complejo clonal 17 están fuertemente asociadas con meningitis neonatal y son consideradas hipervirulentas (Brzywczy-Włoch y cols., 2012; Lamy y cols., 2006)

A pesar de que SGB no es un microorganismo comensal del tracto gastrointestinal y/o genitouterino de ratones se logró mantener una colonización estable en el tracto genitouterino durante 19 días al infectar los animales con su ciclo estral sincronizado en *estro* mediante el uso de 17β-estradiol, con 10⁷ UFC de la cepa adaptada en un medio viscoso de gelatina. Los animales pertenecientes a este modelo no experimentaron diferencias significativas de peso con respecto a grupos control y no se observaron anticuerpos IgG anti SIP en suero, a diferencia de lo observado cuando el patógeno es

inoculado intraperitonealmente. Se han descrito previamente dos modelos murinos de infección intravaginal por SGB. En el modelo desarrollado por Randis y cols. (2014) los animales permanecen colonizados por un corto periodo de tiempo de 5 días y en el modelo desarrollado por Carey cols. (2014) se mantiene una colonización de 90 días, pero no es estable en los primeros 15 días. A diferencia del nuestro, los modelos mencionados anteriormente no son útiles para evaluar la efectividad preclínica de una vacuna frente a un desafío por SGB.

Con el fin de evaluar la respuesta inmune humoral inducida por el prototipo de vacuna se evaluó la presencia de anticuerpos del tipo IgG específicos para la proteína rSIP en suero. Los niveles más altos de anticuerpos se observaron en el grupo de animales vacunados con el prototipo SIP-ALUM y en menor cantidad en el grupo vacunado solo con la proteína SIP. Altos niveles de anticuerpos del tipo IgG anti-SIP en la sangre se asocian con múltiples ventajas para proteger al huésped contra la infección por SGB. En primer lugar estos anticuerpos pueden neutralizar al patógeno cuando entra al organismo a través de una superficie mucosa y logra atravesar sus mecanismos de defensa ingresando a la sangre. En segundo lugar, estos anticuerpos pueden transmitirse verticalmente desde la madre hacia el feto por vía transplacental, disminuyendo considerablemente sus probabilidades de contagio. Por último, se ha descrito que a pesar de que los anticuerpos del tipo IgG son sensibles a la degradación proteolítica, existe un mecanismo de transporte mediado por receptores FcRn expresados en células epiteliales del tracto gastrointestinal y genitouterino que permiten su paso hacia superficies mucosas para opsonofagocitar microorganismos. Sin embargo, es necesario realizar ensayos de opsonización y fagocitosis de SGB para evaluar la funcionalidad de los anticuerpos producidos ante nuestro prototipo de vacuna.

La respuesta inmune humoral adaptativa en superficies mucosas se asocia con la secreción de anticuerpos del tipo IgA (sIgA), los cuales representan la primera línea de defensa contra microorganismos que infectan mediante esta vía, impidiendo un proceso infeccioso antes de que se establezca (Holmgren y col. 2005, Abbas y cols., 2012). Cabe destacar además que los anticuerpos IgA presentes en la leche materna pueden ser transferidos a las crías, confiriéndoles protección (Santillan y cols., 2011). La inducción de

la secreción de IgA es dependiente de linfocitos T helper y de la secreción de TGF- β e IL-10 junto a IL-4. En este trabajo, no se evidenció la presencia de anticuerpos del tipo IgA anti-rSIP en fecas de animales vacunados (datos no mostrados). Sin embargo, en suero se observó altos niveles de IgA anti-rSIP en los animales inmunizados con SIP y ALUM y en menor cantidad en los animales inmunizados solo con SIP. Para una mejor evaluación de la respuesta inmune humoral a nivel mucosal, se sugiere la determinación de anticuerpos IgA anti-SIP en mucosa genital.

Para la evaluación de la respuesta inmune celular se cuantificó la secreción de citoquinas T_{H1}, T_{H2} y T_{H17} en esplenocitos reestimulados con la proteína rSIP. Este análisis reveló un significativo aumento en la secreción de las citoquinas IFN y TNF ($p < 0,001$) en el grupo de animales inmunizados con SIP-ALUM. Dichas citoquinas se asocian con una respuesta inmune celular del tipo T_{H1}. Kwak y cols. (2000) evidenciaron la secreción de TNF- α desde células mononucleares humanas expuestas a un lisado de SGB III y sugieren que es un componente crítico en la cascada de citoquinas en respuesta al patógeno. Teti y cols. (1993) observaron que el pre-tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-TNF- α de ratones inoculados con SGB provocó un aumento significativo de la letalidad. También se observó un aumento en el grupo SIP-ALUM de IL-10 ($p < 0,01$), la cual se asocia con una respuesta inmune celular del tipo T_{H2} sin embargo, no se detectó secreción de IL-4 lo que hace suponer que la secreción de IL-10 fue estimulada frente a una respuesta T_{H1} exacerbada, inhibiendo la activación de leucocitos, la producción de citoquinas proinflamatorias y la migración de fagocitos a los sitios de infección, disminuyendo el daño tisular asociado a la respuesta inmune (Madureira y cols., 2011). También se evidenció en esplenocitos de animales inmunizados con SIP-ALUM un incremento en la secreción de IL-17, la cual es secretada por linfocitos T_{H17} en respuesta a una infección bacteriana o micótica. Los linfocitos T_{H17} son abundantes en los tejidos mucosos, especialmente en el tubo digestivo e inducen inflamación rica en neutrófilos (Abbas y cols., 2012).

