



**Universidad de Concepción
Facultad Farmacia**

**DESARROLLO DE UN MODELO MURINO DE SEPSIS
POR INFECCION CON CEPA SGB KU736792 DE
*Streptococcus agalactiae***

POR GUILLERMO MIGUEL ANTONIO MUÑOZ BRIONES

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor Guía

Dr. Abel Vásquez Veloso
Instituto de Salud Pública de Chile

Profesor patrocinante:

Dr. Andrés Opazo Capurro
Universidad de Concepción

Profesor co-Guía

Dr. Alexis Kalergis Parra
Pontificia Universidad Católica de Chile

Septiembre, 2022

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

INDICE

Resumen	5
1. Introducción	9
1.1 Sepsis	9
1.2 Sepsis Neonatal	10
1.3 <i>Streptococcus agalactiae</i> : Generalidades	11
1.4 <i>Streptococcus agalactiae</i> en mujeres gestantes y neonatos	12
1.5 <i>Streptococcus agalactiae</i> y estrategias terapéuticas	14
1.6 <i>Streptococcus agalactiae</i> en adultos no gestantes	16
1.7 Chile y <i>Streptococcus agalactiae</i>	17
1.8 Vacunas contra <i>Streptococcus agalactiae</i>	19
1.9 Modelos Animales	20
1.10 Modelo Murino de Sepsis	22
1.11 Modelo Murino de Sepsis por <i>Streptococcus agalactiae</i>	26
2. Hipótesis	27
3. Objetivo General	27
4. Objetivos Específicos	27
5. Metodología	28
5.1 Determinar condiciones de cultivo de cepa SGB 736792 de <i>Streptococcus agalactiae</i>	28
5.1.1 Aislamiento de cepa SGB KU736792 de <i>Streptococcus agalactiae</i>	28
5.1.2 Determinación de cinética bacteriana de cepa SGB KU736792.	31
5.2 Implementar infección de <i>Mus musculus</i> por cepa SGB KU 736792 de <i>Streptococcus agalactiae</i>	32
5.2.1 Infección de cepas BALB/c, C57BL/6 Y CF-1 con cepa SGB KU736792	32
5.2.2 Curva de supervivencia	33
5.2.3 Recuento Bacteriano en Tejidos.	33
5.2.4 Evaluación de signos clínicos de temperatura y peso	35

5.2.6	Establecer dosis y via de infecci3n por SGB KU 736792	36
5.2.7	Curva de Sobrevida	37
5.2.8	Recuento Bacteriano	37
5.2.9	Evaluacion Clinica	39
6.	Resultados	40
6.1	Determinar condiciones de cultivo de cepa SGB 736792 de <i>Streptococcus agalactiae</i>	40
6.1.1	Aislamiento de cepa SGB KU736792 de <i>Streptococcus agalactiae</i>	40
6.1.2	Determinacion de cinetica bacteriana de cepa SGB KU736792	42
6.2	Implementar infecci3n de <i>Mus musculus</i> por cepa SGB KU 736792 de <i>Streptococcus agalactiae</i>	43
6.2.1	Infectar cepas BALB/c, C57BL/6 Y CF-1 con cepa SGB KU73679: curva de Sobrevida	43
6.2.2	Recuento Bacteriano en Tejidos.	48
6.2.3	Evaluaci3n Cl3nica de los animales	57
7.	Discusi3n	62
8.	Bibliograf3a	67

INDICE DE TABLAS

5-1	Grupos experimentales, utilizados en la infección de cepas BALB/c, C57BL/6 Y CF-1 con cepa SGB KU736792	Pág.29
5-2	Grupos experimentales utilizados para establecer dosis y vía de infección por SGB KU 736792	Pág.32
5-3	Tabla de Kaplan-meier para determinación de dosis y vía de infección de modelo murino	Pág.40
5-4	Tabla de Kaplan-meier para infección de cepas BALB/c, C57BL/6 y CF-1 con cepa SGB KU736792	Pág.42
5-5	Peso (g) promedio diario de grupos experimentales en la determinación de dosis y via de infección	Pág.54
5-6	Temperatura (°C) promedio diario de grupos experimentales en la determinación de dosis y via de infección.	Pág.56

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1.	Prevalencia de colonización SGB por país, ajustado a sitio de muestreo y método de cultivo de laboratorio	Pág.11
Figura2.	Colonización maternal SGB en el esquema de infección de SGB	Pág.12
Figura3.	Incidencia de EOD y LOD de SGB en áreas del núcleo activo de vigilancia bacteriana entre 1990-2008 e implementación de medidas de prevención de infección SGB.	Pág.14
Figura4.	Principales condiciones médicas subyacentes en pacientes adultos no gestantes con infección invasiva SGB entre 1998 y 2007 en USA	Pág.15
Figura5.	Numero de cepas y muestras de PCR de <i>Streptococcus agalactiae</i> aislado de enfermedad invasora por grupos de edad. Chile, 2014-2018”	Pág.16
Figura6.	Ventajas del uso de <i>Mus musculus</i> como animal de laboratorio	Pág.22
Figura7.	Categorías de modelos murinos de sepsis, según tipo de agente causal, ventajas y desventajas.	Pág.24
Figura8.	Score Clínico para determinación de punto final humanitario	Pág.34
Figura9.	Score Clínico para determinación de punto final humanitario	Pág.38
Figura10.	Placas de agar para identificación bacteriana de <i>Streptococcus agalactiae</i>	Pág.40
Figura11.	Curva de Crecimiento de SGB KU736792	Pág.41
Figura12.	Curva de sobrevida para grupos experimentales en la determinación de dosis y vía de inoculación	Pág.44
Figura13.	Curva de Sobrevida para grupos experimentales en la infección de cepas BALB/c, C57BL/6 y CF-1.	Pág.46

- Figura14. Recuento bacteriano de *Streptococcus agalactiae* en UFC/mL estimadas de placas de agar sangre sembradas con macerado de cerebros de ratones infectados con SGB KU736792 en la determinación de dosis y vía Pág.47
- Figura15. Recuento bacteriano de *Streptococcus agalactiae* en UFC/mL estimadas de placas de agar sangre sembradas con macerado de pulmón de ratones infectados con SGB KU736792 en la determinación de dosis y vía. Pág.49
- Figura16. Recuento bacteriano de *Streptococcus agalactiae* en UFC/mL estimadas de placas de agar sangre sembradas con macerado de riñón de ratones infectados con SGB KU736792 en la determinación de dosis y vía. Pág.50
- Figura17. Recuento bacteriano de *Streptococcus agalactiae* en UFC/mL estimadas de placas de agar sangre sembradas con sangre de ratones infectados con SGB KU736792 en la determinación de dosis y vía.. Pág.51
- Figura18. Recuento bacteriano de *Streptococcus agalactiae* en UFC/mL estimadas de placas de agar sangre con macerado de cerebros de ratones infectados con SGB KU736792 para grupos experimentales en la infección de cepas BALB/c, C57BL/6 y CF-1. Pág.52
- Figura19. Recuento bacteriano de *Streptococcus agalactiae* en UFC/mL estimadas de placas de agar sangre con macerado de pulmón de ratones infectados con SGB KU736792 para grupos experimentales en la infección de cepas BALB/c, C57BL/6 y CF-1. Pág.53
- Figura20. Recuento bacteriano de *Streptococcus agalactiae* en UFC/mL estimadas de placas de agar sangre con macerado de riñón de ratones infectados con SGB KU736792 para grupos experimentales en la infección de cepas BALB/c, C57BL/6 y CF-1. Pág.54
- Figura21. Recuento bacteriano de *Streptococcus agalactiae* en UFC/mL estimadas de placas de agar sangre con sangre de ratones infectados con KU736792 para grupos experimentales en la infección de cepas BALB/c, C57BL/6 y CF-1. Pág.55

- Figura22. Variación de la temperatura (°C) promedio de grupos experimentales en la determinación de dosis y vía infección con SGB KU736792 desde la inoculación hasta el día de eutanasia Pág.58
- Figura23. Variación del peso (g) promedio de grupos experimentales en la determinación de dosis y vía infección con SGB KU736792 desde la inoculación hasta el día de eutanasia Pág.60

Resumen

Streptococcus agalactiae o *Streptococcus* Grupo B (SGB) es una bacteria cocácea, Gram positiva y se agrupa en cadenas de largo variable. Es el principal patógeno causante de sepsis neonatal a nivel mundial y un patógeno emergente causante de enfermedad invasora en adultos no gestantes sanos y con patología de base, siendo un problema de salud pública global. La tasa de colonización del tracto genito-urinario de mujeres gestantes se estima entre 11-35% y está relacionada con parto prematuro y muerte fetal, además de neumonía, meningitis y sepsis maternal. Dado su relevancia en salud pública, la Organización Mundial de la Salud insta la búsqueda de nuevos candidatos a vacunas para este microorganismo. SGB presenta distintos factores de virulencia que le permiten colonizar e infectar al hospedero, los cuales se estudian como posibles blancos terapéuticos para la generación de vacunas contra este patógeno. En este estudio se implementó un modelo *in vivo* de sepsis utilizando la cepa SGB KU 736792 en modelo murino según el modelo de Administración exógena de patógenos viables, en las cepas C57/BL/6 y BALB/c confirmado por recuento bacteriano de riñón, pulmón, cerebro y sangre y mediante análisis Kaplan Meier. Este modelo puede ser utilizado para el estudio y ensayo de antígenos proteicos con potencial terapéutico contra *Streptococcus agalactiae* en cuadros severos de infección invasiva como sepsis maternal. Además, se constituye como una base para el desarrollo de modelo animal para sepsis fetal y neonatal.

1. Introducción

1.1 Sepsis

Se estima que, durante 2017, 49 millones de personas sufrieron sepsis y cerca de 11 millones de muertes son atribuidas a esta condición, representando casi la quinta parte del total de muertes anuales a nivel mundial (Rudd *et al*, 2020). El término “sepsis” fue usado por primera vez por Hipócrates en siglo IV a.c. como el proceso en el cual la carne se descompone y las heridas se infectan (Neira-Sánchez *et al*, 2016). Desde entonces el concepto ha evolucionado, siendo Sepsis-3 la definición consenso más actualizada, la cual describe como una disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta desregulada del huésped a la infección y propone la puntuación SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) para definir los criterios clínicos que identifican a los pacientes que cursan con sepsis y permite clasificarlos según la severidad en sepsis y shock séptico (Singer *et al*, 2016). Existe marcada disparidad regional en cuanto a mortalidad e incidencia de sepsis, observándose una relación inversa entre el nivel de ingresos de un país y la epidemiología de sepsis, siendo los países con bajos y medianos ingresos (LMIC's por sus siglas en inglés) aquellos con tasas más altas y menor información disponible. Debido a la amenaza a la salud pública global que implica este cuadro, en 2017, la Asamblea Mundial de la Salud adoptó la resolución de mejorar la prevención, diagnóstico y manejo clínico de sepsis estableciendo como áreas prioritarias de trabajo el fortalecimiento de los programas de salud asociados, investigación, desarrollo y generación de evidencia relacionadas con sepsis,

innovación y acción colectiva global que permitan disminuir las muertes neonatales y maternas asociadas con sepsis (OMS, 2020).

1.2 Sepsis Neonatal

En neonatos, la sepsis se denomina sepsis de inicio temprano (EOS por siglas en inglés) al desarrollo del cuadro dentro de las primeras 72 horas en neonatos hospitalizados en Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales (NICU por sus siglas en inglés) y desde el día 0 al 6 desde el nacimiento, en neonatos de término. Este cuadro se caracteriza por la transmisión vertical del patógeno, asociado al parto. También se presenta como sepsis de desarrollo tardío (LOS por sus siglas en inglés) después de las 72 primeras horas de nacido en neonatos hospitalizados en NICU y desde el día 7 hasta los 90 días de nacido en recién nacidos de término (Simonsen et al, 2014). Según cifras de la OMS cerca de 20 millones del total (41%) anual de casos de sepsis se da en menores de 5 años y se estiman 3,9 millones de casos de sepsis neonatal anuales, con tasas de mortalidad que varían entre 11 y 19% (*Fleischmann-Struzek et al*, 2018) (OMS, 2020). El principal agente etiológico de sepsis neonatal es SGB que junto a *E. coli* acumulan cerca del 70% de los casos totales globales de EOS (*Shah et al*, 2014).

1.3 *Streptococcus agalactiae*: Generalidades

SGB es una bacteria cocácea, Gram positiva que se agrupa en pares o en cadenas de largo variable (Schuchat 1999). Microbiológicamente es catalasa, oxidasa y PYR negativo, Test de Camp positivo y presencia de antígenos Grupo B de Lancefield en pruebas de aglutinación con látex, además, en agar granada, específico para su detección, se observan colonias naranjas en cultivos positivos (ISPCh, 2019). Sus colonias son de alrededor de 2mm, lisas y con un pequeño halo de β -hemólisis en agar sangre, siendo esto último un criterio básico en su detección. Fue registrado como patógeno humano por primera vez en 1938 (Fry, 1938) aunque sin muchos reportes hasta 1960, década en que se posiciona definitivamente como el principal agente causal de sepsis en Estados Unidos (Hood et al, 1961).

Se han descrito diez serotipos en función del polisacárido capsular, los cuales comprenden Ia-Ib, y II-IX (Paoletti et al 2019). El 98% de los serotipos globales de aislados maternos de SGB a nivel mundial corresponden a los serotipos Ia-Ib, II, III, IV y V. El serotipo III, relacionado con infección invasiva, concentra un 25% del total mundial, aunque es menos común en regiones asiáticas, lo que se asocia con la menor prevalencia de colonización maternal en dicha región geográfica (Russell et al, 2017). Más aun, el serotipo III se relaciona con el Complejo Clonal 17 (CC-17) el cual se ha denominado “hipervirulento” debido a la alta incidencia global en casos de infección invasiva y meningitis en infantes y adultos no gestantes (Musser et al, 1989).

1.4 *Streptococcus agalactiae* en mujeres gestantes y neonatos

La colonización recto-vaginal de la mujer es el principal factor de riesgo para el desarrollo de infección maternal, fetal y neonatal de SGB. Estudios multivariados estiman la carga global de colonización maternal de SGB en 18%, presentando variaciones geográficas (**Figura 1**). Así, existen regiones con baja prevalencia de colonización por SGB, como el Sudeste de Asia que presenta un 11-13% y otras zonas de alta prevalencia como el Caribe con 35%. Se atribuye la menor prevalencia en la colonización maternal asiática a la baja presencia de serotipos altamente invasivos. Sin embargo, la irregularidad de los reportes de dicha región también estaría implicadas en estas cifras (Russell *et al*, 2017).

