

Fecha de presentación del Informe: Día Mes Año **1. Datos generales del Proyecto**

Código del proyecto: 1848			
Título del proyecto: Utilización de <i>Galleria mellonella</i> como modelo para el estudio de la patogénesis de aislados humanos de <i>Streptococcus agalactiae</i> (SGB)			
Facultad o Instituto Académico: SALUD			
Departamento o Escuela: Microbiología			
Grupo (s) de investigación: Microbiología y Enfermedades infecciosas /Biotecnología e infecciones bacterianas			
Entidades: UNIVERSIDAD DEL VALLE			
Palabras claves: <i>Galleria mellonella</i> , virulencia, <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Group B Streptococcus</i> .			
Investigadores ¹	Nombre	Tiempo asignado	Tiempo dedicado
Investigador Principal	Maria del Pilar Crespo Ortiz	8 h/sem	8 h/sem
Coinvestigadores	Mauricio Rafael Barreto Parra	4 h/sem	4 h/sem
	Maria Elena Burbano	4 h/sem	4 h/sem
Otros participantes	Farid Uribe (monitor)	8h/ sem x 4 meses	8 h/sem (4 meses)

2. Resumen ejecutivo:

Se espera que describa el proyecto, planteamiento del problema, objetivos, metodología, principales resultados obtenidos y las conclusiones. La extensión debe ser de máximo de 500 palabras (en español y en inglés).

¹ Todas las personas relacionadas en el informe y que participen en el proyecto deben haber suscrito el acta de propiedad intelectual de acuerdo con los formatos establecidos.

Resumen

El *Streptococcus agalactiae* o *Streptococcus* del grupo B (SGB) es un colonizante habitual del tracto gastrointestinal y urogenital humano. Sin embargo cuando el SGB invade causa infecciones severas en neonatos, mujeres embarazadas y adultos susceptibles. No obstante, los mecanismos por los que se potencia su paso de comensal a invasor aún son desconocidos. Dado que condiciones del microambiente puede afectar la expresión de los factores de virulencia, este estudio tuvo por objetivo establecer un modelo invertebrado (*Galleria mellonella*) para el estudio de la virulencia e interacciones *in vivo* de aislados invasivos y no invasivos de SGB. Se determinó la viabilidad de las larvas de *G. mellonella* inoculadas con las cepas de referencia de SGB. Los efectos de temperatura, pH y competencia bacteriana en la viabilidad de las larvas fueron analizados al igual que la respuesta de los hemocitos a la infección. Las larvas se inocularon con aislados obtenidos de infecciones invasivas y con aislados colonizantes. SGB se multiplicó e infectó el modelo en forma dosis dependiente (Dosis letal 50%: 1×10^7 UFC/larva a las 24 h). La infección causó melanización con vacuolización y depleción de hemocitos. La letalidad en *Galleria* incremento con la temperatura (37°C) y el pH (> 5.5 – 7.2). Los ensayos de competencia bacteriana mostraron un fuerte efecto antagonico de *Lactobacillus gasseri* (tanto células como filtrados libres de células) sobre la infección por SGB y mejoró de manera significativa la sobrevivencia de *Galleria*. El efecto protector de *L. gasseri* fue evidente aún en condiciones similares a las de la colonización por SGB indicando que el efecto modulador de *L. gasseri* puede ser ejercido por sus productos metabólicos. La incubación de SGB con los filtrados ácidos de *L. gasseri* causaron inhibición del crecimiento de SGB y disminuyeron la mortalidad de las larvas incluso después de la infección con el clon hipervirulento de SGB (ST 17), un aislado clínico multirresistente. El efecto protector de *L. gasseri* parece ser mediado principalmente por el pH ácido sin embargo experimentalmente se observó que otros mecanismos pueden estar implicados y son inóculo dependientes. En este estudio también se pudo observar que la infección de *G. mellonella* con aislados de SGB considerados invasivos causa una mortalidad en las larvas mayor al 45% después de 24 horas, mientras que aislados considerados no invasivos o colonizantes mostraron en su mayoría menor mortalidad. Un aislado previamente identificado como el clon hipervirulento (ST17) mostró una letalidad reproducible y significativamente mayor que los demás (100% 24-48h). En conclusión nuestros hallazgos sugieren que *G. mellonella* puede ser usada para el estudio *in vivo* de aislados de SGB, humanos y representa un paso intermedio entre los estudios *in vitro* e *in vivo* en modelos vertebrados.