La respuesta inmune celular frente al prototipo de vacuna se evaluó además mediante la determinación de los factores de transcripción T-bet y GATA-3, relacionados con las respuestas T_{H1} y T_{H2}, respectivamente. Dicha evaluación se correlaciona con el análisis de

secreción de citoquinas, observándose un aumento significativo en la expresión de T-bet relacionado con una respuesta T_H1.

En el tracto genitourinario de animales inmunizados con SIP-ALUM y desafiados con SGB se evidenció una significativa infiltración de Neutrófilos, mientras que en los otros grupos analizados fue indetectable. Los neutrófilos representan la población de Linfocitos predominante en el epitelio vaginal y se les ha atribuido un importante rol en la protección contra infecciones genitales transmitidas sexualmente como *Chlamydia trachomatis* (Milligan, 1999). Estos leucocitos representan una parte importante de la respuesta inmune innata temprana y de la inmunidad adaptativa frente a los microorganismos, debido que son capaces de migrar rápidamente desde la sangre hacia los sitios de infección, donde identifican, fagocitan y destruyen a los microbios. Madureira y cols. (2011) evidenciaron que la protección conferida por un prototipo de vacuna en base a GADPH contra un desafío por SGB III ST-17 hipervirulenta se correlaciona directamente con un incremento del tráfico de Neutrófilos hacia los órganos afectados, mientras que una limitada infiltración favorece la colonización. Algunos casos de EOD en neonatos se caracterizan por un bajo recuento de Neutrófilos en tejidos infectados, lo que se explica por la inmadurez del sistema inmune al momento del parto, lo que interfiere con la maduración y quimiotaxis (Friedman y cols., 1996; Koenig y col., 2004; Wennekamp y col., 2008).

Se han descrito una serie de factores de virulencia en la superficie de SGB, tales como C5a peptidasa y GADPH que interfieren con los mecanismos de evasión del sistema inmune del huésped, impidiendo el reclutamiento de Neutrófilos hacia los sitios de infección. Es probable que la respuesta inmune humoral estimulada por el prototipo de vacuna en base a SIP-ALUM modifique la acción de estos factores, impidiendo la adhesión en superficies mucosas y facilitando su fagocitosis por Neutrófilos.

En el análisis microbiológico de torulado vaginal se observó una drástica disminución en la colonización en el grupo inmunizado con SIP-ALUM con respecto a los grupos controles. Este hecho, representa la principal evidencia de la efectividad del prototipo de vacuna planteado en este trabajo. Santillan y cols. (2011) observaron una significativa disminución de colonización de SGB en el tracto genitouterino de ratones ICR con la aplicación de una vacuna oral en base a C5a peptidasa encapsulada, sin embargo, ellos

desafiaron los animales con una cepa de SGB ATCC de serotipo III que no es altamente virulenta y en una concentración 10 veces menor a la utilizada en este trabajo. Hickey y cols. (2010) testearon una vacuna oral en base a una proteína de membrana de *Chlamydia* obteniendo una respuesta inmune mucosal y sistémica significativa y una disminución de la colonización 12 días después del desafío. Este hecho sugiere que se pudo evidenciar una disminución de la colonización por SGB aún más significativa al evaluar colonización durante un periodo más extenso luego del desafío.

A pesar de los avances en metodologías de pesquisa y prevención de infecciones por SGB, este patógeno continúa siendo la principal causa de meningitis en neonatos (Kim, 2010). La mayor limitación en el estudio de la prevención y el tratamiento de la infección del SNC es el limitado conocimiento de la patogénesis.

Altos niveles de bacteriemia de SGB es un prerrequisito para el desarrollo de meningitis. Una vez en la sangre, puede ingresar al SNC mediante mecanismos de transmigración paracelular y transcelular facilitados por diversos factores de virulencia asociados (Ferrieri y cols., 1980; Magalhaes, 2013). La capsula polisacárida rica en ácido siálico actúa como factor de sobrevivencia para establecer bacteriemia e interfiriendo con los mecanismos de opsonofagocitosis mediada por neutrófilos. La β -hemolisina/citolisina que es una toxina promueve daño en un amplio rango de células eucariotas, incluyendo las células endoteliales de la BHE. La encapsulación y la presencia de toxinas citolíticas son comunes en los principales agentes causantes de meningitis (*S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *H. influenzae*) (Doran y cols., 2002).

La interacción de SGB con CE microvasculares es el primer paso en la patogénesis de meningitis (Banerjee y cols., 2011), donde el daño endotelial y los mecanismos inflamatorios contribuyen a la disrupción de la BHE (Magalhaes y cols 2013). En este trabajo se expuso CE microvasculares humanas a un inóculo de SGB y fue posible evidenciar como la bacteria se sitúa preferentemente en sitios de unión intercelulares ocasionando disgregación y muerte celular.