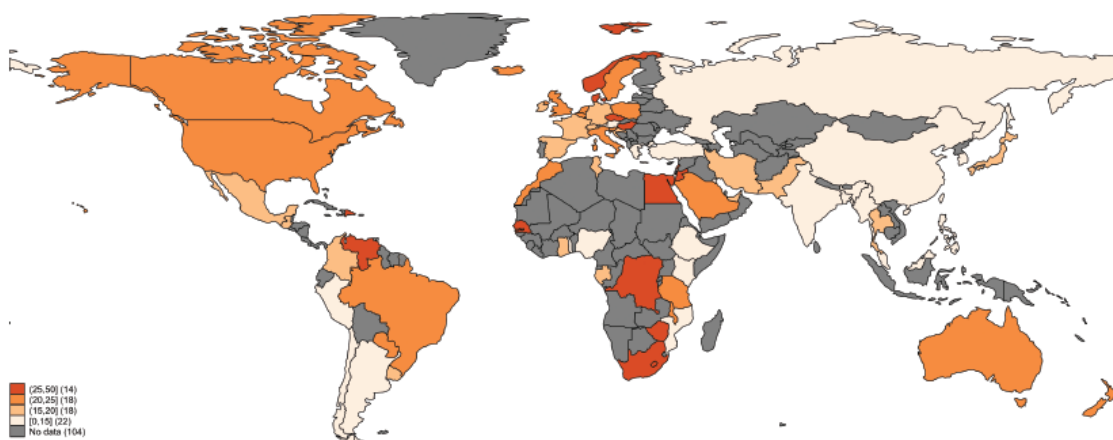


Figura 1 **Prevalencia de colonización SGB por país, ajustado a sitio de muestreo y método de cultivo de laboratorio.** Adaptado de “Maternal Colonization With Group B *Streptococcus* and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses.” por Russel *et al*, 2017, Clinical Infectious Diseases, 2.

La infección ascendente de SGB puede ocasionar distintos cuadros clínicos como infección maternal, fetal y neonatal con posibilidades de muerte maternal, mortinatos y EOS y meningitis en neonatos, además de sepsis y meningitis maternal (Hall *et al*, 2017) (Seale *et al*, 2017:2) (Madrid *et al*, 2017). En aquellos casos que superan la infección pueden quedar secuelas y existir desarrollo neurológico dispar, encefalopatía neonatal y discapacidad (Tann *et al*, 2017) (Kohli-Lynch *et al*, 2017)

Figura 2.

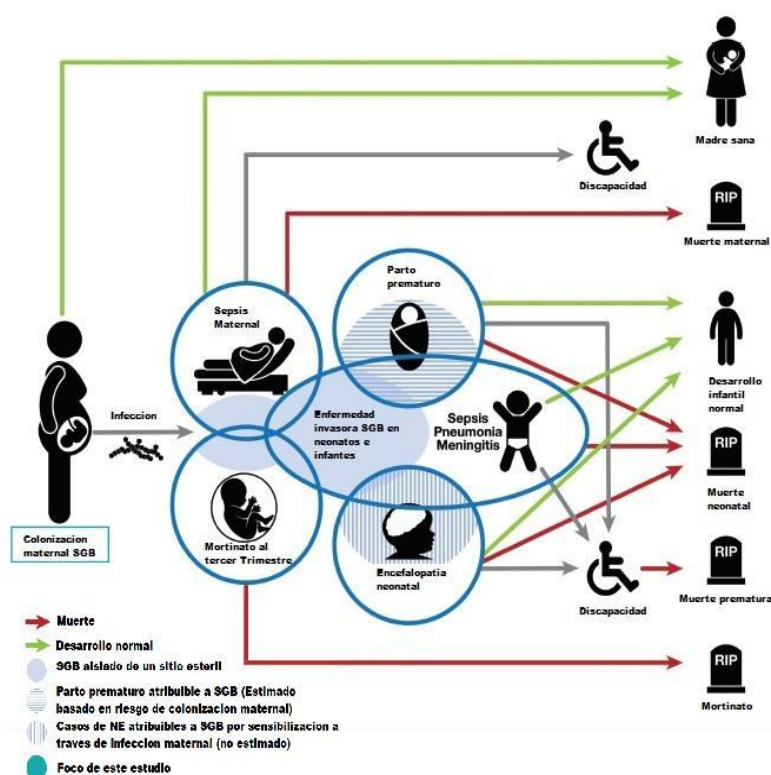


Figura 2 Colonización maternal SGB en el esquema de infección de SGB. Adaptado de “Maternal Colonization With Group B *Streptococcus* and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses.” por Russel *et al*, 2017, Clinical Infectious Diseases, 2.

En neonatos se presenta como Enfermedad de Inicio Temprano (EOD por sus siglas en Ingles) la cual se manifiesta durante los primeros 6 días de nacimiento y que se caracteriza por cursar con neumonía y sepsis. Este cuadro clínico es causado generalmente por transmisión vertical del patógeno al feto, debido a su paso por el canal del parto de una mujer colonizada. También puede presentarse como Enfermedad de Inicio Tardío (LOD por sus siglas en inglés) que se manifiesta desde el día 7 al 90 después del parto y cursa con sepsis y meningitis. La transmisión del patógeno para cuadros tardíos no está completamente dilucidada, pero se asume transmisión horizontal de SGB adquirido posterior al parto, siendo la lactancia o portación nasofaríngea de SGB de la madre, el personal médico o individuos que están en estrecho contacto con el neonato como causas probables. (Melin & Efstratiou, 2013).

1.5 *Streptococcus agalactiae* y estrategias terapéuticas

Desde 1996 el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos, recomienda la evaluación de factores de riesgo y posterior administración de profilaxis antibiótica intraparto (PAI) para disminuir la incidencia del patógeno (CDC, 1996). La baja eficiencia y limitaciones de la estrategia basada en factores de riesgo en la prevención de infecciones por SGB, hicieron que desde 2002 la CDC optara por recomendar método basado en cultivo, a través del tamizaje universal de SGB en mujeres gestantes entre las 35-37 semanas y aplicación de PAI en cultivo positivo de SGB, siendo esta estrategia la más usada en países de

altos ingresos (HIC's por sus siglas en inglés) (CDC, 2002). Aquellas mujeres gestantes con cultivo positivo para SGB son tratadas, en el momento de inicio del trabajo de parto, con penicilina en casos normales y con eritromicina/clindamicina cuando existe alergia a la penicilina. En general, las cepas de SGB se mantienen susceptibles a los antibióticos de primera línea, aunque existen datos de CMI aumentadas para todos los antibióticos y de aumento en la tasa de resistencia a eritromicina y clindamicina a nivel mundial, lo cual representa una debilidad de la estrategia terapéutica (Tsai *et al*, 2019) (do Nascimento *et al*, 2018). La implementación de PAI influyó radicalmente en la disminución de las tasas de EOD por SGB a nivel mundial, aunque las tasas de LOD se mantienen con poca o nula variación **Figura 3** (CDC, 2010).

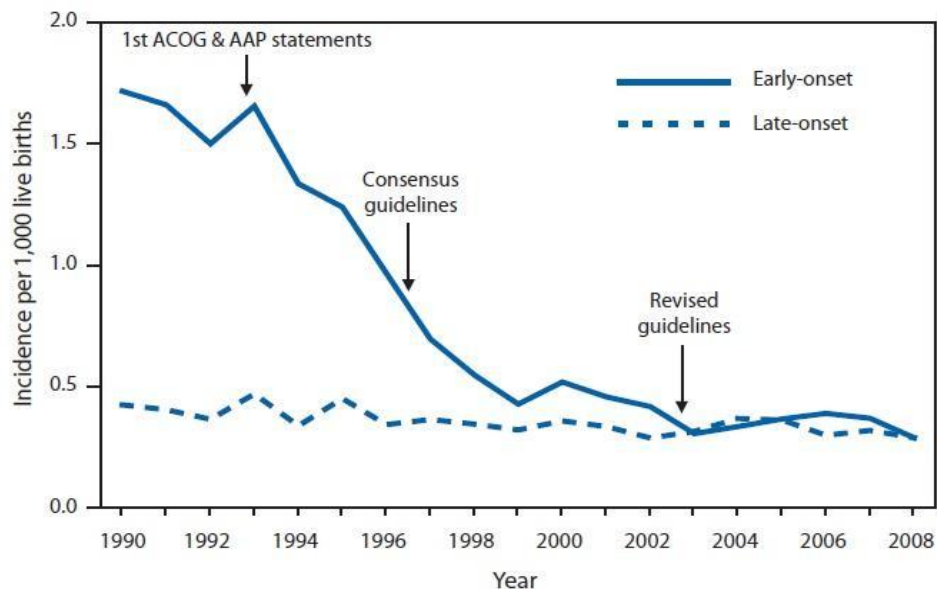


Figura 3 Incidencia de EOD y LOD de SGB en áreas del núcleo activo de vigilancia bacteriana entre 1990-2008 e implementación de medidas de prevención de infección SGB. Adaptado de "Prevention of perinatal group B streptococcal disease: revised guidelines from CDC", por CDC, 2002, MMWR, 11.

1.6 *Streptococcus agalactiae* en adultos no gestantes

SGB coloniza la mucosa intestinal de adultos no gestantes. SGB es oportunista y se ha posicionado como un patógeno emergente causante de infección invasiva en adultos sanos y principalmente en adultos con patología de base e inmunodeprimidos. Dentro de las principales condiciones médicas subyacentes en pacientes adultos no gestantes con infección SGB destacan las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), siendo diabetes mellitus la enfermedad más frecuente en pacientes no gestantes que presentan infección por SGB (Trivalle *et al*, 1998) (Perovic *et al*, 1999). Incluso en algunos países las tasas de incidencia en adultos prácticamente se han duplicado (Skoff *et al*, 2009), llegando a representar más del 50% de las infecciones invasivas totales de SGB en U.S.A **Figura 4** (Farley *et al*, 2001).

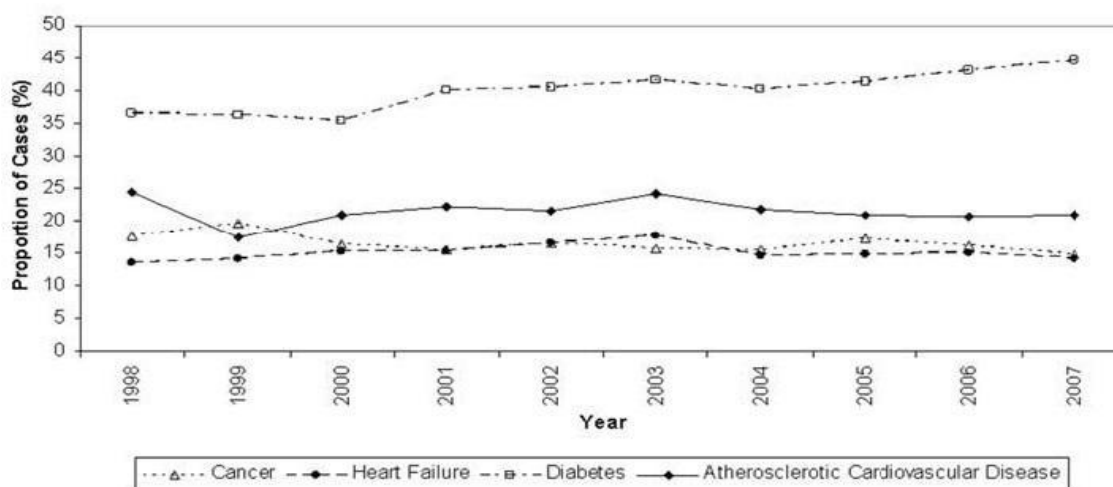


Figura 4 Principales condiciones médicas subyacentes en pacientes adultos no gestantes con infección invasiva SGB entre 1998 y 2007 en USA. Adaptado de "Increasing Burden of Invasive Group B Streptococcal Disease in Nonpregnant Adults, 1990–2007" por Skoff *et al*, 2009, Clinical Infectious Diseases.

1.7 Chile y *Streptococcus agalactiae*

El Instituto de Salud Pública de Chile (ISPCh) es el Laboratorio Nacional y de Referencia y encargado de la confirmación de SGB como enfermedad invasora según lo dicta el Reglamento sobre Notificación de Enfermedades Transmisibles de Declaración Obligatoria (ENO) D.S. N°158/2004 y es el responsable de evaluar la sensibilidad antimicrobiana de este microorganismo, caracterizar las cepas molecularmente y serotipar los aislados confirmados. El último boletín de vigilancia de laboratorio elaborado por el ISPCh que considera el periodo 2014 - 2018 confirmó 932 casos de SGB, superando al periodo 2009 - junio 2014 en casi 200 casos. De estos el 43,9% correspondieron a cepas provenientes de menores de 1 año, seguido de los grupos sobre 50 años (**Figura 5**).

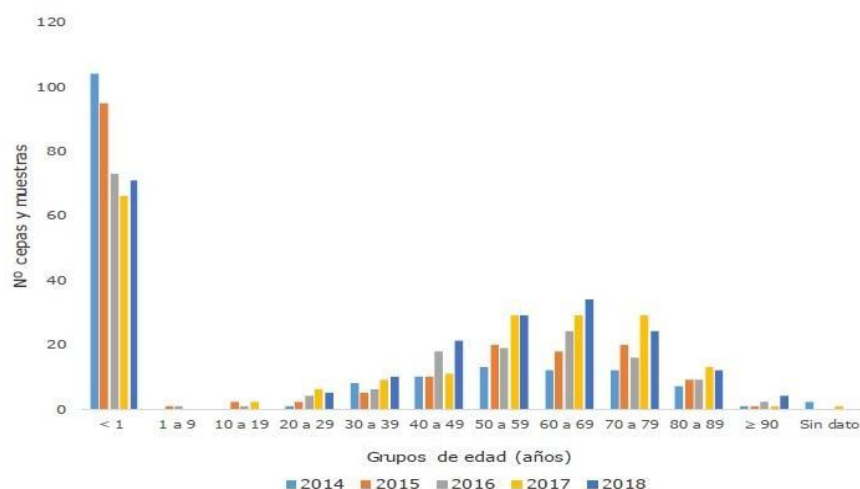


Figura 5 *Numero de cepas y muestras de PCR de Streptococcus agalactiae aislado de enfermedad invasora por grupos de edad. Chile, 2014-2018*". Extraído de "Vigilancia de Laboratorio enfermedad invasora Streptococcus agalactiae" por ISP-Chile, 2019, Boletín de vigilancia epidemiológica, 9.

El serotipo III fue el más frecuente (43,03%) seguido del Ia (21,08%) y Ib (14,05%) respectivamente. Destaca además la aparición de serotipos VI, VII y VIII, propios de Asia y poco frecuentes en la región americana. Según el boletín de vigilancia, en el periodo 2014-2018 todas las cepas analizadas resultaron sensibles a penicilina, pero se registra una disminución en la susceptibilidad a eritromicina y clindamicina, registrándose una resistencia de 16 y 15% respectivamente (ISPCh, 2019). El boletín no considera estudios de clonalidad mediante MLST o PFGE y no existen publicaciones al respecto en la literatura disponible. Además, el boletín se limita a realización de análisis y confirmación a cepas implicadas en infección invasiva, sin presentar datos de vigilancia y tamizaje para cepas no invasivas. El boletín no utiliza un plan de muestreo estadístico para la recolección de datos y las herramientas estadísticas aplicables en el análisis son limitadas, advirtiendo que no se puede realizar análisis inferencial sobre estos datos. Es relevante destacar que las cepas de SGB reportadas son aisladas de casos invasivos lo cual representa un panorama muy reducido de las cepas circulantes en el panorama nacional. Lo anterior contrasta con el desarrollo de vacunas enfocadas contra ese patógeno, las que tienen como población mujeres gestantes colonizadas.