Dado los efectos potenciales de *L. gasseri* sobre la infección por el clon hipervirulento (ST17), nuestros resultados brindan soporte al uso de *L. gasseri* en estrategias de control de SGB basadas en formulaciones a base de *Lactobacillus*.

Abstract

Group B *Streptococcus* (GBS) is a gram positive bacterium colonizing the gastrointestinal and urogenital tracts in humans. However under certain conditions GBS invades leading to severe infections in neonates, pregnant women, immunocompromised patients and the elderly people. The precise mechanisms involved in the transition from colonizer to pathogen remain to be elucidated, however it has been suggested that environmental determinants may regulate gene expression resulting in GBS invasion. We have assessed the potential of the moth *Galleria mellonella* as a model to study the *in vivo* virulence and GBS interactions of invasive and noninvasive human isolates from our population. Temperature, pH and bacterial competition effects were examined in the model as well as the response of *Galleria* hemocytes to GBS infection. GBS strains were able to effectively grow and infect *G. mellonella* in a dose-dependent manner with a (half-lethal dose) LD₅₀ 1 x10⁷ CFU after 24 h. GBS infection induced larva melanization with hemocyte vacuolation and depletion. Larval killing increased with environmental conditions such as temperature (37°C) and pH (≥5.5 - 7.2). Bacterial interference assays showed a remarkable antagonistic effect of *Lactobacillus gasseri* (cells and filtrates) on GBS infection and significantly improved *Galleria* survival. The protective effect of *L. gasseri* was observed even at ratios similar to those of GBS colonization suggesting that *L. gasseri* modulation by its metabolic products is relevant. Exposure to *L. gasseri* acidic filtrates induced growth inhibition and prevented larva killing after infection with the hypervirulent GBS clone (a multiresistant clinical ST 17 strain). We showed that mechanisms mediating these effects are mainly pH dependent, however other mechanisms may have a role depending on inocula. We also found that *G. mellonella* infected with invasive human GBS isolates showed differential killing curves with higher killing rates after 24 h when compared to those considered colonizers or noninvasive isolates.

Overall it has been shown that *G. mellonella* may be a representative *in vivo* model for baseline GBS studies. Given the potential effects over the hypervirulent strain, our findings support the use of *L. gasseri* in the GBS control strategies based on *Lactobacillus* formulations.

3. Síntesis del proyecto:

En una extensión máxima de 5 páginas, se debe mostrar el cumplimiento de los objetivos del proyecto.

UTILIZACIÓN DE *Galleria mellonella* COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA PATOGENESIS DE AISLADOS HUMANOS DE *Streptococcus agalactiae* (SGB) (para mayor detalle ver trabajo *in extenso* adjunto)

1. OBJETIVOS

Objetivo general

Validar el modelo experimental invertebrado *Galleria mellonella* para estudiar la patogénesis de aislados humanos de *Streptococcus agalactiae*.

Específicos

- Adaptar el modelo de *G. mellonella* a las condiciones de laboratorio locales.
- Caracterizar las interacciones celulares del SGB en el modelo experimental.
- Evaluar la representatividad de la patogénesis de aislados humanos en el modelo experimental.

2. METODOLOGIA

Este es un estudio experimental, en donde en la primera fase se estableció el modelo experimental para el estudio de los efectos de diversos factores ambientales sobre la virulencia del SGB. En la segunda fase se evaluó la representatividad del modelo mediante la infección con aislados de SGB de pacientes.

2.1 Cepas bacterianas: En los experimentos se incluyeron las cepas *S. agalactiae* ATCC 12386 (O90R tipo capsular la Oxoid) y *S. agalactiae* ATCC 12403 (tipo III). Para los análisis de interferencia se utilizó la cepa de *Lactobacillus gasseri* ATCC 19992. Adicionalmente se incluyeron 16 aislados de pacientes caracterizados molecularmente en un estudio previo(1). Aislados obtenidos de sitios estériles fueron considerados invasivos (SGB-I) mientras que los de sitios no estériles fueron considerados no invasivos o colonizantes (SGB-NI i.e. urina, flujo vaginal). Los cultivos se realizaron en agar soya tripticasa (TSA BBL), caldo tripticasa (TSB, BBL) o en el Lactobacilli MRS agar (BBL) a 37°C y 5% CO₂. Para el subcultivo de SGB se usó medio selectivo (Chromo ID Strep B, BioMérieux).