Las células endoteliales de la BHE están unidas por uniones intercelulares estrechas (TJ por sus siglas en inglés; *Tight Junctions*) que le conceden alta resistencia e

impermeabilidad. Las TJ están compuestas por proteínas integrales de membrana como las ocludinas y claudinas, y por proteínas de membrana periféricas como ZO-1, entre otros. Mecanismos de regulación que involucran a las TJ (tasas de expresión y degradación de las proteínas de las TJ) afectan la permeabilidad de la BHE (Eugenin y Berman., 2003). En este trabajo se analizó los niveles de expresión de las proteínas ocludina, Claudina y ZO-1 de las TJ de CE expuestas a SGB. Fue posible observar que las proteínas ocludina y claudina disminuyen sus niveles de expresión conforme transcurre el tiempo, en contraste a lo ocurrido con CE controles en donde sus niveles de expresión se incrementan. Por el contrario, los niveles de expresión de ZO-1 en CE expuestas a SGB aumentan, en comparación a cultivos controles. Wachtel (1999) evidenciaron un significativo aumento de la permeabilidad de la BHE de ratones debido a la proteólisis de ocludina luego de un tratamiento con IL-1 β . La significativa disminución en la expresión de ocludina y claudina probablemente se debe a que estas proteínas se encuentran expuestas en la porción extracelular de las TJ y accesibles a toxinas citolíticas de SGB y otros productos de degradación. ZO-1 en cambio se ubica en la porción citoplasmática de las CE e interacciona con las porciones terminales de las proteínas de las TJ.

Se ha descrito que la injuria y el desapego entre CE vecinas favorece la transmigración entre células dañadas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la BHE está constituida además por astrocitos, cuyos “pies terminales” interaccionan con las CE que inducen su diferenciación a CE de BHE, haciéndola más impermeable y selectiva al tráfico de sustancias. Por esta razón, se implementó un modelo *in vitro* de BHE compuesto por astrocitos y CE, se expuso a SGB y se evaluó la capacidad de transmigración de CMSP en presencia de CCL2. Se observó que en ausencia de SGB el modelo de BHE permanece íntegro y por ende las CMSP son incapaces de penetrarlo. Lo contrario ocurrió en el modelo expuesto a SGB donde un porcentaje significativo de CMSP logró transmigrar a través del modelo. Complementariamente, se realizó un estudio de permeabilidad del modelo de BHE a BSA conjugada a Evans Blue conformando que SGB induce daño en la estructura de la BHE aumentando significativamente su permeabilidad. Magalhaes y cols.,(2013) evidenciaron que SGB utiliza el sistema plasmingeno/plasmina del huésped como un mecanismo de adhesión a las CE promoviendo injuria y disrupción, sin embargo, no proporcionan nuevos antecedentes con respecto a la patogénesis.

Este trabajo es el primer reporte de un prototipo de vacuna oral en base a la proteína SIP y el adyuvante ALUM, el cual es capaz de resistir el paso por el sistema gastrointestinal, ser absorbido y ser reconocido por el sistema inmune, desencadenando una respuesta humoral y una respuesta celular capaces de disminuir drásticamente la colonización por SGB en el tracto genitouterino de ratones C57BL/6. Las respuestas inmune mucosal local y sistémicas inducidas por el prototipo de vacuna podrían además ser efectivas contra cuadros invasivos, impidiendo la entrada del patógeno a la sangre, estableciendo bacteriemia, lo cual es prerequisite para el desarrollo de neumonía y meningitis.

Otro reporte de vacuna mucosal en base a la proteína SIP es el de Xue y cols. (2010) quienes evaluaron una vacuna intranasal en base a SIP y ScpB en combinación con CpG y CT obteniendo en el tracto vaginal anticuepos del tipo IgG e IgA y anticuerpos del tipo IgG en la sangre, pero no realizaron un desafío con SGB para evaluar el efecto protector a nivel local.

Mediante este trabajo, se evidenció protección contra la colonización por SGB en ratones hembra adultos, pero no se evidenció protección en crías nacidas de madres inmunizadas. Santillan y cols. (2011), evidenciaron una disminución de la mortalidad en crías desafiadas con un inóculo de SGB, cuyas madres fueron inmunizadas.

Como proyeccion se plantea, el uso de una vacuna en base la proteína rSIP administrada directamente vía oral o utilizando un microorganismo vivo atenuado como un *lactobacillus*.

VII. CONCLUSIÓN

- Se expresó, purificó e identificó la proteína rSIP en cantidad y calidad adecuadas para la evaluación de su potencial uso como vacuna.
- Se adaptó y caracterizó una cepa de SGB serotipo III proveniente de un cuadro clínico a un modelo murino.
- Se implementó un modelo de infección por SGB en el tracto genitouterino de ratones C57BL/6
- El prototipo de vacuna oral en base a SIP y ALUM fue capaz de estimular una respuesta inmunológica antígeno específica, la cual fue capaz de disminuir significativamente la colonización vaginal con GBS.
- SGB modifica la permeabilidad de un modelo de Barrera hematoencefálica *in vitro*, alterando la integridad de las uniones estrechas o Tight Junctions.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S (2012) Inmunología celular y molecular. Séptima edición

Baker, CJ. (2013) The Spectrum of perinatal group B streptococcal disease. *Vaccine* 31S, 3-6.

Baker, CJ., Barret, FF. (1974) Group B streptococcal infections in infants. The importance of the various serotypes. *JAMA* 230, 1158-1160.

Baker, CJ., Barret, FF., Gordon RC., Yow, MD. (1973) Suppurative meningitis due to streptococci of Lancefield group B: a study of 33 infants. *Journal of Pediatrics* 82, 724-729.

Baker, CJ., Kasper, DL. (1976) Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal infection with group B *Streptococcus*. *The New England Journal of Medicine* 294, 753-756.