1.8 Vacunas contra *Streptococcus agalactiae*

SGB presenta distintas estructuras que son de interés en la elaboración de vacunas. Estos componentes han sido considerados potenciales blancos terapéuticos debido a su importancia en la patogénesis bacteriana y la capacidad de generar anticuerpos en estudios preclínicos de modelo animal (Nuccitelli *et al*, 2015). Los antígenos polisacáridos de la cápsula han sido ensayados como candidatos a vacunas monovalentes, pero presentan problemas debido a su pobre inmunogenicidad. Vacunas polivalentes conjugadas de polisacárido capsular (PCV-CPS por sus siglas en inglés) soslayan los problemas de inmunogenicidad y su espectro de acción abarca a cepas de distinto serotipo, siendo una mejor alternativa para el tratamiento de SGB. La empresa Novartis ha desarrollado una PCV trivalente de nombre CRM197. Esta vacuna considera los serotipos Ia, Ib y III y se encuentra en fase Ib/II de estudios clínicos (NCT01193920). En infantes nacidos de mujeres gestantes vacunadas con CRM197 se observan altos niveles de anticuerpos específicos anti-CPS (Madhi *et al*, 2017). También se encuentra en fase I de estudios clínicos (NCT03170609) la vacuna hexavalente de Pfizer que considera los serotipos Ia, Ib, II, III y V, con buenos resultados (Kobayashi *et al*, 2016). Si bien las vacunas multivalentes se encuentran bien estudiadas en términos de seguridad e inmunogenicidad, el fenómeno denominado cambio capsular (“serotype switching”) (Bellais *et al*, 2012) (Luan *et al*, 2005) (Martins *et al*, 2010), el aumento en el reporte de cepas no encapsuladas, la interferencia inmune con otras vacunas, la escasa información respecto de los clones circulantes en los países con LMIC’s (Russell *et al*, 2017) son limitaciones en el desarrollo de este tipo de vacunas, lo que ha

impulsado la investigación de factores de virulencia y proteínas conservadas de SGB como posibles blancos de estudio que superen estas variables. En esta línea, MinervaX Inc. recientemente anuncio que su vacuna proteica basada en la fusión del dominio N-terminal de la proteína Alpha C altamente inmunogénico y la proteína Rib (SGB-NN) mostró resultados positivos en ensayos fase I en 240 mujeres adultas sanas, inmunizadas con 1 o 2 dosis de la vacuna SGB-NN. Luego de la vacunación, mostraron un aumento de hasta 30 veces más anticuerpos específicos SGB-NN comparados con los niveles pre-inmunización (MinervaX, 2017). Además, existen numerosas proteínas en fases preclínicas de investigación como posibles candidatos a vacunas de amplio espectro que sobrepasen las dificultades que han surgido en las vacunas anteriores (Rajagopal *et al*, 2009) (Paoletti *et al*, 2019). Al no existir vacunas licenciadas ni alternativas a PAI, es de suma urgencia la búsqueda de vacunas que den luces de una estrategia que permita combatir infecciones invasivas de SGB.

1.9 Modelos Animales

El uso de animales de laboratorio y la implementación de modelos biológicos es una de las mejores opciones para estudiar las múltiples alteraciones fisiopatológicas asociadas a una enfermedad (Wong *et al*, 2015). Estos modelos animales pueden ser clasificados según su origen en modelos inducidos, transgénicos, espontáneos y negativos (Gómez *et al*, 2010) (Montero *et al*, 2008). En la literatura, existen modelos animales de enfermedades neurodegenerativas (Wong *et al*, 2015), autoinmunes (Merino *et al*, 2008), infecciosas (Gómez *et al*, 2010) bien

caracterizados y disponibles para su uso en el estudio de mecanismos celulares y moleculares que operan en el funcionamiento normal de un órgano, la producción de una enfermedad, la acción de un fármaco, entre otras.

Las conclusiones que se extraen de los estudios con modelos animales no siempre son extrapolables a los seres humanos, lo cual debe ser considerado al momento de su uso en metodologías de investigación (Storz *et al*, 2017) (Merino *et al*, 2008) (Poli do Figueiredo *et al*, 2008). Los modelos que apuntan a reproducir fisiopatologías relacionada con la mayoría de los sistemas del organismo (nervioso, inmunitario, endocrino, etc.) guardan mucha semejanza entre los mamíferos, aunque con diferencias que impiden considerar una extrapolación a secas de los resultados. En modelos donde el protocolo experimental involucra a microorganismos patógenos, causantes de enfermedades infecciosas e implicados directa o indirectamente en enfermedades inmunes, estas diferencias se tornan más evidentes (Merino *et al*, 2008).

Paralelamente junto con el desarrollo de la investigación aplicada la sociedad está cada vez más sensibilizada en materia de bienestar animal, por esta razón a fines de la década de los años cincuenta se elaboró la teoría de Russel y Burch que se ha convertido en la base de la bioética. Esta teoría plantea cómo instrumentar medidas para disminuir o eliminar los aspectos no humanitarios de la experimentación animal para este fin se incorporó el “concepto de las 3 R”. “R” de reducción, usar el menor número de individuos por modelo experimental, sacando la mayor cantidad de información posible. “R” de reemplazo, sustituir cada vez que

sea posible el uso de animales por otros métodos experimentales. Y “R” de refinamiento, minimizar el dolor y estrés que puedan sufrir los animales durante su utilización (Russel *et al*, 1959) (Mrad de Osorio *et al*, 2006). Comités institucionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio velan que aquellos diseños experimentales que consideren el uso animal respeten normas internacionales existentes, ejemplo, la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del National Reasearch Council (NRC, 2008), (Mrad de Osorio *et al*, 2006).

1.10 Modelo Murino de Sepsis

La literatura disponible sobre modelos animales de sepsis describe metodologías desarrolladas en mamíferos como *Canis familiaris*, *Ratus ratus*, *Mus musculus* (Archer *et al*, 1976), (Iovino *et al*, 1968), (Mathiak *et al*, 2000) los cuales se someten a distintos tratamientos para desarrollar la sepsis. *Mus musculus* es utilizado como modelo animal en todo el mundo debido a sus características, de las cuales destaca su acelerado ciclo de vida, madurez sexual entre las 6 y 8 semanas, bajo costo de mantención en términos económicos y de cuidados, un genoma bien caracterizado y cepas transgénicas que hacen posible la investigación de enfermedades con resultados sólidos y extrapolables al ser humano (Stortz *et al*, 2017), (Chiavolini *et al*, 2008), (Iovino *et al*, 1968). **Figura 6**



Figura 6 Ventajas del uso de *Mus musculus* como animal de laboratorio. Adaptado de “Maternal Colonization With Group B *Streptococcus* and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses.” por Russel *et al*, 2017, Clinical Infectious Diseases, 2.

En ratones, existen 3 de categorías de sepsis en función del agente causal. La **Administración exógena de toxina**, comúnmente agonista de Receptores del Tipo Toll (TLR por sus siglas en inglés) como zymosan o el LipoPoliSacarido (LPS) es comúnmente usada para inducir esta condición. También se usa la **Administración exógena de patógenos viables**, normalmente bacterias en orden variable de concentración, con distintas vías de administración, siendo la cavidad peritoneal la más frecuente. Los procedimientos que involucran **Disrupción quirúrgica de la barrera protectora endógena**, destruyen parcial y controladamente las barreras normales del tracto gastrointestinal, simulando la secuencia natural que ocurre en la clínica. Con diferencias, se posicionan como aquellas que presentan mayores grados de similitud en cuanto a la fisiopatología de sepsis intr.-abdominal humana se refiere. (Figura 7)

Estos aspectos metodológicos consensuados contrastan con la holgura de definiciones de sepsis que en algunos modelos animales producen un pequeño grado de infección latente que puede durar por días o semanas, mientras que otros describen un proceso furioso que produce muerte dentro de un par de horas. En efectos prácticos, se habla de modelo de sepsis en referencia a una infección aguda donde un animal está enfermo debido a infección invasiva, (Wichterman *et al*, 1979), (Poli do Figueiredo *et al*, 2008) (Stortz *et al*, 2008)

TIPOS DE MODELO MURINO DE SEPSIS	EJEMPLO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE TOXINA	INYECCIÓN DE BOLO DE AGONISTAS TLR (ZYMOSAN O LPS)	Facilidad técnica y respuesta inflamatoria reproducible. Respuesta Trimodal al zymosan: -Resultado Crónico -Bajo grado de inflamación -Falla orgánica	Sensibilidad a toxina varía entre especies La respuesta a toxinas es de vida corta.
	ADMINISTRACIÓN CONTINUA DE LPS	Reproduce estado cardiovascular hiperdinámico de sepsis	Respuesta inflamatoria transiente
ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE PATÓGENO VIABLE	INOCULACIÓN DE BACTERIA VIVA	Facilidad Técnica Involucra un solo organismo que puede ser seleccionado por el operador Reproduce muchas de las características del shock séptico	A menudo no lleva a colonización ni reproducción de la bacteria Respuesta inmune puede variar dependiendo de la cepa bacteriana Involucra una sola bacteria, mientras que la sepsis intra-abdominal es a menudo poli microbiana
	IMPLANTACIÓN DE COAGULO CON FIBRINA Y BACTERIA VIVA	Fibrina demora la absorción sistémica de la bacteria atrapada en el coagulo, promoviendo el desarrollo de un foco local de sepsis Promueve sepsis polimicrobiana	
DISRUPCIÓN DE LA BARRERA PROTECTORA ENDÓGENA	LIGACIÓN Y FUNCIÓN CECAL (CLP)	Combina necrosis del tejido y sepsis polimicrobiana, similar a lo observado en humanos. Produce una respuesta inmune, hemodinámica y bioquímica similar a la humana.	Variabilidad inter-laboratorio e inter-operador Variabilidad por Edad y Cepa
	PERITONITIS STENT DE COLON ASCENDENTE (CASP)	Produce sepsis polimicrobiana y peritonitis difusa El operador puede ajustar la severidad	Técnicamente, más desafiante que CLP Respuesta hemodinámica menos caracterizada

Figura 7. Categorías de modelos murinos de sepsis, según tipo de agente causal, ventajas y desventajas.

Adaptado de “Murine Models of Sepsis and Trauma: Can We Bridge the Gap?” por Stortz et al., ILAR Journal

1.11 Modelo Murino de Sepsis por *Streptococcus agalactiae*

La literatura ofrece modelos murinos para distintos cuadros clínicos de SGB. Su diversidad transita de modelos de infección neonatal (Bonifacio *et al*, 2018), colonización vaginal (Soto *et al*, 2018), Modelo de Meningitis (Lentini *et al*, 2018), Modelo de Sepsis (Buscetta *et al*, 2016) con potencialidades que van desde la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos de infección y respuesta del hospedero, el descubrimiento de nuevos antígenos candidatos a vacuna y ensayos pre-clínicos que den información respecto de seguridad y eficacia. Sin embargo, contrasta la situación nacional, pues, salvo iniciativas como las del laboratorio de la Sección de Biotecnología, los reportes de modelos animales son pobres. El desarrollo de un Modelo de Sepsis por Infección SGB brindaría una valiosa herramienta para futuros estudios relacionados con estrategias terapéuticas para combatir SGB.

2. Hipótesis

La inoculación con cepa *SGB 736792* de *Streptococcus agalactiae* es capaz de desarrollar Sepsis en individuos de *Mus musculus*

3. Objetivo General

Desarrollar un modelo murino de sepsis por infección de cepa *SGB 736792* de *Streptococcus agalactiae*

4. Objetivos Específicos

- Determinar condiciones de cultivo de cepa *SGB 736792* de *Streptococcus agalactiae*
- Implementar infección de *Mus musculus* por cepa *SGB 736792* de *Streptococcus agalactiae*

5. Metodología

5.1 Determinar condiciones de cultivo de cepa SGB 736792 de *Streptococcus agalactiae*

Para la elaboración del modelo de sepsis se utilizará la cepa bacteriana de SGB KU 736792 (Soto *et al*, 2018) obtenida desde un aislado clínico, propiedad del Laboratorio de la Sección de Biotecnología, del Departamento de Salud Ambiental del ISPCh. Esta cepa pertenece al serotipo III altamente invasivo y al Complejo Clonal 17 (CC-17) denominado hipervirulento. Se aislará y caracterizará mediante pruebas bioquímicas y se determinará la cinética de crecimiento bacteriano, estableciendo las condiciones de cultivo a utilizar en el objetivo específico posterior

5.1.1 Aislamiento de cepa SGB KU736792 de *Streptococcus agalactiae*

Para la obtención de colonias aisladas de SGB se tomó 1 asada de respaldos de la cepa bacteriana de SGB KU 736792 (Soto *et al*, 2018) y se sembró por estría en placas de agar sangre de cordero al 5%. Luego, las placas se incubaron a 36°C y microaerofilia por 16-18 horas. Cuando fue necesario se incubó la placa 48 horas o incluso 72 horas si se requiere un reisolamiento. Después de la incubación, se seleccionó colonias de SGB que presentaran un pequeño halo de beta-hemolisis para la confección de respaldos bacterianos de la cepa SGB utilizados en experimentos posteriores. Mediante tinción de Gram, se buscó cocáceas Gram positivas agrupadas en cadena de largo variable o pares.

Esto se complementó con test de CAMP para la identificación de SGB. Fue descrito por primera vez en 1944 por Christie, Atkins y Munch-Petersen, y la prueba CAMP es un acrónimo de sus nombres. La actividad hemolítica de la β -hemolisina producida por la mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* se ve aumentada por la proteína extracelular producida por los estreptococos del grupo B. La interacción de la β -hemolisina con el factor CAMP produce una hemólisis potenciada (o sinérgica), que se observa como punta de flecha. Es una técnica confiable y que es fácil de realizar, además es un fenómeno que se aprecia tanto en cepas de SGB β y γ hemolítica. El factor CAMP se encuentra codificado por el gen *cfb* y corresponde a una proteína extracelular descubierta que se une a la β -hemolisina que hidroliza la esfingomielina que poseen los eritrocitos. Para ello, en una placa de agar sangre cordero al 5%, se sembró una estría de respaldo bacteriano de SGB perpendicularmente a una estría de *Staphylococcus aureus* sembrada previamente. Como control negativo, se sembró perpendicularmente una estría de *Listeria spp.* Se consideraron positivas aquellas que ensanchan su halo de beta-hemólisis en forma de flecha en la zona cercana a *S. aureus*.

También se utilizó agar Granada(AG) (GRAN; marca Biomerieux) el cual es un agar selectivo y diferencial; selectivo ya que permite el crecimiento de SGB inhibiendo otras bacterias que puedan estar presentes; y diferencial porque las cepas β -hemolíticas de SGB producen colonias de color naranja a salmón, por su parte, las cepas de SGB γ -hemolíticas no producen pigmentación en este medio. La coloración de las colonias se debe al pigmento propio del microorganismo,

granadaeno, un polieno asociado a rhamnosa y ornitina. Esta pigmentación es específica y no ocurre con otros microorganismos, ni siquiera con otros del género *Streptococcus*. Sin embargo, algunos microorganismos como *Enterococcus* y levaduras no son inhibidas y son capaces de crecer en el medio. Se consideró cultivo positivo la aparición de colonias anaranjadas. Para esto, se sembró una asada de respaldo bacteriano de SGB en Agar Granada y se incubó a 37°C por 48. Se sembraron controles negativos y positivos con cepas de referencia y se controló el estado de las placas sin sembrar. Se consideró cultivo positivo la aparición de colonias anaranjadas.