2.2 Establecimiento y validación del modelo invertebrado.

El proyecto fue aprobado por el comité de ética de la Universidad del Valle (Aval #016-018). *S. agalactiae* ATCC 12403 y ATCC 12386 se cultivaron en TSA y posteriormente fueron inoculados en TSB por 2 h. Las larvas de *G. mellonella* se obtuvieron de un proveedor local (Perkins, Ltda) y fueron usadas dentro de 4 días de su compra. Antes de comenzar los experimentos un grupo de larvas fue observada para analizar su salud y calidad (2).

Se seleccionaron larvas de séptimo estadio, 2 cms de largo, de color crema y con peso aproximado de 250 mg. Grupos de 10 larvas se inocularon con 10 µL de la suspensión bacteriana mediante inyección entre la tercera y cuarta pro-pata izquierda con una jeringa Hamilton de 100 µL. Las larvas fueron incubadas a 37°C en oscuridad y se observaron por 96 horas y diariamente se registró su viabilidad y melanización (pigmentación oscura).

Los inóculos fueron verificados mediante el conteo de colonias en TSA. Como control se incluyeron larvas no inoculadas y larvas inoculadas con medio sin bacterias (control de trauma). Los experimentos se realizaron en triplicado por lo menos dos veces en días diferentes. Las larvas muertas fueron maceradas y las bacterias recuperadas utilizando un medio selectivo y se

congelaron a -80 °C en glicerol 15% en TSB. Se definió el inóculo que causó el 50% de mortalidad después de 24 h de infección como la dosis letal 50 (DL₅₀) y ésta fue la dosis escogida para realizar los otros experimentos a menos que se especifique otra dosis. Las condiciones experimentales fueron similares en los ensayos siguientes. Para el recuento de hemocitos se realizó una dilución 1:20 de la hemolinfa de tres larvas en azul de metileno 0.1% , y para observar la morfología se realizaron tinciones con Gram y Giemsa.

2.3 Crecimiento de SGB en *G. mellonella*

Las larvas fueron inoculadas con una dosis sub-letal de SGB DL₁₅ (2- 5 x10⁶ UFC/larva) y observadas cada hora por 7 horas y a las 12 h. En cada intervalo de tiempo se tomaron 3 larvas, se colocaron 15 min en hielo y luego se maceraron en 2 ml de PBS para ser cuantificadas mediante siembra en TSA y medio selectivo.

2.4 Efectos de temperatura y pH en la virulencia.

Cambios en temperatura y pH han demostrado que afectan la sobrevivencia y la expresión de factores de virulencia en SGB. Las larvas se inocularon con la DL₅₀ definida en el experimento de viabilidad y se incubaron bajo diferentes condiciones de temperatura (28°C y 37°C) y pH (4.5, 5.5, 6.5, 7,2). Se evaluará la viabilidad de acuerdo con lo mencionado anteriormente.

2.5 Competencia/Interferencia bacteriana

Se ha postulado que en el ecosistema vaginal las interacciones del SGB con bacterias residentes pudieran influir en su capacidad de colonizar e invadir tejidos más profundos. Para determinar la relación de otras comunidades bacterianas en la patogénesis de SGB, suspensiones de *Lactobacillus gasseri* (ATCC 19992) se incubaron simultáneamente con la DL₅₀ de SGB en diferentes proporciones. La suspensión final se inoculó en las larvas y como controles se utilizaron larvas inoculadas con cada bacteria por separado.

2.6 Virulencia de aislados humanos de SGB

Para determinar si existe correlación entre la severidad clínica y la virulencia en *G. mellonella*, aislados invasivos y no invasivos se cultivaron en TBS y los inóculos se ajustaron a ~ 5 x 10⁸ UFC/ mL. Posteriormente, 10 µL de la suspensión fueron inoculados en grupos de 10 larvas en triplicado. Un grupo de larvas inoculadas con *S. agalactiae* ATCC 12403 se incluyó como control.

2.7 Estabilidad del fenotipo de SGB

Para evaluar si existen cambios generados por la interacción con el hospedero, las cepas se recuperaron de las larvas muertas y se verificó la producción de hemólisis y biopelícula de acuerdo con protocolos previamente descritos(3,4).