Baker, CJ., Kasper DL., Tager, IB, Paredes, A., Alpert, S., McCormack WM. (1977) Quantitative determination of antibody to capsular polysaccharide in infection with type III strains of group B *Streptococcus*. *The Journal of Clinical Investigation* 59, 810-818.

Baker, CJ., Paoletti, LC., Rench, MA. (2000) Use of capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine for type II group B *Streptococcus* in healthy women. *J infect Dis* 182, 1129-1138.

Banerjee, A., Kim, BJ., Carmona ,EM., Cutting, AS., Gurney, MA.(2011) Bacterial Pili exploit integrin machinery to promote immune activation and efficient blood-brain barrier penetration. *Nat Commun* 2, 462.

Beckmann, C. (2002) Identification of novel adhesins from Group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. *Infect Immun*, 70, 2869-2876.

- Bellais, S., Six, A., Fouet, A., Longo, M., Dmytruk, N., Glaser, P. (2012)** Capsular switching on Group B *Streptococcus* CC17 hypervirulent clone: a future challenge for polysaccharide vaccine development. *Journal of infectious diseases* 206, 1745-1752.
- Bennett-Lovsey, R., Hebert, A., Sternberg, M., Kelley, L. (2008)** exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins: Structure Function, Bioinformatics* 70, 611-625.
- Berg, BR., Houseman, JL., Garrasi, MA., Young, CL., Newton, DW. (2013)** Culture-based method with performance comparable to that of PCR-based methods for detection of group B *Streptococcus* in screening samples from pregnant women. *Journal of Clinical Microbiology* 4, 1253-1255.
- Brzywczy-Włoch, M., Gosiewski, T., Pawlik, D., Szumała-Kąkol, A., Samed, A., Heczko, P. (2012)** Occurrence of the hypervirulent ST-17 clone of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women and newborns. *Przeql Epidemiol* 3, 395-401.
- Bisharat, N., Crook, DW., Leigh, J., Harding, RM., Ward, PN., Coffey, TJ. (2004)** Hyperinvasive neonatal group B streptococcus has arisen from a bovine ancestor. *J Clin Microbiol* 42, 2161-2167.
- Boletín Instituto de Salud pública de Chile (2012)** Vigilancia de laboratorio enfermedad invasora *Streptococcus agalactiae*. 10, 1-20.
- Bohnsack, JF., Whiting, A., Gottschalk, M., Dunn, DM., Weiss, R., Azimi, PH. (2008)** Population structure of invasive and colonizing strains of *Streptococcus agalactiae* from neonates of six U.S. Academic Centers from 1995 to 1999. *J Clin Microbiol* 46, 1285-1291.
- Bradford, M (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brodeur, B., Boyer, M., Charlebois, I., Hamel, J., Couture, F., Rioux, CR., Martin, D. (2000)** Identification of Group B Streptococcal Sip Protein, Which Elicits Cross-Protective Immunity. *Infection and Immunity* 68, 5610-5618.
- Burns, G., Plumb, J. (2013)** GBS public awareness, advocacy, and prevention- What's working, what's not and why we need a maternal GBS vaccine. *Vaccine* 31S, 58-65.
- Byers, S., Wiles, M., Dunn, S., Taft, R. (2012)** Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. *Plos one* 7, 1-5.

Carey, A., Keong, C., Mirza, S., Irving-Rodgers, H., Webb, R., Lam, A., Uluet, G. (2014) Infection and Cellular Defense Dynamics in a Novel 17- β -Estradiol Murine Model of Chronic Human Group B Streptococcus Genital Tract Colonization Reveal a Role for Hemolysin in Persistence and Neutrophil Accumulation. *The journal of immunology* 192, 1718-1731.

Chen, V., Avci, F., Kasper, D. (2013) A maternal vaccine against group B *Streptococcus*: Past, present, and future. *Vaccine* 31S, 13-19.

CONICYT, (2009). 4° Taller de Bioética: Aspectos Bioéticos de la experimentación animal. Programa de FONDECYT y CONICYT. (4°Ed.) Santiago Chile: Andros impresiones.

Cui, Z., Tristram, S., LaScolea, J., Kwiatkowski, T., Kopti, S., Ogra, P (1991) Induction of antibody response to *Chlamydia trachomatis* in the genital tract by oral immunization. *Infect Immun* 59, 1465-1469.

De la Rosa, M., Perez, M., Carazo, C., Pareja, L., Peis, JI., Hernandez, F. (1992) New Granada Medium for Detection and Identification of Group B Streptococci. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 1019-1021.

Dermer, P., Lee, C., Eggert, J., Few, B. (2004) A history of neonatal group B streptococcus with is related morbidity and mortality rates in the United States. *Journal of Pediatrics Nursing* 19, 457-363.

Doran, K. (2002) Group B Streptococcal β -hemolysin/cytolysin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of interleukin-8. *J Infect Dis* 185, 196-203.

Edwards, M., Gonik, B. (2013) Preventing the broad spectrum of perinatal morbidity and mortality through group B streptococcal vaccination. *Vaccine* 31S, 66-71.

Edwards, MS., Nizet, V., Baker, CJ. (2011) Group B Streptococcal infections. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant 7th Edition*. 419-469.

Ernst, W., Zimara, N., Hanses, F., Mannel, D., Seelbach-Gobel, B., Wege, A. (2013) Humanized Mice, a New Model To Study the Influence of Drug Treatment on Neonatal Sepsis. *Infection and Immunity* 81, 1520-1531.