Otro método agar Cromo-Strep B (Agar Cromo-StrepB, marca: Valtek Diagnostics) es un medio selectivo y diferencial (al igual que AG) ya que cuenta con inhibidores que impide el desarrollo de bacterias no deseadas y que puedan estar presentes en la muestra, haciéndolo selectivo para SGB; pero la diferencia está en el concepto de diferencial, ya que cuenta con sustratos para diversas reacciones enzimáticas que permiten obtener colonias pigmentadas de color malva cuando se trata de SGB, las cuales serán de este color independiente de la capacidad de hemólisis que posea la bacteria, es decir, crecen colonias de color malva cepas de SGB β y γ -hemolíticas. Otras bacterias que pudiesen crecer en el agar tomarán una pigmentación azul como *Enterococcus spp.* rosa pálido (algunos como *Lactococcus spp.* o *Lactobacillus spp.*) o simplemente serán incoloras. Algunas veces *Streptococcus pyogenes* genera falsos positivos, presentando colonias color malva; sin embargo, esta situación es poco probable y se descarta a través de pruebas

rápidas como aglutinación en látex o PYR, siendo *S. pyogenes* es PYR positivo y SGB es PYR negativo. Para este trabajo, se sembraron muestras de respaldo bacteriano de SGB, además de control positivo, negativo y de placa, a 37° C, por 18-24hrs en aerobiosis. Se consideró cultivo positivo para la identificación de SGB aquellas colonias pigmentadas color lila o color malva pálido.

5.1.2 Determinación de cinética bacteriana de cepa SGB KU736792.

Posteriormente se determinó la cinética de crecimiento de la cepa SGB KU736792. Lo anterior, se realizó en medio de cultivo Todd Hewitt (TH), medio clásico para cultivos de *Streptococcus* cuya formulación disminuye la degradación de proteínas generadas por la bacteria bajo la acción de ácidos. El medio TH empleado para este estudio corresponde a Bacto™ Todd Hewitt Broth, BD cuya fórmula por litro de agua purificada contiene: 3.1 g de infusión de corazón, 20 g de peptonas, 2 g de dextrosa, 2 g de cloruro sódico, 0.4 g de fosfato sódico y 2.5 g de carbonato sódico.

Se emplearon 100 ml de medio TH en agitación constante a 220 rpm y 37°C. Se comenzó a tiempo 0 (T0) con un inóculo inicial de 2 ml de cultivo bacteriano en estado estacionario. Cada 20 minutos se colectó desde el matraz 1 ml de cultivo cuya absorbancia fue medida en el Espectrofotómetro (marca Thermo Scientific, modelo Evolution 60) a 600nm. Con los valores registrados en 12 tiempos (por

duplicado) se construyó la curva de cinética de crecimiento bacteriano y se determinó la DO_{600nm} para la fase logarítmica de SGB.

5.2 Implementar infección de *Mus musculus* por cepa SGB KU 736792 de *Streptococcus agalactiae*

5.2.1 Infección de cepas BALB/c, C57BL/6 Y CF-1 con cepa SGB KU736792

Una vez establecida la cinética de crecimiento de la cepa a utilizar, se procedió a infectar individuos de las cepas BALB/c, C57BL/6 Y CF-1 de *Mus musculus* y comprobar establecimiento de infección por recuento bacteriano de macerados de órganos y que presentaron diferencias significativas en su porcentaje de sobrevivencia respecto del control PBS 1X. También se usará como criterio variación de signos (peso/temperatura) o presencia de síntomas asociados a inflamación según score clínico. Para lo anterior, se formarán 2 grupos de 8 ratones cada uno, de las cepas C57BL/6, BALB/c y 2 grupos compuestos por 4 ratones cada uno de las cepas CF-1 y BALB/c respectivamente. Las ratonas de los primeros 3 grupos serán inyectadas por vía e.v. con 10⁷ UFC/mL de SGB KU736792 contenidos en 50 µL de PBS-1X. El cuarto grupo será inyectado con 50 µL de PBS-1X como control. Se buscarán signos de sepsis como movimientos erráticos, letargo, problemas motores por 5 días y se realizará score clínico para eutanasiar en caso de ser necesario. Los ratones sobrevivientes serán eutanasiados al 5º día.

5.2.2 Curva de supervivencia

La curva Kaplan-Meier será construida según bibliografía. Brevemente, se generará una tabla con tiempos seriales de cada ratón, estado al tiempo serial y grupo al que pertenece el ratón. Para efectos de este estudio, se considerará como evento la muerte del ratón. Luego, se ingresarán estos datos en el software GraphPad Prism 9.0.0 ® y se realizará curva de Kaplan-Meier y test Log-Rango.

TABLA 1

Grupos experimentales, utilizados en la infección de cepas BALB/c, C57BL/6 Y CF-1 con cepa SGB KU736792

Grupo	Cepa	Nº de Ratones	Vía	Dosis Infecciosa (UFC/mL)
1	C57BL/6	8	e.v.	10 ⁷
2	BALB/c	8	e.v.	10 ⁷
3	CF-1	4	e.v.	10 ⁷
4 (control)	BALB/c	4	e.v.	-

5.2.3 Recuento Bacteriano en Tejidos.

Para confirmar la infección invasiva, se hará recuento bacteriano determinando el número de UFC/mL mediante el método de diluciones seriadas desde

homogeneizados de cerebro, pulmón y riñón y diluciones seriadas de muestras de sangre tomada de los ratones eutanasiados. Las muestras serán diseminadas en placas de agar sangre de cordero/tripticase de soya y serán incubadas en estufa a 37°C con 5% de CO₂ durante 16 hrs. Una vez incubadas, se escogerán aquellas placas que presenten 20-200 colonias, de 2mm de diámetro, aspecto liso y con un estrecho halo de β-hemolisis. Luego se calculará UFC/mL, según la siguiente formula:

$$UFC = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias} \times \text{Dilucion}}{0.1mL}$$

Luego, se procederá a tabular los recuentos bacterianos y a normalizar los datos en base a logaritmo en base 10. Después, se utilizará dicha tabla para graficar y analizar los distintos grupos de estudio. Esto será realizado con el software GraphPad Prism 9.0.0 ® y se utilizó un test ANOVA de una vía para análisis estadístico.

5.2.4 Evaluación de signos clínicos de temperatura y peso

Con la intención de confirmar la sepsis de los ratones, se controlará la temperatura y se monitoreará el peso de los animales cada día hasta llegar al día de la eutanasia. Tomando como base score clínico, se utilizarán estas variables para punto final humanitario.

SCORE CLINICO MODELO MURINO DE SEPSIS			
Signos/síntomas a evaluar	Observación	Puntuación	Monitoreo
Peso corporal	-Sin disminución	0	Diario
	-Disminución <10%	1	
	-Disminución entre 10-20%	2	
	-Disminución >20%.	3	
Aspecto	-Postura normal, pelaje lustroso	0	Diario
	-Pelaje hirsuto. Secreción porfirica (roja) en nariz/ojos.	1	
	-Encorvado, inmóvil en un rincón, abúlico, pelaje hirsuto, secreción porfirica nariz/ojos	2	
	-Postrado decúbiteo lateral, deshidratación evidente. Enoftalmia	3	
Comportamiento	-Comportamiento normal, atento al medio, interactúa con pares, se acicala.	0	Diario
	-Comportamiento levemente alterado, Movilidad reducida, hiperventilado, se queda en un rincón.	1	
	-Comportamiento alterado: inactivo, retraído o tambaleante.	2	
	-Respiración abdominal.	3	
Temperatura	-Animal inmóvil, postrado decúbiteo lateral. Abre boca al respirar	0	Diario
	-Temperatura normal (36,5-38°C)	1	
	-Fiebre >39°C	2	
	-Hipotermia >34°C	3	
	-Hipotermia 34°C o menor (eutanasia)	0	
		1	
		2	
		3	

Figura 8. Score Clínico para determinación de punto final humanitario

5.2.5 Establecer dosis y vía de infección por SGB KU 736792

Con el objetivo de determinar concentración y vía de inóculo infeccioso, se prepararán inóculos bacterianos de SGB KU736792 de concentraciones 10^5 , 10^6 , 10^7 UFC/mL totales en 50 μ L de PBS-1X, los cuales serán inyectados en 24 ratones BALB/c vía intraperitoneal (i.p.) o vía endovenosa (e.v.) según dice la Tabla 2.0. Como control negativo, 3 ratones BALB/c serán inoculados con 50 μ L PBS-1X. i.p. y 3 ratones BALB/c serán inoculados con 50 μ L de PBS-1X e.v. Se buscarán signos de sepsis como movimientos erráticos, letargo, problemas motores por 5 días desde la infección y se realizará score clínico para eutanasiar en caso de ser necesario. Los ratones sobrevivientes serán eutanasiados al 5º día

TABLA 2

Grupos experimentales utilizados para establecer dosis y vía de infección por SGB KU 736792

Grupo	Dosis Infecciosa (UFC/mL)	Nº de ratones	Tipo de ratón	Vía de Infección
1	10^5	3	BALB/c	3 (i.p)
2	10^6	3	BALB/c	3 (i.p)
3	10^7	3	BALB/c	3 (i.p)
4	Control PBS-1X	3	BALB/c	3 (i.p)
5	10^5	3	BALB/c	3 (e.v)
6	10^6	3	BALB/c	3 (e.v)
7	10^7	3	BALB/c	3 (e.v)
8	Control PBS-1X		BALB/c	3 (e.v)
TOTAL:		24		

5.2.6 Curva de Sobrevida

Se evaluará la sobrevida y la dosis optima de inoculo construyendo curva de Kaplan Meier y se realizará test log-rango para evaluar diferencias estadísticas entre una vía y otra y entre las distintas dosis. La curva Kaplan-Meier será construida según bibliografía. Brevemente, se generará una tabla con tiempos seriales de cada ratón, estado al tiempo serial y grupo al que pertenece el ratón. Para efectos de este estudio, se considerará como evento la muerte del ratón. Luego, se procesarán estos datos en el software Graphpad Prism 9 y se realizará curva de Kaplan-Meier y test Log-Rango.

5.2.7 Recuento Bacteriano

Para confirmar la infección invasiva, se hará recuento bacteriano determinando el número de UFC/mL mediante el método de diluciones seriadas desde homogeneizados de cerebro, pulmón y riñón y diluciones seriadas de muestras de sangre tomada de los ratones eutanasiados. Las muestras serán diseminadas en placas de agar sangre de cordero/tripticase de soya y serán incubadas en estufa a 37°C con 5% de CO₂ durante 16 hrs. Una vez incubadas, se escogerán aquellas placas que presenten 20-200 colonias, de 2mm de diámetro, aspecto liso y con un estrecho halo de β -hemolisis. Luego se calculará UFC/mL, según la siguiente formula:

$$UFC = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias } \times \text{ Dilucion}}{0.1mL}$$

Luego, se procederá a tabular los recuentos bacterianos y a normalizar los datos en base a logaritmo en base 10. Después, se utilizará dicha tabla para graficar y analizar los distintos grupos de estudio. Esto será realizado con el software GraphPad Prism 9.0.0 ® y se utilizó un test ANOVA de una vía para análisis estadístico.

5.2.8 Evaluación Clínica

Con la intención de confirmar la sepsis de los ratones, se controlará la temperatura y se monitoreará el peso de los animales cada día hasta llegar al día de la eutanasia. Tomando como base score clínico, se utilizarán estas variables para punto final humanitario.

SCORE CLINICO MODELO MURINO DE SEPSIS			
Signos/síntomas a evaluar	Observación	Puntuación	Monitoreo
Peso corporal	-Sin disminución	0	Diario
	-Disminución <10%	1	
	-Disminución entre 10-20%	2	
	-Disminución >20%.	3	
Aspecto	-Postura normal, pelaje lustroso	0	Diario
	-Pelaje hirsuto. Secreción porfirica (roja) en nariz/ojos.	1	
	-Encorvado, inmóvil en un rincón, abúlico, pelaje hirsuto, secreción porfirica nariz/ojos	2	
	-Postrado decúbito lateral, deshidratación evidente. Enoftalmia	3	
Comportamiento	-Comportamiento normal, atento al medio, interactúa con pares, se acicala.	0	Diario
	-Comportamiento levemente alterado, Movilidad reducida, hiperventilado, se queda en un rincón.	1	
	-Comportamiento alterado: inactivo, retraído o tambaleante. Respiración abdominal.	2	
	-Animal inmóvil, postrado decúbito lateral. Abre boca al respirar	3	
Temperatura	-Temperatura normal (36,5-38°C)	0	Diario
	-Fiebre >39°C	1	
	-Hipotermia >34°C	2	
	-Hipotermia 34°C o menor (eutanasia)	3	

Figura 9. Score Clínico para determinación de punto final humanitario

6. Resultados

6.1 Determinar condiciones de cultivo de cepa SGB 736792 de *Streptococcus agalactiae*

6.1.1 Aislamiento de cepa SGB KU736792 de *Streptococcus agalactiae*

Se confirmó identidad de la cepa SGB KU736792 utilizando agar sangre, observando colonias beta-hemolíticas de aproximadamente 2 mm de ancho. Al observar colonias al microscopio por Tinción de Gram, se observan colonias cocáceas Gram positivas agrupadas en cadenas de largo variable. Los controles sin sembrado no presentaron desarrollo de colonias, mientras que los controles negativos desarrollaron colonias no hemolíticas. Siguiendo la misma línea, los controles positivos SGB presentaron colonias blancas, opacas, lisas, beta-hemolíticas de 0,3 a 2mm. Todos los respaldos bacterianos estudiados, fueron positivos para beta-hemolisis en agar sangre, como se observa en la **FIGURA 10, A.**

Todos los respaldos bacterianos fueron positivos para test de CAMP para la identificación de SGB, presentando ensanchamiento en halo de beta-hemolisis en forma de flecha en la zona cercana a *S. aureus* como se aprecia en la **FIGURA 10, B.** Los controles negativo *Listeria spp.* no presentaron ensanchamiento.

También se utilizó agar Granada como test de identificación. Todos los respaldos bacterianos fueron positivo para la identificación de SGB, presentando colonias

anaranjadas. Los controles negativos sembrados con *E. faecalis* presentaron colonias incoloras mientras que el control de placa no se observó desarrollo de colonias como se aprecia en la **FIGURA 10, C**.

Respecto de las muestras sembradas en agar Cromo-StrepB, todos los respaldos bacterianos fueron positivo para la identificación de SGB, presentando colonias color lila o malva. Los controles negativos sembrados con *E. faecalis* presentaron colonias azules mientras que el control de placa no se observó desarrollo de colonias como se aprecia en la **FIGURA 10, D**.

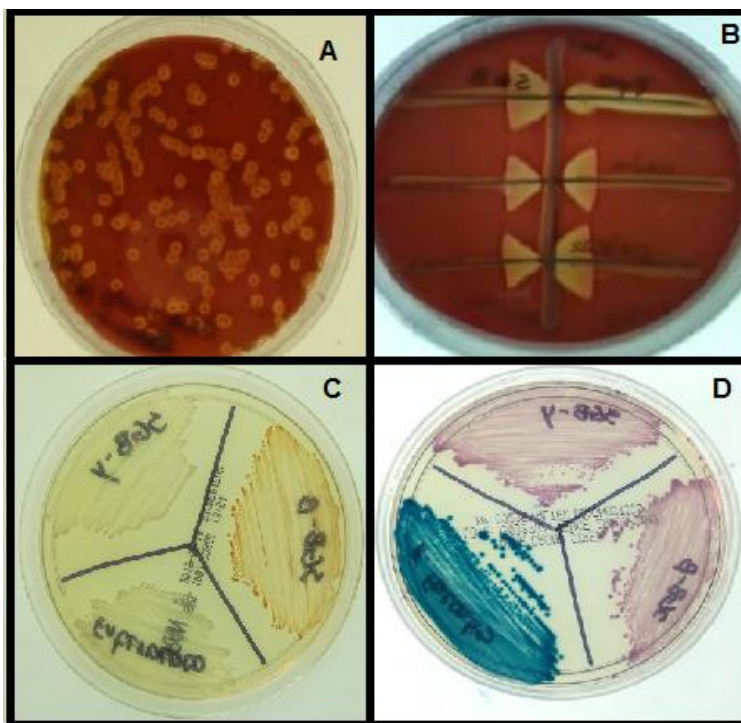


Figura 10. Placas de agar para identificación bacteriana de Streptococcus agalactiae. A. Placa de agar sangre sembrada con respaldo bacteriano de cepa SGB KU736792. Se observan colonias beta-hemolíticas. *B.* Placa de Agar sangre con Test de CAMP realizado a respaldos bacterianos de SGB. Zona de ensanchamiento es considerada CAMP positivo. *C.* Placa de agar granada con controles de siembra. Colonias incoloras son negativas mientras que colonias anaranjadas son positivas para SGB. *D. Placa de Cromo agar*

6.1.2 Determinación de cinética bacteriana de cepa SGB KU736792

Se estandarizó la condición *in vitro* gracias a la cinética de crecimiento realizada para esta bacteria según se describió en materiales y métodos. Se determinó que a una densidad óptica a 600nm (DO_{600} nm) entre 0.5 y 0.6 SGB se encuentra en fase exponencial de crecimiento **FIGURA 11**. Por lo tanto, para la expresión *in vitro* se tomaron las muestras desde los matraces con cultivos de SGB KU736792 en medio TH cuando se alcanzaba dicha DO_{600} .

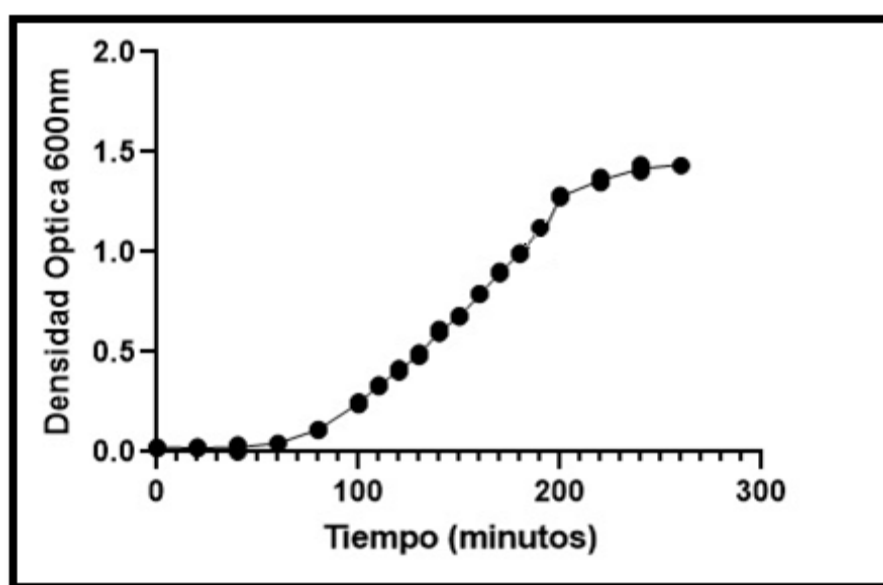


Figura 11. Curva de Crecimiento de SGB KU736792. UFC/mL $DO_{0.6-0.7} = 3,4 \times 10^7$ UFC/mL.

Con la cinética de crecimiento de SGB KU736792 ya determinada, se establecieron las condiciones de cultivo a utilizar en los experimentos sucesivos. Se preparó pre-inoculo bacteriano en 5mL de medio TH con 10 μ L o una asada de respaldo bacteriano de SGB KU736792 en glicerol al 50%, incubando a 37°C en 220 rpm de

agitación por 16 horas. Posteriormente se tomarán 2.0mL de inóculo bacteriano preparado y se trasvasaron a 100mL de medio TH contenidos en matraz de 500mL. El contenido se cultivó a 37°C en 220 rpm hasta que la solución alcanzó una DO_{600} de 0,5-0,6, momento en el cual la bacteria se encuentra en fase logarítmica y con máxima capacidad metabólica. En este punto, se detuvo el crecimiento y se procedió a generar diluciones seriadas de 1.0×10^4 , 1.0×10^5 , 1.0×10^6 UFC/mL que fueron utilizados en la implementación del modelo de sepsis e *in vitro*

6.2 Implementar infección de *Mus musculus* por cepa SGB KU 736792 de *Streptococcus agalactiae*

6.2.1 Infectar cepas BALB/c, C57BL/6 Y CF-1 con cepa SGB KU73679: curva de Sobrevida

Una vez estandarizadas las condiciones de cultivo de SGB KU736792 se evaluó dosis y vía de infección. Para esto, se analizó la sobrevida de los ratones infectados mediante curva Kaplan-Meier. Una vez infectados, se realizó la siguiente **TABLA 3**. Esta tabla se compone de 3 columnas las cuales facilitaron su uso en la confección de la curva Kaplan-Meier.

TABLA 3

**Tabla de Kaplan-Meier para determinación de dosis y vía de infección de
modelo murino**

Tiempo serial (días)	Estado al tiempo serial (0=censurado, 1= evento)	Grupo	Tiempo serial (días)	Estado al tiempo serial (0=censurado, 1= evento)	Grupo
5	0	1	5	0	5
5	0	1	5	0	5
5	0	1	5	0	5
5	0	2	5	0	6
5	0	2	5	0	6
5	0	2	5	0	6
2	1	3	4	1	7
5	1	3	4	1	7
3	1	3	5	1	7
5	0	4	5	0	8
5	0	4	5	0	8
5	0	4	5	0	8

Una vez construida la tabla, se ingresaron los datos en el software GraphPad Prism 9.0.0® y se construyó curva Kaplan-Meier, utilizando test Log-Rango. Se obtuvieron los siguientes resultados:

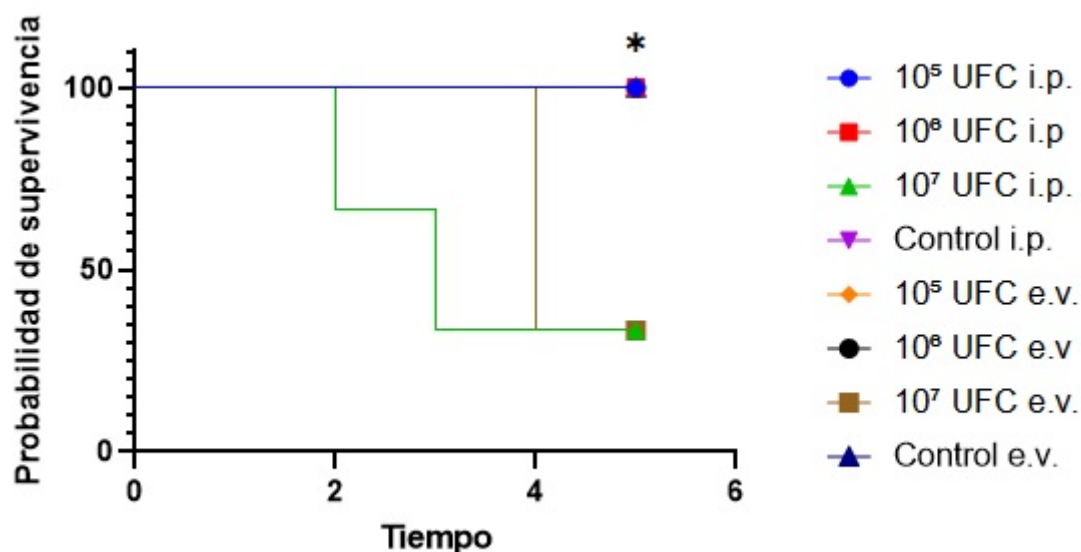


Figura 12. Curva de supervivencia para grupos experimentales en la determinación de dosis y vía de inoculación. En el gráfico se observa el porcentaje de supervivencia de cada grupo de ratones infectados y los controles, cada día después de inoculados hasta el día de eutanasia. Los datos fueron procesados con el software estadístico GraphPad Prism 9.0.0® usando la función “Survival Analysis”

De todos los grupos evaluados, se registran individuos muertos antes de tiempo de eutanasia o punto final humanitario en los grupos 10⁷ UFC endovenoso e intraperitoneal. Los grupos 10⁵ UFC i.p./e.v. 10⁶ UFC i.p./e. v no presentaron individuos muertos antes de eutanasia o en punto final humanitario. Luego de ingresar los datos y al construir la curva de supervivencia, el software entrega el gráfico representado en la **FIGURA 12.** además de calcular Log-Rango para las distintas condiciones. El resultado arrojó un valor $p = 0,0158$ lo que implica

diferencias significativas en los porcentajes de sobrevivencia de los grupos 10^7 UFC endovenoso/intraperitoneal en comparación con el grupo control PBS-1X i.p./e.v. y los grupos 10^5 UFC i.p/e.v. 10^6 UFC i.p./e.v. respectivamente. No existe diferencia significativa entre los grupos 10^7 i.p. y 10^7 e.v.

Además, se evaluó la idoneidad de las distintas cepas para la implementación del modelo de sepsis, usando la cepa SGB KU736792, también a través de una curva Kaplan-Meier. Para lo anterior, se generó la **TABLA 4**, siguiendo los pasos mencionados para **TABLA**

TABLA 4

Tabla de Kaplan-meier para infección de cepas BALB/c, C57BL/6 y CF-1 con cepa SGB KU736792

Tiempo serial (días)	Estado al tiempo serial	Grupo	Tiempo serial (días)	Estado al tiempo serial	Grupo
2	1	1	5	0	3
2	1	1	5	0	3
3	1	1	5	0	3
3	1	1	5	0	3
3	1	1	5	0	4
5	1	1	5	0	4
5	1	1	5	0	4
5	1	1	5	0	4
1	1	2	-	-	-
3	1	2	-	-	-
3	1	2	-	-	-
4	1	2	-	-	-
5	1	2	-	-	-
5	1	2	-	-	-
5	1	2	-	-	-
5	1	2	-	-	-

Una vez construida la tabla, se ingresaron los datos en el software GraphPad Prism 9.0.0®, se construyó curva Kaplan-Meier y se realizó un test Log-Rango obteniendo los siguientes resultados:

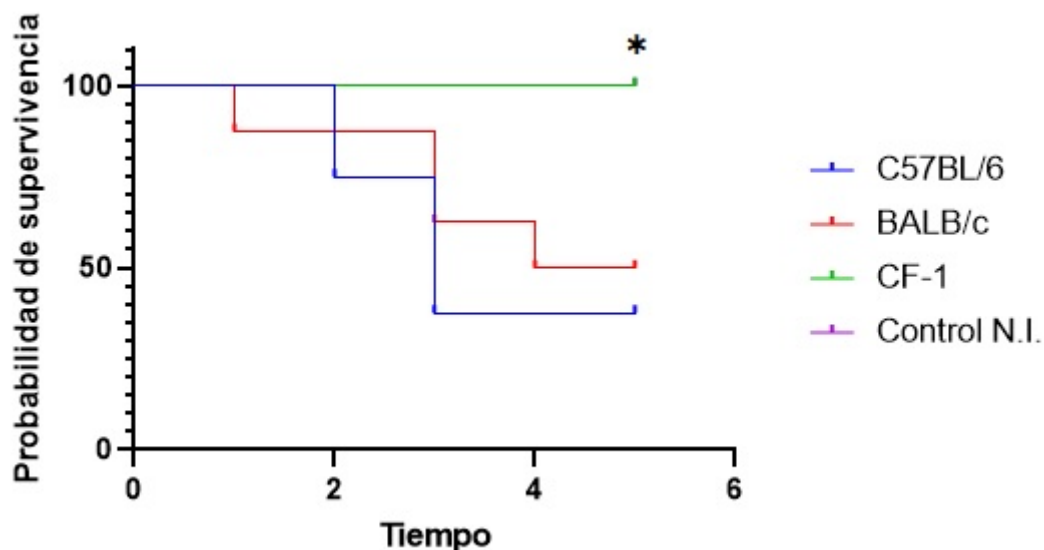


Figura 13. Curva de Sobrevida para grupos experimentales en la infección de cepas BALB/c, C57BL/6 y CF-1. En el grafico se muestran los porcentajes de sobrevida en el tiempo, en días, de los grupos de ratones C57BL/6, BALB/c, CF-1 y Control PBS-1X, respectivamente. Este grafico fue construido en el software GraphPad Prism 9®.

De todos los grupos evaluados, se registran individuos muertos antes de tiempo de eutanasia o punto final humanitario en los grupos C57BL/6 y BALB/c. El grupo CF-1 no presentó individuos muertos o en punto final humanitario. Luego de ingresar los datos y al construir la curva de sobrevivencia, el software entrega el grafico representado en la **FIGURA 13**. Además, realiza test estadístico Log-Rango para las distintas condiciones. El resultado arrojó un valor $p=0,0131$ en los porcentajes

de sobrevivencia de los grupos C57BL/6 y BALB/c en comparación con el grupo control PBS-1X i.p./e.v. y los grupos CF-1 respectivamente. No existe diferencia significativa entre los grupos C57BL/6 y BALB/c.

6.2.2 Recuento Bacteriano en Tejidos.

Como confirmación de infección invasiva producida por inóculo bacteriano SGB KU736792, se cultivó macerados de tejidos de ratón siguiendo metodología antes descrita. Se calcularon las UFC/mL para cada órgano, se tabularon los datos y se procedió a graficar y analizar las diferencias entre recuentos, obteniendo los siguientes resultados:

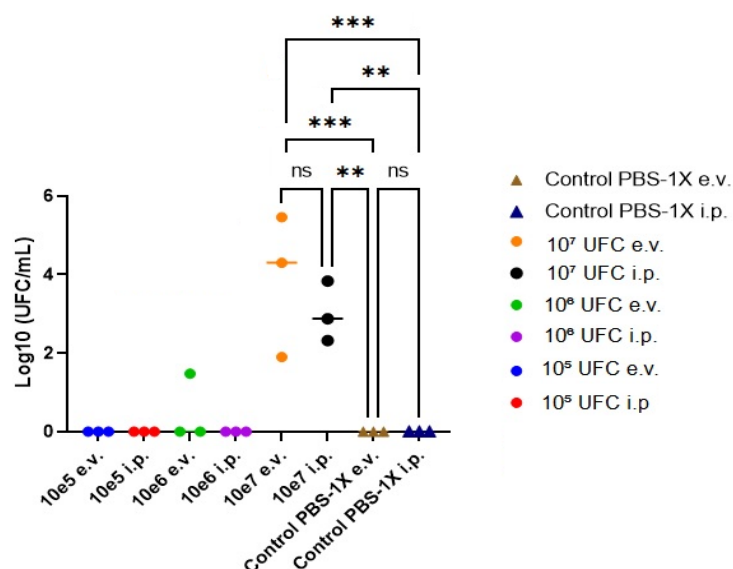


Figura 14. Recuento bacteriano de *Streptococcus agalactiae* en UFC/mL estimadas de placas de agar sangre sembradas con macerado de cerebros de ratones infectados con SGB KU736792 en la determinación de dosis y vía. Para este experimento, se optó por no considerar los datos procedentes de ratones infectados con inóculos inferiores a 10⁷ UFC, debido que las placas de las diluciones seriadas de estos grupos, no presentaron colonias que permitieran realizar recuento bacteriano. (Valores de significancia * = p < 0,05; ** = 0,01 < p < 0,001; *** = 0,001 < p < 0,0001; **** = p < 0,0001)

No se observa desarrollo de colonias en placas del control negativo PBS-1X, ni en placas de muestras de cerebro provenientes de ratones infectados con inóculo 10^5 y 10^6 UFC SGB KU736792, ya sea por vía intraperitoneal o endovenosa. Todos los ratones que fueron infectados con inóculo 10^7 UFC SGB KU736792 presentaron recuentos bacterianos en macerados de cerebro, independiente de la vía de infección, mostrando diferencias significativas ($p < 0,001$) con el control negativo PBS-1X. Como indica la **FIGURA 14**, no existieron diferencias significativas entre el recuento bacteriano de los ratones inoculados con 10^7 UFC SGB KU736792 por vías e.v. e i.p.