Eugenin EA, Berman JW (2003) Chemokine-dependent mechanisms of leukocyte trafficking across a model of the blood-brain barrier. *Methods* 29, 351-361.

Eugenin, EA., Branes, MC., Berman, JW., Saez, JC. (2003) TNF-alpha plus IFN-gamma induce connexin43 expression and formation of gap junctions between human monocytes/macrophages that enhance physiological responses. *Journal of immunology* 170, 1320-1328.

Eugenin EA, Clements JE, Zink MC, Berman JW (2011) Human immunodeficiency virus infection of human astrocytes disrupts blood-brain barrier integrity by a gap junction-dependent mechanism. *The Journal of Neuroscience* 31, 9456-9465.

Eugenin EA, Osiecki K, Lopez L, Goldstein H, Calderon TM, Berman JW (2006) CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 mediates enhanced transmigration of human immunodeficiency virus (HIV)-infected leukocytes across the blood-brain barrier: a potential mechanism of HIV-CNS invasion and NeuroAIDS. *Journal of Neuroscience* 26, 1098-1106.

Ferrieri, p., Burke, B., Nelson, J. (1980) Production of bacteremia and meningitis in infants rats with group B streptococcal serotypes. *Infect immune* 27, 1023-1032.

Fluegge, K., Siedler, A., Heinrich, B. Schulte-Moenting, MJ., Bartels, DB., (2006) Incidence and clinical presentation of invasive neonatal group B streptococcal infections in Germany. *Pediatrics* 117, 1139-1145.

Fry, RM. (1938) Fatal infections by hemolytic streptococcus group B. *Lancet* 1, 199-201.

Gibson, R., Nizet, V., Rubens, C. (1999) Group B streptococcal β -hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells. *Pediatr Res* 45, 626-634.

Goldman, J., Murr, A., Cooper, R. (2007) The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies. *Birth defects research* 80, 84-97.

Gondek, D., Olive, A., Stary, G., Starnbach, M. (2012) CD4+ cells are necessary and sufficient to confer protection against *C. trachomatis* infection in the murine upper genital tract. *Journal of Immunology* 189, 2441-2449.

Goldman, J., Murr, A., Cooper, R. (2007) The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies. *Birth defects research* 80, 84-97.

Guzmán, A., Abarzúa, F., Belmar, C., García, P. (2001) Resultados de la aplicación del protocolo basado en *Screening* para la búsqueda de *Streptococcus agalactiae* en el tercer

trimestre del embarazo: Posible impacto sobre la sepsis neonatal precoz por este agente. *Revista Chilena de Infectología* 18, 187-192.

Haghmorad, D., Mahmoudi, MB., Mahmoudi, M., Rab, SZ., Rastin, M., Shegarfi, H., Azizi, G., Mirshafiey, A. (2014) Calcium intervention ameliorates experimental model of multiple sclerosis. *Oman Medical Journal* 3, 185-189.

He, P., Zou, Y., Hu, Z. (2005) Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 1-45.

Heath, PT., Balfour, G., Weisner, AM., Efstratiou, A., Lamagni, TL., Tighe, H. (2004) Group B Streptococcal disease in UK and Irish infants younger than 90 days. *The Lancet* 363, 292-294.

Henneke, P., Dramsi, S., Mancuso, G., Chraibi, K., Pellegrini, E., Theilacker, C., Huber, J., Santos-Sierra, Teti, G., Golenbock, D., Poyart, C., Trieu-Cuot, P. (2014) Lipoproteins Are Critical TLR2 Activating Toxins in Group B Streptococcal Sepsis. *The Journal Immunology* 9, 6149-6158.

Hickey, D., Aldwell, F., Beagley, K. (2010) Oral immunization with a novel lipid-based adjuvant protects against genital *Chlamydia* infection. *Vaccine* 28, 1668-1672.

Hunter, SK., Andracki, ME., Krieg, AM. (2001) Biodegradable microspheres containing group B Streptococcus vaccine: immune response in mice. *Am J Obstet Gynecol* 185, 1174-1179.

Holmgren, J., Czerkinsky, C. (2005) Mucosal immunity and vaccines. *Nature medicine* 11, 45-53.

Holmgren, J., Czerkinsky, C., Lycke, N., Svennerholm, S. (1992). Mucosal immunity: implications for vaccine development. *Immunobiology* 184, 157-179

Idress, S., Ashfaq, UA., Masoud, MS., Qasim, M., Javed, T., Ali, A. (2014) Gene expression profiling of immune responsive and fibrosis genes in hepatitis C virus infected patients. *Viral Immunology* 5, 250-254.