No se observa desarrollo de colonias en placas del control negativo PBS-1X, ni en placas de muestras de pulmón provenientes de ratones infectados con inóculo 10^5 y 10^6 UFC SGB KU736792, ya sea por vía intraperitoneal o endovenosa. Como se muestra en la **FIGURA 15**, todos los ratones que fueron infectados con inóculo 10^7 UFC SGB KU736792 presentaron recuentos bacterianos en macerados de pulmón, independiente de la vía de infección, mostrando diferencias significativas ($p < 0,0001$) con el control negativo PBS-1X. Además, existieron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre el recuento bacteriano de los ratones inoculados con 10^7 UFC SGB KU736792 por vía intraperitoneal y los infectados por vía endovenosa, siendo mayor el recuento en los mencionados inoculados vía i.p.

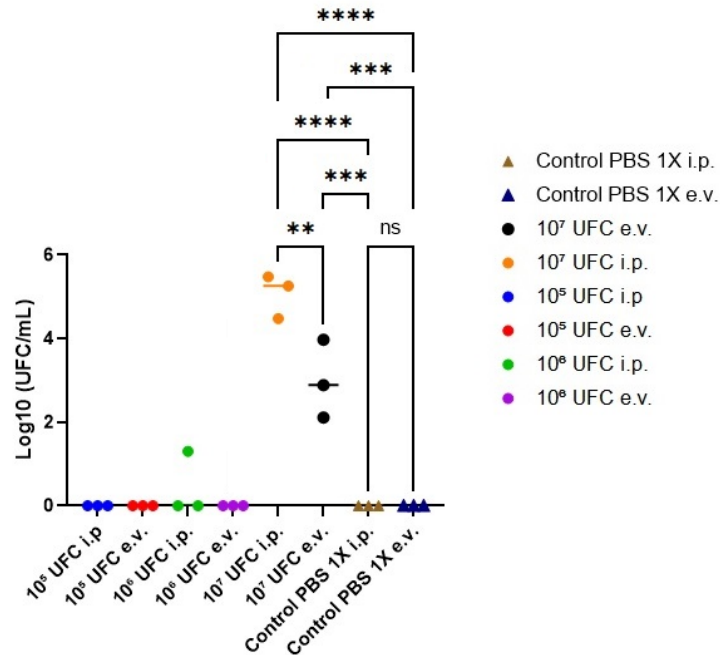


Figura 15. Recuento bacteriano de *Streptococcus agalactiae* en UFC/mL estimadas de placas de agar sangre sembradas con macerado de pulmón de ratones infectados con SGB KU736792 en la determinación de dosis y vía. Para este experimento, se optó por no considerar los datos procedentes de ratones infectados con inóculos inferiores a 10⁷, debido que la diseminación de las diluciones seriadas de estos grupos, no presentaron recuentos bacterianos. Se graficaron también, los controles pertinentes. (Valores de significancia * = $p < 0,05$; ** = $0,01 < p < 0,001$; *** = $0,001 < p < 0,0001$; **** = $p < 0,0001$)

No se observa desarrollo de colonias en placas del control negativo PBS-1X, ni en placas de muestras de riñón provenientes de ratones infectados con inóculo 10⁵ y 10⁶ UFC SGB KU736792, ya sea por vía intraperitoneal o endovenosa. Todos los ratones que fueron infectados con inóculo 10⁷ UFC SGB KU736792 presentaron recuentos bacterianos en macerados de riñón, independiente de la vía de infección, mostrando diferencias significativas ($p < 0,05$) con el control negativo PBS-1X. Se observa en la **FIGURA 16** que no existieron diferencias significativas entre el

recuento bacteriano de los ratones inoculados con 10^7 UFC SGB KU736792 por vías e.v. e i.p.

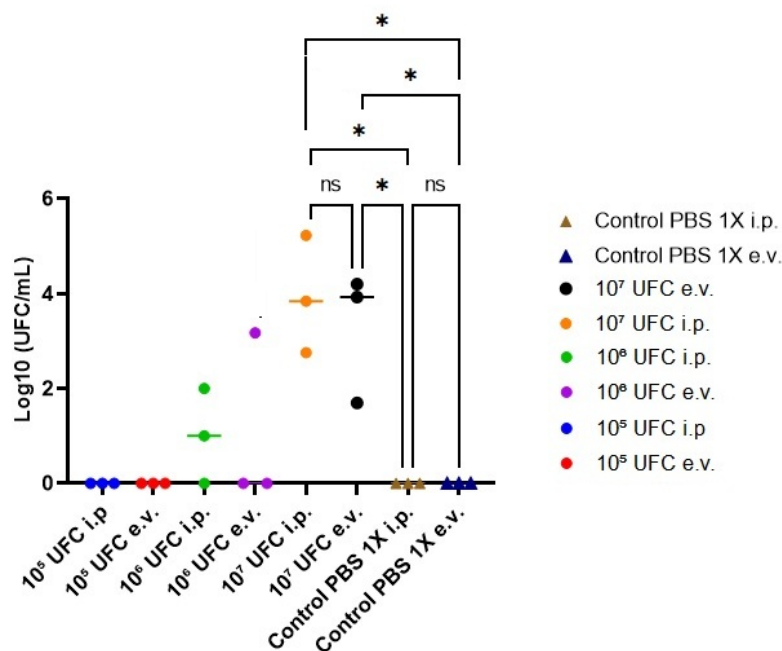


Figura 16. Recuento bacteriano de *Streptococcus agalactiae* en UFC/mL estimadas de placas de agar sangre sembradas con macerado de riñón de ratones infectados con SGB KU736792 en la determinación de dosis y vía. Para este experimento, se optó por no considerar los datos procedentes de ratones infectados con inóculos inferiores a 10^7 , debido que la diseminación de las diluciones seriadas de estos grupos, no presentaron recuentos bacterianos. (Valores de significancia * = $p < 0,05$; ** = $0,01 < p < 0,001$; *** = $0,001 < p < 0,0001$; **** = $p < 0,0001$)

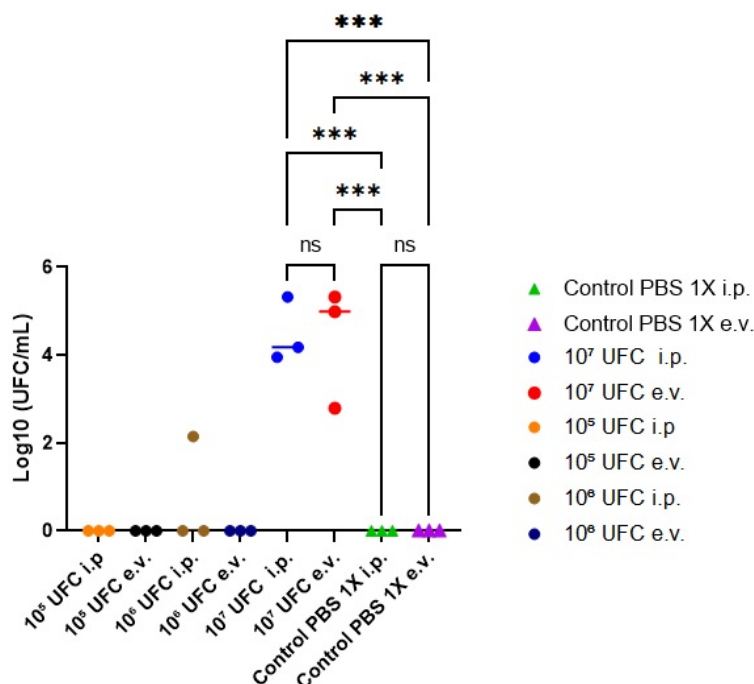
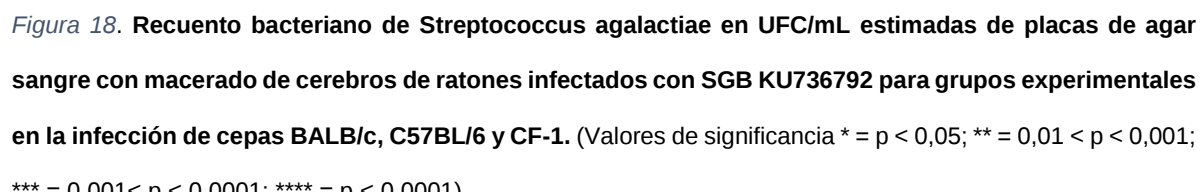


Figura 17. Recuento bacteriano de *Streptococcus agalactiae* en UFC/mL estimadas de placas de agar sangre sembradas con sangre de ratones infectados con SGB KU736792 en la determinación de dosis y vía. Para este experimento, se optó por no considerar los datos procedentes de ratones infectados con inóculos inferiores a 10⁷, debido que la diseminación de las diluciones seriadas de estos grupos, no presentaron recuentos bacterianos. (Valores de significancia * = p < 0,05; ** = 0,01 < p < 0,001; *** = 0,001 < p < 0,0001; **** = p < 0,0001)

No se observa desarrollo de colonias en placas del control negativo PBS-1X, ni en placas de muestras de sangre provenientes de ratones infectados con inóculo 10⁵ y 10⁶ UFC SGB KU736792, ya sea por vía intraperitoneal o endovenosa. La **FIGURA 17** muestra que todos los ratones que fueron infectados con inóculo 10⁷ UFC SGB KU736792 presentaron recuentos bacterianos en sangre, independiente de la vía de infección, mostrando diferencias significativas (p < 0,01) con el control

En el experimento de sepsis en cepas BALB/c, C57BL/6 y también se realizó recuento bacteriano para confirmar infección. En este caso, también se calcularon UFC/mL y se tabularon los datos, para posteriormente graficar y analizar los resultados, que se exponen a continuación:



La **FIGURA 18** muestra los recuentos bacterianos de macerados de cerebro de ratones cepas BALB/c y C57BL/6 desafiados con 10^7 UFC de SGB KU736792 y control negativo PBS-1x. No se observó desarrollo de colonias en placas sembradas con muestras provenientes de ratones del control negativo PBS-1x. En muestras provenientes de grupos BALB/c y C57BL/6 hubo desarrollo de colonias de SGB a nivel nervioso central. No existieron diferencias significativas entre ambos grupos.

La **FIGURA 19** muestra los recuentos bacterianos de macerados de pulmón de ratones cepas BALB/c y C57BL/6 desafiados con 10^7 UFC de SGB KU736792 y control negativo PBS-1x. No se observó desarrollo de colonias en placas sembradas con muestras provenientes de ratones del control negativo PBS-1x. En muestras provenientes de grupos BALB/c y C57BL/6 hubo desarrollo de colonias de SGB a nivel nervioso central. No existieron diferencias significativas entre ambos grupos.

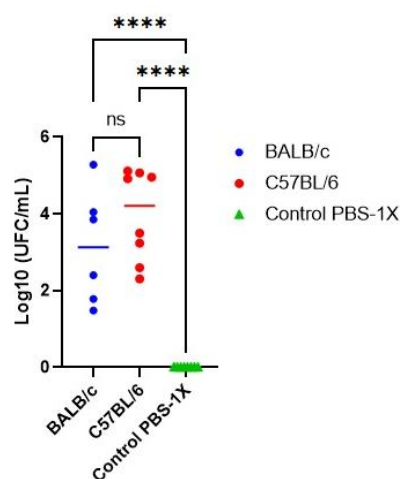


Figura 19. Recuento bacteriano de *Streptococcus agalactiae* en UFC/mL estimadas de placas de agar sangre con macerado de pulmón de ratones infectados con SGB KU736792 para grupos experimentales en la infección de cepas BALB/c, C57BL/6 y CF-1. (Valores de significancia * = $p < 0,05$; ** = $0,01 < p < 0,001$; *** = $0,001 < p < 0,0001$; **** = $p < 0,0001$)

La **FIGURA 20** muestra los recuentos bacterianos de macerados de riñón de ratones cepas BALB/c y C57BL/6 desafiados con 10^7 UFC de SGB KU736792 y control negativo PBS-1x. No se observó desarrollo de colonias en placas sembradas con muestras provenientes de ratones del control negativo PBS-1x. En muestras provenientes de grupos BALB/c y C57BL/6 hubo desarrollo de colonias de SGB a nivel nervioso central. Además, existieron diferencias significativas en el recuento bacteriano, siendo mayor en C57BL/6 que en BALB/c ($p < 0,05$) siendo casi 2 órdenes de magnitud más abundante el conteo.

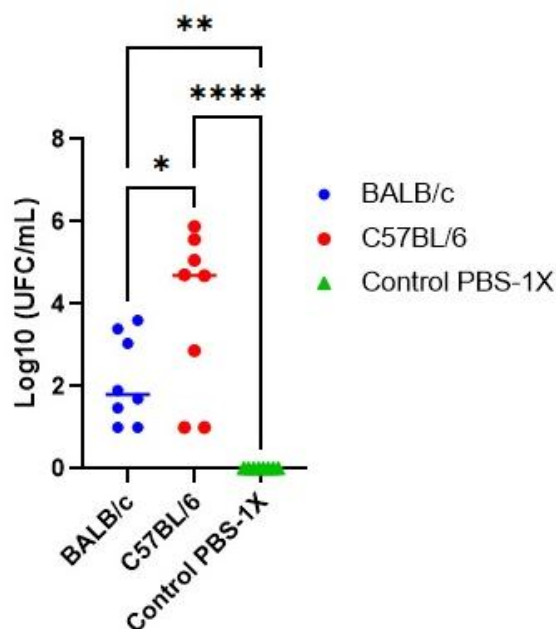


Figura 20. Recuento bacteriano de *Streptococcus agalactiae* en UFC/mL estimadas de placas de agar sangre con macerado de riñón de ratones infectados con SGB KU736792 para grupos experimentales en la infección de cepas BALB/c, C57BL/6 y CF-1. (Valores de significancia * = $p < 0,05$; ** = $0,01 < p < 0,001$; *** = $0,001 < p < 0,0001$; **** = $p < 0,0001$)

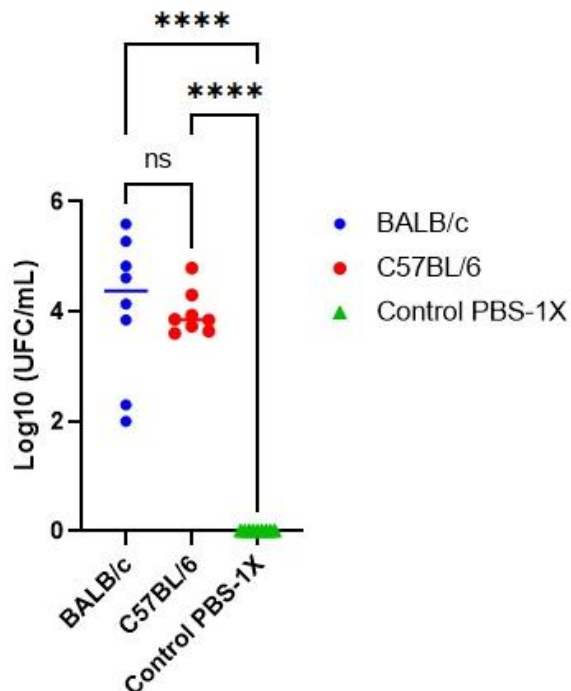


Figura 21. Recuento bacteriano de *Streptococcus agalactiae* en UFC/mL estimadas de placas de agar sangre con sangre de ratones infectados con SGB KU736792 para grupos experimentales en la infección de cepas BALB/c, C57BL/6 y CF-1. (Valores de significancia * = $p < 0,05$; ** = $0,01 < p < 0,001$; *** = $0,001 < p < 0,0001$; **** = $p < 0,0001$)

La **FIGURA 21** muestra los recuentos bacterianos de macerados de cerebro de ratones cepas BALB/c y C57BL/6 desafiados con 10^7 UFC de SGB KU736792 y control negativo PBS-1x. No se observó desarrollo de colonias en placas sembradas con muestras provenientes de ratones del control negativo PBS-1x. En muestras provenientes de grupos BALB/c y C57BL/6 hubo desarrollo de colonias de SGB a nivel nervioso central. No existieron diferencias significativas entre ambos grupos.