- Jones, N., Bohnsack, J., Takahashi, S., Oliver, K., Chan, M., Kunst, F., Glaser, P., Rusniok, C., Crook, D., Harding, R., Bisharat, N., Spratt, B (2003)** Multilocus sequence typing system for Group B Streptococcus. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 2530-2536.
- Jones, N., Oliver, KA., Barry, J., Harding, RM., Bisharat, N., Spratt, BG. (2006)** Enhanced invasiveness of bovine-derived neonatal sequence type 17 group B streptococcus is independent of capsular serotype. *Clin Infect Dis* 42, 915-924.
- Kadioglu, A., Weiser, J., Paton, J., Andrew, P. (2008)** The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature* 6, 288-301.
- Kalliola, S., Vuopio-Varkila, J., Takala, AK., Eskola, J. (1999)** Neonatal group B streptococcal disease in Finland: a ten-year nationwide study. *Pediatr Infect Dis J* 18, 806-810.
- Kasper, D., Baker, CJ (1979)** Electron microscopic definition of surface antigens of group B *Streptococcus*. *J Infect Dis* 139, 147-151.
- Kelly, T., Dillard, J., Yother, J. (1994)** Effect of genetic switching of capsular type on virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity* 62, 1813-1819.
- Kim, K. (2010)** Acute bacterial meningitis in infants and children. *Lancet Infect Dis* 10, 32-42.
- Kotloff, KL., Fattom, A., Basham, L., Hawwari, A., Harkonen, S., Edelman, R. (1996)** Safety and immunogenicity of a tetravalent group B streptococcal polysaccharide vaccine in healthy adults. *Vaccine* 14, 446-450.
- Kozlowski, P (2002)** Differential induction of mucosal and systemic antibody responses in women after nasal, rectal, rectal, or vaginal immunization: influence of the menstrual cycle. *J Immunol* 169, 566-574.
- Kozlowski, P., Cu-uvin, S., Neutra, M., Flanigan, T. (1997)** Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tracts secretions of women. *Infection and Immunity* 65, 1387-1394.
- Kumar, A., Chowdhury, M., Tao, W., Singh, G. (2016)** Mucosal vaccine delivery: Current state and a pediatric perspective. *Journal of controlled release*. (in press)
- Kumar, A., Lata, H., Yadad, P., Dua, M., Yang, Y., Xu, X., Homma, A., Barrocchi, M., Bottomley, M., Saul, A., Klugman, K., Black, S. (2013)** Epidemiology of Group B *Streptococcus* in developing countries. *Vaccine* 31S, 43-45.

Lakshmi, R. (2009) Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. *Future Microbiology* 4, 201-221.

Lamy, M., Dramsi, S., Billo, A., Reglier-poupet, H. Tazi, A., (2006) Rapid detection of the “highly virulent” group B *streptococcus* ST-17 clone. *Microbes infect*8, 1714-1722.

Lancefield, RC., Hare, R. (1935) The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of hemolytic streptococci from parturient women. *J Exp Med* 61, 335-349.

Lavelle, E., O’Hagan, D. (2006) Delivery systems and adjuvants for oral vaccines. *Expert Opin. Drug Deliv* 3, 747-762.

Le Doare, K., Heath, P. (2013) An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine* 31S, 7-12.

Lee, H., Schripsema, J., Sigar, I., Murray, C., Lacy, S., Ramsey, K. (2010) A link between neutrophils and chronic disease manifestation of *Chlamydia muridarum* urogenital infection of mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 59, 108-116.

Maddi, S., Dangor, Z., Heath, P., Schrag, S., Izu, A., Sobanjo-ter, A., Dull, P. (2013) Considerations for a phase-III trial to evaluate a group B *Streptococcus* polysaccharide-protein conjugate vaccine in pregnant women for the prevention of early- and late-onset invasive disease in young-infants. *Vaccine* 31S, 52-57.

Madureira, P., Andrade, E., Gama, B., Oliveira, L., Moreira, S., Ribeiro, A., Correia-Neves, M., Trieu-Cuot, P., Vilanova, M., Ferreira, P. (2011) Inhibition of IL-10 production by maternal antibodies against Group B Streptococcus GADPH confers immunity to offspring by favoring neutrophil recruitment. *Plos One* 7, 1-14.

Magalhaes, V., Bonifácio, E., Alves, J., Ribeiro, A., Sik, K., Lima, M., Trieu-Cuot, P., Ferreira, P (2013) Group B Streptococcus Hijacks the host plasminogen system to promote brain endothelial cell invasion. *Plos One* 8, 1-11.

Maisey, H., Doran, K., Nizet, V. (2009) Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence. *Expert Rev Mol Med* 10, 1-16.

- Masques, M. (1992)** Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. *Infect immune* 60, 3986-3993.
- Manning, S., Wood, S., Kasha, K., Martin, D., Rioux, S., Brodeur, B., Davies, H. (2006)** Naturally occurring antibodies for the group B streptococcal surface immunogenic protein (Sip) in pregnant women and newborn babies. *Vaccine* 24, 6905-6912.
- Margarit, I., Rinaudo, CD., Galeotti Cl., Maione, D., Ghezzi, C., Buttazzoni, E. (2009)** Preventing bacterial infections with pilus-based vaccines: the group B streptococcus paradigm. *The Journal of Infectious Diseases* 199, 108-115.
- Martins, E., Melo-Cristino, J., Ramirez, M. (2010)** Evidence for rare capsular switching in *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Bacteriology* 192, 1361-1369.
- McGhee, J., Mestecky, M., Dertzbaugh, J., Eldridge, M., Hirasawa, M., Kiyono, H. (1992)** The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 10,75–88
- Melin, P., Efstratiou, A. (2013)** Group B streptococcal epidemiology and vaccine needs in developed countries. *Vaccine* 31S, 31-42.
- Mestecky, J. (1987)** The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J. Clin. Immunol* 7,265–276
- Milligan, G. (1999)** Neutrophils aid protection of the vaginal mucosae of immune mice against challenge with herpes simplex virus type 2. *Journal of Virology* 73, 6380-6386.
- Mitragotri, S. (2005)** Immunization without needles. *Nature Reviews Immunology* 5, 905-916.
- Montes, M., García-Arenzana, J. (2007)** Género *Streptococcus*: una revisión práctica para el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica* 24, 14-20.
- Muñoz, FM., Ferrieri, P. (2013)** Group B Streptococcus vaccination in pregnancy: Moving toward a global maternal immunization program. *Vaccine* 31S, 46-51.
- Neto, MT. (2008)** Group B streptococcal disease in Portuguese infants younger than 90 days. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 93, 90-93.
- Neutra, M., Kozlowski, P. (2006)** Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nature reviews immunol* 6, 148-158.
- Niedermeyer, T., Strohal, M. (2012)** mMass as a software tool for the annotation of cyclic peptide tandem mass spectra. *Plos One* 7, 44913

- Nizet, V. (1996)** Group B streptococcal β -hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. *Infect human* 64, 3818-3826.
- Nocard, N., Mollereau, R. (1887)** Sur une mammite contagieuse des vaches laitieres. *Ann Inst Pasteur* 1, 109-126.
- Novy, R., Morris, B. (2011)** Use of glucose to control basal expression in the pET System. *InNovations* 13, 9-11.
- Pan, S. and Malcolm, B. A. (2000)**. Reduced Background Expression and Improved Plasmid Stability with pET Vectors in BL21 (DE3). *BioTechniques* 29,1234-1238.
- Poncelet-Jasserand, E., Forges, F., Varlet, MN., Chauleur, C., Seffert, P., Siani, C., Pozzetto, B., Ros, A. (2013)** Reduction of the use of antimicrobial drugs following the rapid detection of *Streptococcus agalactiae* in the vagina at delivery by real-time PCR assay. *A International Journal of Obstetrics and Gynecology* 9, 1098-1108.
- Puopolo, K. (2014)** Current Status of Vaccine Development for Group B *Streptococcus*. *Neoreviews* 15, 430-438.
- Rajagopal, L. (2009)** Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. *Future microbiol* 4, 201-221.
- Randis, T., Gelber, S., Hooven, T., Abellar, R., Akabas, L., Lewis, E., Walker, L., Byland, L., Nizet, V., Ratner, A. (2014)** Group B Streptococcus β -hemolysin/cytolysin breaches maternal-fetal barriers to cause preterm birth and intrauterine fetal demise in vivo. *Journal of infectious diseases* 1-15.
- Rappuoli, R., Mandl, CW., Black, S., De Gregorio, E. (2011)** Vaccines for the 21st century society. *Nature Reviews Immunology* 11, 865-872.
- Rioux, S., Martin, D., Ackermann, H., Dumont, J., Hamel, J., Brodeur, BR. (2001)** Localization of Surface Immunogenic Protein on Group B Streptococcus. *Infection and Immunity* 8, 5162- 5165.
- Rojo, P., Araya, P., Martínez, MA., Hormazábal, JC., Maldonado, A., Fernández, J. (2008)** Caracterización molecular en aislados Chilenos de *Streptococcus agalactiae*. *Revista Médica de Chile* 136, 606-612.
- Rost, B., Yachdav, G., Liu, J. (2004)** The PredictProtein server. *Nucl. Acids. Res* 32, 321-326.

- Santillan, D., Rai, K., Santillan, M., Krishnamachari, M., Salem, A., Hunter, S. (2011)** Efficacy of polymeric encapsulated C5a peptidase-based group B streptococcus vaccines in a murine model. *Am J Obstet Gynecol* 3, 1-17.
- Schrag, SJ., Verani, JR. (2013)** Intrapartum antibiotic prophylaxis for the prevention of perinatal group B streptococcal disease: Experience in the United States and implications for a potential group B streptococcal vaccine. *Vaccine* 31S, 20-26.
- Scott, J., Barnett, T. (2006)** Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and How They Get There. *Annu Rev. Microbiol* 60, 397-423.
- Shibina, LV., Krasnoproschina, LI., Ordiants, IM., Slatinova, OV., Skhodova, SA. (2013)** Levels of sIgA, IgG, IgA in vaginal secretion in women with chronic inflammatory disease of small pelvis organs. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* 4, 55-59.
- Shin, H., Iwasaki, A. (2012)** A vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells. *Nature* 491, 463-467.
- Silin, D., Lyubomska, O., Jirathitikal, V., Bourinbaiar, A. (2007)** Oral vaccination: where we are?. *Expert opin. Drug deliv* 4, 323-340.
- Soto, DA., Leyton, Y., Altamirano, MJ., Soto, J., Maracaja-Coutinho, V., Rojas, R., Vasquez, AE (2016)** Uncultured Streptococcus sp. Clone GBS BIOTEC.ISPCH/2015 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ku736792>).
- Soto, MJ., Valenzuela, I., Vasquez, A., Illanes, S. (2013)** Prevention of Early-onset Neonatal Group B Streptococcal Disease. *Reviews in Obstetrics and Gynecology* 6, 63-68.
- Srinivasan, J., Tinge, S., Wright, R., Herr, J., Curtiss, R (1995)** Oral immunization with attenuated *Salmonella* expressing human sperm antigen induces antibodies in serum and the reproductive tract. *Biol. Reprod* 53, 462-471.
- Steinhoff, MC. (2013)** Assessments of vaccines for prenatal immunization. *Vaccine* 31S, 27-30.
- Strober, W (2001)** Trypan Blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*. Appendix 3.
- Strohalm, M., Hassman, M., Kasata, B., Kodicek, M. (2008)** mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 22, 905-908.