Cabe considerar que para este experimento se descartó usar los datos obtenidos de los ratones CF-1 debido a que la mayoría de las placas presentaron incontables bacterias en contradicción con su evaluación clínica, sin mayores signos de sepsis

o infección avanzada. Así, los datos mostrados solo corresponden a órganos de individuos pertenecientes a los grupos BALB/c y C57BL/6.

6.2.3 Evaluación Clínica de los animales

La evaluación clínica se realizó de acuerdo a la metodología descrita, en base a la observación de temperatura, peso y observación de signos clínicos durante el proceso de experimentación, comparando los grupos de animales controles con los tratados.

Con los valores de peso registrados en **TABLA 5** se calculó el promedio de este parámetro para cada uno de los grupos cada día del esquema infectivo, partiendo el día de inoculación hasta el día que corresponde eutanasia, punto final humanitario o muerte del ratón, resultando la **TABLA 5**

TABLA 5

Peso (g) promedio diario de grupos experimentales en la determinación de dosis y via de infeccion

Grupo	Peso Promedio (g)				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
10e5 i.p.	32,33	32,60	32,86	33,00	33,13
10e6 i.p	32,90	30,36	30,73	31,83	31,66
10e7 i.p.	30,03	27,40	26,05	26,40	28,00
Control PBS-1X i.p.	27,83	28,43	27,93	28,43	28,50
10e5 e.v.	28,56	29,66	29,26	28,63	29,23
10e6 e.v.	31,06	29,50	30,23	30,70	32,06
10e7 e.v.	30,90	28,76	26,53	26,26	25,40
Control PBS-1X e.v.	29,26	29,83	29,50	29,96	29,96

Estos datos fueron ingresados y procesados en el software GraphPad Prism 9.0.0® resultando el grafico de la **FIGURA 22**. Se observa tendencia a la disminución del peso (g) en grupo 10e7 e.v. según avanzan los días, manteniéndose hasta el último día del esquema de infección. También se observa disminución del peso (g) en los días posteriores a la infección en el grupo 10e7 i.p., aunque esta tendencia tiende a revertirse a mitad del esquema infectivo. Además, los grupos 10e5 i.p. y 10e6 i.p. presentaron mayores pesos promedio, comparados con el control PBS-1X. Solo el Grupo 10e7 i.p. presentó pesos menores al control PBS-1X i.p.

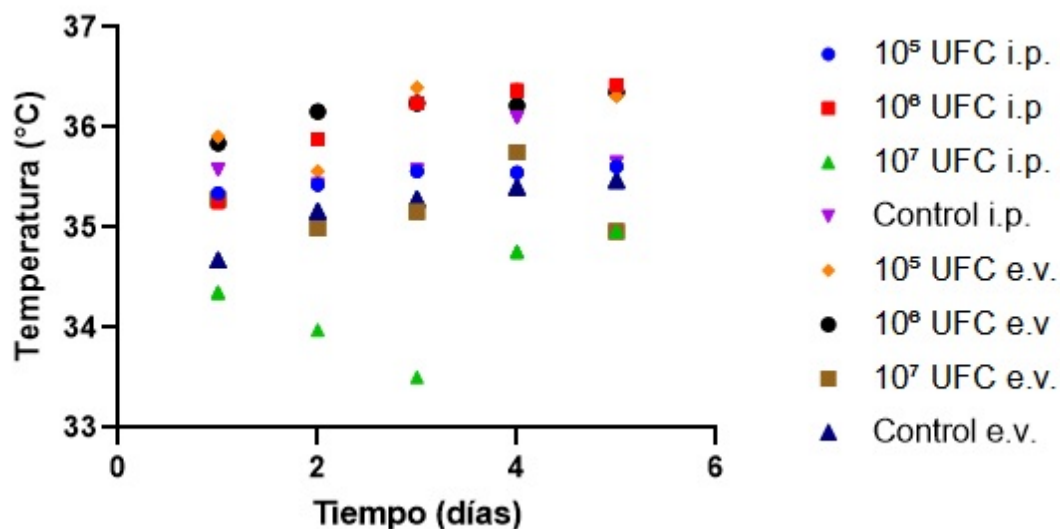


Figura 22. Variación de temperatura (°C) promedio de grupos experimentales en la determinación de dosis vía post infección con SGB ku736792 desde la inoculación hasta el día de eutanasia. Para este gráfico se utilizó la técnica analítica de t-Student

Además, con los valores de temperatura (°C) registrados en **TABLA 6** se calculó el promedio de este parámetro para cada uno de los grupos cada día del esquema infectivo, partiendo el día de inoculación hasta el día que corresponde eutanasia, punto final humanitario o muerte del ratón, resultando la siguiente tabla:

TABLA 6

Temperatura (°C) promedio diario de grupos experimentales en la determinación de dosis y vía de infección.

Temperatura (°C) promedio					
Grupo	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
10e5 i.p.	35,34	35,43	35,56	35,55	35,61
10e6 i.p.	35,26	35,88	36,24	36,37	36,42
10e7 i.p.	34,35	33,98	33,51	34,76	34,96
Control PBS-1X i.p.	35,58	35,43	35,57	36,10	35,65
10e5 e.v.	35,91	35,56	36,40	36,38	36,31
10e6 e.v.	35,84	36,16	36,24	36,22	36,35
10e7 e.v.	35,28	34,99	35,16	35,75	34,96
Control PBS-1X e.v.	34,67	35,16	35,28	35,40	35,47

Luego, estos datos fueron ingresados y procesados en el software GraphPad Prism 9.0.0 ®. Se observa en la **FIGURA 23** que todos los grupos de infección intraperitoneal, incluido el control PBS-1X i.p., presentan mayor temperatura promedio al término del esquema infectivo en comparación con la temperatura de inicio del experimento. Además, se observa que todos los grupos de infección endovenosa presentaron mayor temperatura promedio final al término del esquema infectivo en comparación con el día de inicio del esquema, con excepción del grupo 10e7 e.v. que presentó una temperatura (°C) más baja al término del esquema infectivo. Se observa además un comportamiento particularmente errático en las temperaturas promedio de los grupos 10e7 e.v. y 10e7 i.p. mostrando bruscos aumentos y disminuciones con variaciones de un día.

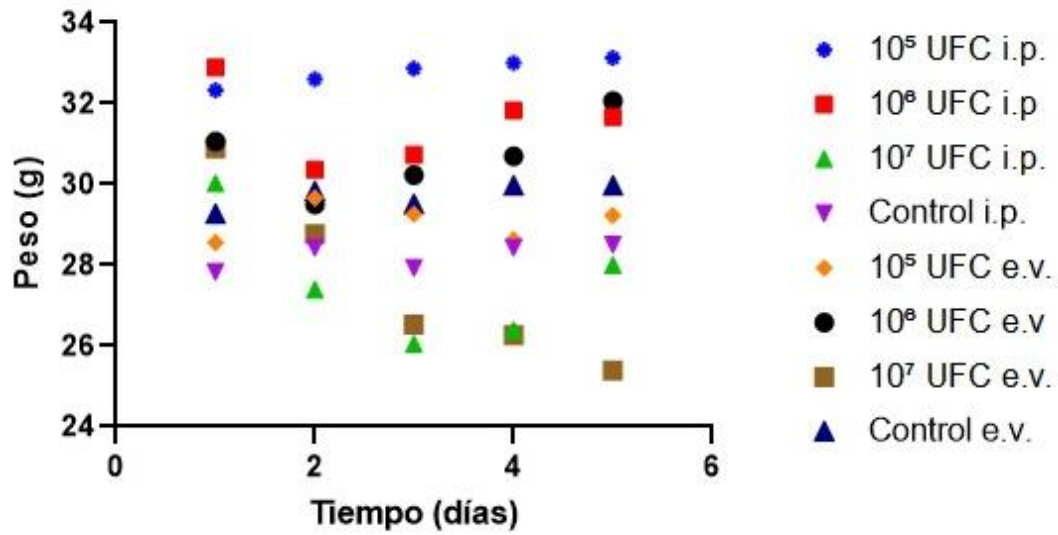


Figura 23. Variación del peso (g) promedio de grupos experimentales en la determinación de dosis y vía infección con SGB ku736792 desde la inoculación hasta el día de eutanasia. Para este gráfico se utilizó la técnica analítica de t-Student

7. Discusión

El desarrollo e implementación de modelos biológicos es vital para la salud humana. Con estos, es posible estudiar patologías, las consecuencias que traen al organismo y evaluar tratamientos para la enfermedad. Para *Streptococcus agalactiae*, la literatura pone a disposición modelos animales de tilapia y de ratón, (Xiao li et al, 2019) (Soto et al, 2018) usados en investigaciones biotecnológicas asociadas a la producción de vacunas en uso humano o animales de crianza de la industria cárnica. En cuanto a modelos de sepsis se refiere, los que se encuentran disponibles suelen usar el término indistintamente para desafío letal, sepsis, o infección invasiva, poco caracterizados, lo que afecta en la interpretación y extrapolación de resultados (Iovino et. al, 1968) (Stortz et. al, 2017) (Lentini et. al, 2018). Este trabajo planteó implementar un modelo biológico de sepsis en al menos una cepa de *Mus musculus*, ya sea C57BL/6, BALB/c o CF-1, evaluando para ello, recuento bacteriano de cerebro, pulmón, riñón y sangre de ratones infectados por distintas vías e inóculos con la cepa SGB KU 736792, monitoreando además su temperatura, peso y signos de sepsis mediante score clínico durante todo el esquema de infección. Además, se planteó describir el perfil de expresión de citoquinas de los animales infectados. Todo ello con los controles pertinentes. Como resultado, se aportan antecedentes sobre la factibilidad de llevar a cabo modelos de sepsis en las cepas BALB/c y C57BL/6, logrando con éxito la infección en grupos de ratonas de cada cepa, el desarrollo del cuadro clínico en un tiempo de estudio

acotado, presentando diferencias significativas en la disminución de la probabilidad de supervivencia. Además, se proponen criterios que permitieran confirmar y caracterizar sepsis y su posterior uso para uso en estudios de interacción patógeno-hospedero. A la fecha, Chile no cuenta con modelos biológicos de sepsis por SGB disponibles en la literatura, lo cual posiciona este estudio como el primero en desarrollar un modelo murino de sepsis en *Mus musculus* por *Streptococcus agalactiae*.

Respecto de la dosis optima de sepsis, no se observó desarrollo de sepsis tanto en el grupo control como los grupos 10^5 y 10^6 UFC/mL ya sea por vía intraperitoneal o endovenosa. Solo los grupos infectados por vía intraperitoneal y vía endovenosa con inóculo 10^7 UFC/mL desarrollaron sepsis, confirmada por cultivo positivo de SGB en placas de agar sangre sembradas con homogeneizado de todos tejidos seleccionados. Sumado a lo anterior, se confirmó infección invasiva por cultivo positivo en los ratones tanto de las cepas BALB/c y C57BL/6 infectados con 10^7 UFC de SGB KU736792. Lo anterior permite concluir que 10^7 UFC/mL es el inóculo óptimo para la implementación del modelo de sepsis utilizando la cepa SGB KU736792. Cabe destacar que no hubo tendencia ni diferencias significativas en cuanto a las variables peso y temperatura, lo cual se aleja del criterio sepsis 3 que plantea variaciones de $\pm 3.0^{\circ}\text{C}$ en casos de sepsis, lo cual es relevante a la hora de extrapolar resultados a humanos.

En cuanto a la vía de infección, se logra el desarrollo de sepsis mediante vía endovenosa y vía intraperitoneal, confirmadas mediante cultivo en placa. Sin embargo, no es posible escoger una vía óptima para el desarrollo del modelo biológico, con los antecedentes recabados. Queda pendiente para próximos estudios una ampliación del número de sujetos involucrados en cada grupo, que permita agregar datos en esta definición. Aun así, para efectos de este trabajo se escogió la vía endovenosa para la consecución de la investigación. Esto amparado en la mayor probabilidad de sobrevivencia lo que permite estudiar el fenómeno de manera más acabada.

Este trabajo también propuso investigar diferencias entre distintas cepas BALB/c y C57BL/6 y CF-1 de *Mus musculus*. Así, se logró desarrollar infección invasiva en ratones, tanto de las cepas BALB/c, como en ratones de la cepa C57BL/6 confirmando infección mediante recuento en placa, no existiendo diferencias significativas entre ambas cepas de ratones. Sin embargo, la probabilidad de sobrevivencia al día 4 es más alta en ratones BALB/c en comparación con C57BL/6. Dicha tendencia se mantiene en los recuentos bacterianos, no existiendo diferencias significativas en recuento de macerados de órganos, salvo el recuento bacteriano de macerados de riñón, siendo superior el recuento bacteriano de C57BL/6 por sobre BALB/c. Lo anterior puede ser explicado por tropismo que presente la bacteria por el tejido renal de esta cepa en particular, presentando esta, algún antígeno que permita este comportamiento tejido-específico. No fue posible encontrar en la literatura evidencia de proteínas relacionadas directamente con el

daño renal de la infección SGB. Debido a su mejor sobrevivencia y para evitar sesgos de interacciones tejido específicas, se optó por implementar el modelo de sepsis en ratonas cepa BALB/c.