Strohalm, M., Kavan, D., Novak, P., Volny, M., Havlicek, V. (2010) m Mass 3: a cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data. *Annal Chem* 82, 4648-4651.

Teti, G., Mancuso, G., Tomasello, F. (1993) Cytokine appearance and effects of anti-tumor necrosis factor alpha antibodies in a neonatal rat model of group B streptococcal infection. *Infect. Immun.* 61, 227–235.

Van Ginkel, FW., Jackson, RJ., Yuki, Y., McGhee, JR. (2000) Cutting edge: the mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues. *J immunol* 165, 4778-4782.

Vasquez, A., Manzo, R., Soto, D., Barrientos, M., Maldonado, A., Mosqueira, M., Ávila, A., Touma, J., Bruce, E., Harris, P., Venegas, A. (2014) Oral administration of recombinant *Neisseria meningitidis* PorA genetically fused to *H.pylori* HpaA antigen increases antibody levels in mouse, suggesting that PorA behaves as putative adjuvant.

Vidová, B., Chotar, M., Godány, A. (2009) N-Terminal Anchor in Surface Immunogenic Protein of *Streptococcus agalactiae* and Its Influence on Immunity Elicitation. *Folia Microbiologica* 54, 161-166.

Wang, Z., Guo, C., Xu, Y., Liu, G., Lu, C., Liu, I. (2014) Two novel functions of hyaluronidase from *Streptococcus agalactiae* are enhancing intracellular survival and inhibition of proinflammatory cytokine expression. *Infection and Immunity* 6, 2615-2625.

Wachtel, M., Frei, K., Ehler, E., Fontana, A., Winterhalter, K., Gloor, S. (1999) Occludin proteolysis and increased permeability in endothelial cells through tyrosine phosphatase inhibition. *Journal of cell science* 112, 4347-4356.

Whidbey, C., Harrell, M., Burnside, K., Ngo, L., Becraft, A., Iyer, L., Arabind, L., Hitti, J., Adams, K., Rajagopal, L. (2013) A hemolytic pigment of Group B *Streptococcus* allow bacterial penetration of human placenta. *The Journal of Experimental Medicine* 10, 1265-1281.

Wilkinson, HW. (1977) CAMP-disk test for presumptive identification of group B streptococci. *Journal of Clinical Microbiology* 6. 42-45.

Wennkamp, J., Henneke, P. (2008) Induction and termination of inflammatory signaling in group B streptococcal sepsis. *Immunological reviews* 225, 114-127.

Xue, G., Yu, L., Li, S., Shen, X. (2010) Intranasal immunization with GBS Surface protein Sip and ScpB induces specific mucosal and systemic immune responses in mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 58, 202-210.

Zheng, H., Gong, S., Hou, S., Zou, Q., Zhong, G. (2012) Identification of Antigen-Specific Antibody Responses Associated with Upper Genital Tract Pathology in Mice Infected with *Chlamydia muridarum*. *Infection and Immunity* 3, 1098-1106.



INFORME DE RESULTADO N° 116

Subdepartamento Genética
Molecular

RG-250.03-005
PR-250.01-028

Rev.: 3

ANTECEDENTES DE LAS MUESTRAS

Estudio Solicitado : Subtipificación molecular de *S. agalactiae* por MLST
Solicitante : Daniel Soto
Tipo de Muestra : DNA
Procedencia : Lab. Biotecnología
Dirección : Av. Marathon # 1000 - Ñuñoa
Anexo : 255512
Folio : 057
Fecha de Ingreso : 03/02/2015
Fecha de informe : 13/02/2015

RESULTADOS

Envío análisis de MLST realizado a una cepa de *S. agalactiae*:

Numero laboratorio ISP	Nombre paciente	Apellido paterno paciente	Apellido materno paciente	Procedencia de la muestra	GENES MLST							ST	Complejo Clonal
					adhP	pheS	atr	glnA	sdhA	glcK	tkk		
BIO-01-15	NO PROCEDE	NO PROCEDE	NO PROCEDE	BIOTECNOLOGIA ISP	2	1	1	2	1	1	1	17	CC 17

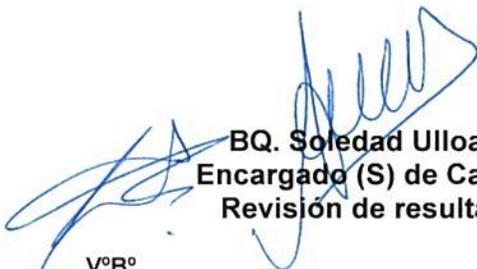
Observaciones:

- ✓ El análisis mediante MLST determinó que la cepa BIO-01-15 presentó el ST 17, perteneciente al CC 17.

Método utilizado

Amplificación por PCR de genes de Multilocus (MLST).
 Purificación del ADN mediante PEG8000/ o por columna
 Secuenciamiento automático 3130
 Análisis Bioinformático y determinación del tipo de ST según base de datos internacional: <http://pubmlst.org/sagalactiae/>
 Análisis mediante software PHYLOViZ 1.0

Saluda atentamente a usted,


BQ. Soledad Ulloa U.
 Encargado (S) de Calidad
 Revisión de resultado

V°B°
JLB




BQ. Javier Tognarelli S.
 Jefe (S) Subdepto. Genética Molecular
 Aprobación de resultado

Resultado N° 116 (13/02/2015)
Cc: Genética molecular