Este trabajo, logró desarrollar un modelo de sepsis en ratonas BALB/c mediante la infección de 10^6 UFC de SGB KU 736792 vía endovenosa, que puede ser utilizado como base para estudios patógeno hospedero, factores de virulencia involucrados en la sepsis, además de vacunas o tratamientos orientados a su tratamiento. Cuenta con la potencialidad de expandirse a modelos más complejos como sepsis maternal o neonatal. Para complementar el modelo, se recomienda incorporar análisis respecto de la respuesta inmune asociada (Stortz et al, 2017). Esto, debido a que la literatura muestra que entre las principales limitaciones de los modelos de sepsis se encuentra la exagerada respuesta inmune en comparación con la sepsis en humanos (Buras et al, 2005) y se reportan diferencias respecto de la respuesta inmune, específicamente de la respuesta TH1 en C57BL/6 y TH2 en BALB/c (Mills et al, 2000). El equipo del laboratorio de la sección de biotecnología cuenta dentro de sus publicaciones con estudios respecto del efecto de vacunar ratonas con la proteína inmunogénica de superficie recombinante (SIPr) y su impacto en el descenso en las tasas de colonización vaginal y el desarrollo de anticuerpos e inmunidad protectora contra SGB. Este modelo de sepsis queda a disposición de la investigación sobre el efecto de la vacunación con SIPr y su efecto en el desarrollo sepsis, considerando las probabilidades supervivencia, infección invasiva y respuesta inmune asociada.

En el transcurso de este trabajo, una revuelta social y posterior pandemia puso en la agenda pública una exigencia ampliamente acogida, la de mayor destinación de recursos a la salud pública y la investigación y desarrollo asociada al área. La organización mundial de la salud hace un llamado a buscar vacunas contra *Streptococcus agalactiae* y otros debido a la amenaza cada vez más real que implica el fenómeno de la resistencia antibiótica, lo que refuerza la necesidad de la investigación de agentes infecciosos que aquejan a nuestra población y el desarrollo de alternativas terapéuticas que permitan su tratamiento. Lo anterior implica avanzar hacia encontrar respuestas a las problemáticas inmediatas del país, lo cual amplía nuestra independencia, autonomía y creatividad en cuanto al manejo de problemáticas sanitarias de interés público, así como también un área productiva con proyección,

8. Conclusión

- Se aisló, identificó y caracterizó la cepa KU736792 de *Streptococcus agalactiae*, utilizando métodos microbiológicos clásicos de cultivo en agar y otras pruebas bioquímicas.
- La Administración exógena de la cepa KU736792 de *Streptococcus agalactiae*, por vía endovenosa o intraperitoneal, produjo sepsis en individuos de *Mus musculus* de las cepas BALB/c y C57BL/6

9. Proyecciones

- Caracterizar la respuesta inmune de *Mus musculus* a la infección por SGB.
- Evaluar la expresión génica de factores de transcripción involucrados en cuadros invasivos de SGB.
- Evaluar el efecto de una vacuna oral contra SGB en modelo murino de sepsis.

10. Bibliografía

Rudd K, Johnson S, Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 2020; 395: 200–1

Naira-Sanchez, Elsa R, & Málaga, Germán. (2016). Sepsis-3 new definitions, is it time to quit SIRS? *Acta Médica Peruana*, 33(3), 217-222.

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801–810. doi:10.1001/jama.2016.0287

OMS, Global report on the epidemiology and burden of sepsis: current evidence, identifying gaps and future directions. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Simonsen, K. A., Anderson-Berry, A. L., Delair, S. F., & Davies, H. D. (2014). Early-onset neonatal sepsis. *Clinical microbiology reviews*, 27(1), 21–47. <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-13>

Fleischmann-Struzek C, Goldfarb DM, Schlattmann P, Schlapbach LJ, Reinhart K, Kissoon N. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. *Lancet Respir Med*. 2018 Mar;6(3):223-230. doi: 10.1016/S2213-2600(18)30063-8. PMID: 29508706.

Shah BA, Padbury JF. Neonatal sepsis: an old problem with new insights. *Virulence*. 2014 Jan 1;5(1):170-8. doi: 10.4161/viru.26906. Epub 2013 Nov 1. PMID: 24185532; PMCID: PMC3916371.

Stortz J, Raymond S, Murine Models of Sepsis and Trauma: Can We Bridge the Gap?, *ILAR Journal*, Volume 58, Issue 1, 2017, Pages 90–105, <https://doi.org/10.1093/ilar/ilx007>

Chiavolini D, Pozzi G, Ricci S, Animal Models of *Streptococcus pneumoniae* Disease, *clinical microbiology reviews*, oct. 2008, p. 666–685 vol. 21, no. 40893-8512/08/\$08.00_0 doi:10.1128/cmr.00012-08

Iovino F, Sender V, Henriques-Normark B, In Vivo Mouse Models to Study Pneumococcal Host Interaction and Invasive Pneumococcal Disease, *Methods Mol Biol*. 2019;1968:173-181. doi: 10.1007/978-1-4939-9199-0_14.

Soto DA, Altamirano MJ, Diaz-Dinamarca DA, Vasquez AE, Kalergis AM. Development of a murine model of vaginal colonization of *Streptococcus agalactiae* using a Chilean isolated strain from a newborn with septicemia, 2018;(4):8-15.

Lentini G, Midiri A, The plasminogen binding protein PbsP is required for brain invasion by hypervirulent cc17 group B streptococci, Scientific Report (2018) 8:14322 | DOI:10.1038/s41598-018-32774-8

Schuchat A. Group B streptococcus. Lancet. 1999 Jan 2;353(9146):51-6. doi: 10.1016/S0140-6736(98)07128-1. PMID: 10023965.

ISP, Vigilancia de laboratorio enfermedad invasora *Streptococcus agalactiae*, Chile 2014 – 2018, Boletín ISP, Vol. 9, Mayo 2019.

Fry R, Fatal Infections by Haemolytic *Streptococcus* Group B. Lancet, 1938, 1, 199-201. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)93202-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)93202-1)

Hood M, Janney A, Beta hemolytic streptococcus group B associated with problems of the perinatal period. Am. J. Obstet. Gynecol. 1961, 82, 809–818. doi: 10.1016/S0002-9378(16)36146-4

Paoletti LC, Kasper DL. Surface Structures of Group B *Streptococcus* Important in Human Immunity. Microbiol Spectrum 2019. 7(2):GPP3-0001-2017. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0001-2017.

Musser J, Mattingly J, Identification of a high-virulence clone of type III *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*) causing invasive neonatal disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989, 86(12), 4731–4735. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.12.4731>

Russell NJ, Seale AC, Maternal Colonization With Group B *Streptococcus* and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. Clin Infect Dis. 2017 Nov 6;65(suppl_2):S100-S111. doi: 10.1093/cid/cix658.

Hall J, Adams NH, Maternal Disease With Group B *Streptococcus* and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. Clin Infect Dis. 2017 Nov 6;65(suppl_2):S112-S124. doi: 10.1093/cid/cix660. PMID: 29117328; PMCID: PMC5850000.

Seale AC, Bianchi-Jassir F, Estimates of the Burden of Group B Streptococcal Disease Worldwide for Pregnant Women, Stillbirths, and Children. Clin Infect Dis. 2017 Nov 6;65(suppl_2):S200-S219. doi: 10.1093/cid/cix664. PMID: 29117332; PMCID: PMC5849940.

Madrid L , Seale AC, Infant group B streptococcal disease incidence and serotypes worldwide: systematic review and meta-analyses. Clin Infect Dis 2017; 65(suppl 2):S160–72. <https://doi.org/10.1093/cid/cix656>

Tann CJ, Martinello K, Sadoo S, et al. Neonatal encephalopathy with group B streptococcal disease worldwide: systematic review, investigator group datasets, and meta-analysis. Clin Infect Dis 2017; 65(suppl 2):S173–89.

Kohli-Lynch M, Russell N, Seale AC, et al. Neurodevelopmental impairment in children after group B streptococcal disease worldwide: systematic review and meta-analyses. Clin Infect Dis 2017; 65(suppl 2):S190–9.

Melin P, Efstratiou A, Group B streptococcal epidemiology and vaccine needs in developed countries. Vaccine 31S (2013) D31– D42.

CDC. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. MMWR 1996;45(No. RR-7).

CDC. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: revised guidelines from CDC. MMWR 2002;51(No. RR-11).

Tsai M-H, Hsu J-F, Molecular Characteristics and Antimicrobial Resistance of Group B Streptococcus Strains Causing Invasive Disease in Neonates and Adults. Front. Microbiol. 2019, 10:264. doi: 10.3389/fmicb.2019.00264

do Nascimento, C. S., Dos Santos, N., Ferreira, R., & Taddei, C. R. (2019). Streptococcus agalactiae in pregnant women in Brazil: prevalence, serotypes, and antibiotic resistance. Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 50(4), 943–952. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00129-8>

CDC. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: revised guidelines from CDC. MMWR 2010;59(No. RR-10).

Trivalle, C., Martin, E., Group B streptococcal bacteraemia in the elderly. Journal of medical microbiology, 1998. 47(7), 649–652. <https://doi.org/10.1099/00222615-47-7-649>

Perovic, O., Crewe-Brown, H. H., Khoosal, M., & Karstaedt, A. S. (1999). Invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 18(5), 362–364.

Skoff, T. H., Farley, M. M., Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990-2007. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2009 49(1), 85–92. <https://doi.org/10.1086/599369>

Farley M, Group B Streptococcal Disease in Nonpregnant Adults. *Clinical Infectious Diseases* 2001; 33:556–61.

Nuccitelli, A., Rinaudo, C. D., & Maione, D. Group B Streptococcus vaccine: state of the art. *Therapeutic advances in vaccines*, (2015). 3(3), 76–90. <https://doi.org/10.1177/2051013615579869>

Madhi, S. A., Koen, A., Antibody Kinetics and Response to Routine Vaccinations in Infants Born to Women Who Received an Investigational Trivalent Group B Streptococcus Polysaccharide CRM197-Conjugate Vaccine During Pregnancy. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2017, 65(11), 1897–1904. <https://doi.org/10.1093/cid/cix666>

Bellais S, Six A, Capsular Switching in Group B Streptococcus CC17 Hypervirulent Clone: A Future Challenge for Polysaccharide Vaccine Development, *The Journal of Infectious Diseases*, 2012, Volume 206, Issue 11, Pages 1745–1752, <https://doi.org/10.1093/infdis/jis605>

Luan, S. L., Granlund, M., Multilocus sequence typing of Swedish invasive group B streptococcus isolates indicates a neonatally associated genetic lineage and capsule switching. *Journal of clinical microbiology*, 2005 43(8), 3727–3733. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.3727-3733.2005>

Rajagopal L, Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence Factors, *Future Microbiol.* 2009 March ; 4(2): 201–221. doi:10.2217/17460913.4.2.201

Paoletti, L. C., & Kasper, D. L. (2019). Surface Structures of Group B Streptococcus Important in Human Immunity. *Microbiology spectrum*, 7(2),

10.1128/microbiolspec.GPP3-0001-2017.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0001-2017>

Cozzi, R., Malito, E., Lazzarin, M., Nuccitelli, A., Castagnetti, A., Bottomley, M. J., Margarit, I., Maione, D., & Rinaudo, C. D. (2015). Structure and assembly of group B streptococcus pilus 2b backbone protein. *PloS one*, 10(5), e0125875. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125875>

Adderson EE, Takahashi S, Wang Y, Armstrong J, Miller DV, Bohnsack JF. Subtractive hybridization identifies a novel predicted protein mediating epithelial cell invasion by virulent serotype III group B *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun*. 2003; 71:6857–6863. [PubMed: 14638773]

Chattopadhyay D, Carey AJ, Caliot E, et al. Phylogenetic Lineage and Pilus Protein Spb1/SAN1518 Affect Opsonin-Independent Phagocytosis and Intracellular Survival of Group B *Streptococcus*. 2015;13(4):369-382. doi:10.1016/j.micinf.2010.12.009. Phylogenetic

Maione, D., Margarit, I., Identification of a universal Group B streptococcus vaccine by multiple genome screen. *Science* (2005 (New York, N.Y.), 309(5731), 148–150. <https://doi.org/10.1126/science.1109869>

Buscetta M, Firon A, PbsP, a cell wall-anchored protein that binds plasminogen to promote hematogenous dissemination of group B *Streptococcus*, *Molecular Microbiology* (2016) 101(1), 27–41, doi:10.1111/mmi.13357

Lentini, G., Midiri, A., The plasminogen binding protein PbsP is required for brain invasion by hypervirulent CC17 Group B streptococci. *Scientific reports* 2018, 8(1), 14322. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32774->

Cook LCC, Hu H, Maienschein-Cline M, Federle MJ. A vaginal tract signal detected by the group b streptococcus saers system elicits transcriptomic changes and enhances murine colonization. *Infect Immun*. 2018;86(4):1-17. doi:10.1128/IAI.00762-17

Larsson C, Stålhammar-Carlemalm M, Experimental vaccination against group B streptococcus, an encapsulated bacterium, with highly purified preparations of cell surface proteins Rib and alpha. *Infect Immun*. 1996 Sep;64(9):3518-23

Larsson C, Stålhammar-Carlemalm M, Protection against experimental infection with group B streptococcus by immunization with a bivalent protein vaccine. *Vaccine*. 1999 Feb 5;17(5):454-8

Larsson C, Holmgren J, Intranasal immunization of mice with group B streptococcal protein rib and cholera toxin B subunit confers protection against lethal infection. *Infect Immun*. 2004 Feb;72(2):1184-7

Larsson C, Lindroth M, Association between low concentrations of antibodies to protein alpha and Rib and invasive neonatal group B streptococcal infection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2006 Nov;91(6):F403-8.

Martin D, Rioux S, Protection from Group B Streptococcal infection in Neonatal Mice By Maternal Immunization with recombinant Sip Protein. *Infect Immun*. 2002 Sep;70(9):4897-901

Soto JA, Diaz-Dinamarca DA, Cellular immune response induced by surface immunogenic protein with AbISCO-100 adjuvant vaccination decreases group B Streptococcus vaginal colonization. *Mol Immunol*. 2019 Jul;111:198-204. doi:10.1016/j.molimm.2019.04.025. Epub 2019 May 9

Diaz-Dinamarca DA, Soto DA, Oral vaccine based on a surface immunogenic protein mixed with alum promotes a decrease in Streptococcus agalactiae vaginal colonization in a mouse model. *Mol Immunol*. 2018;103(August):63-70. doi:10.1016/j.molimm. 2018.08.028

Takayama Y, Matsui H, Adachi Y, Nihonyanagi S. Detection of Streptococcus agalactiae by immunochromatography with group B streptococcus - specific surface immunogenic protein in pregnant women. *J Infect Chemother*. 2017:1-5. doi:10.1016/j.jiac.2017.07.001

Bergseng H, Bevanger L, Rygg M, Bergh K. Real-time PCR targeting the sip gene for detection of group B streptococcus colonization in pregnant women at delivery Printed in Great Britain. 2007:223-228. doi:10.1099/jmm.0.46731-0

Sitkiewicz I, Musser JM. Analysis of growth-phase regulated genes in Streptococcus agalactiae by global transcript profiling. *BMC Microbiol*. 2009;9:1-11. doi:10.1186/1471-2180-9-32

Mereghetti L, Sitkiewicz I, Green NM, Musser JM (2008) Remodeling of the Streptococcus agalactiae Transcriptome in Response to Growth Temperature. *PLoS ONE* 3(7): e2785. doi:10.1371/journal.pone.0002785

Florindo C, Ferreira R, Borges V, Spellerberg B, Gomes JP, Borrego MJ. Selection of reference genes for real-time expression studies in Streptococcus agalactiae. *J Microbiol Methods*. 2012;90(3):220-227. doi:10.1016/j.mimet.2012.05.011

INE, Sintesis de Resultados CENSO 2017, Instituto Nacional de Estadisticas, Junio 2018.

Minsal, Boletín epidemiológico trimestral infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) Chile se 1 – 13 año 2019.