2.8 Evaluación de la interacción de aislados de SGB con el hospedero.

Estudios previos sugieren que aislados virulentos son capaces de persistir en los hemocitos de *G. mellonella*. Las bacterias (aislados SGB-I y SGB-NI) se marcaron con naranja de acridina antes de ser inoculadas en un promedio de 10 larvas cada una. La hemolinfa se extrajo a las 2 h de infección, se centrifugó y después de varios lavados se observaron en el microscopio de fluorescencia (ZEISS 750 M). Una suspensión bacteriana previamente inactivada se utilizó como control.

3.0 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se almacenaron en una base de datos de Epi info. Los datos de supervivencia se analizaron usando curvas de Kaplan-Meier (Graph Pad Prism 8.4.0), un experimento representativo generalmente se muestra en las figuras. La comparación de las curvas y la significancia se determinó mediante la prueba de log-rank, una $p \leq 0.05$ se consideró significativa. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Graph Pad Prism 8.4.0 y Epi info versión 7.2.2.6.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Efectos de la infección por SGB en la viabilidad de *G. mellonella*.

G. mellonella fue susceptible a la infección por ambas cepas de *S. agalactiae* (Figura 1 A). La infección con SGB causó melanización de las larvas indicando la activación de la respuesta inmune humoral en *Galleria*. Adicionalmente se observó vacuolación y depleción de hemocitos la cual fue mayor en la infección con *S. agalactiae* ATCC 12403 que con la cepa ATCC 12386 ($0.8 \pm 0.5 \times 10^3$ hemocitos / μL vs $6.035 \pm 2 \times 10^3$ hemocitos μL respectivamente). (Figura 1B).

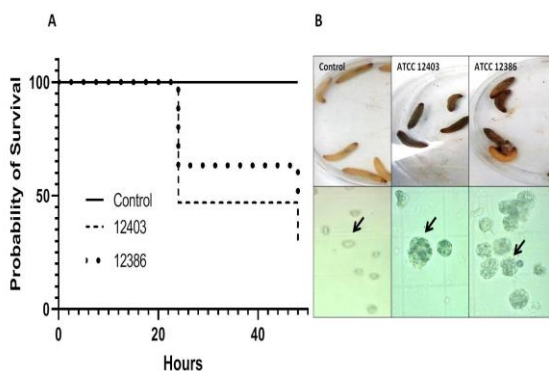


Figure 1. Survival of *G. mellonella* larvae following infection with GBS strains. (A) Both GBS strains *S. agalactiae* ATCC 12403 and *S. agalactiae* ATCC 12383 induced killing in *G. mellonella* after incubation for 24 h at 37°C ($p=0.1245$). (B) GBS infection induces larva melanization and changes in hemocyte morphology (arrows) when compared to uninfected larvae (control). Hemocyte vacuolization and depletion is also seen after *S. agalactiae* ATCC 12403 infection.

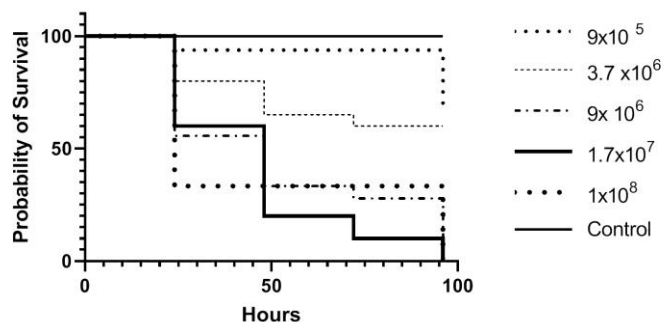


Figure 2. Inoculum effect of GBS infection on *G. mellonella*. Increasing doses of *S. agalactiae* ATCC 12403 were injected in groups of 10 larvae in three different experiments and incubated at 37°C in the dark. Larvae unresponsive to touch were considered dead. Larval killing was induced after infection with 9×10^6 CFU *S. agalactiae* over 96 h and it was significant and reproducible at $\geq 3.7 \times 10^6$ CFU ($p=0.018$).

Para el resto de los experimentos se utilizó *S. agalactiae* ATCC 12403. La curva de crecimiento de la bacteria en la larva mostró que ésta proliferó con el tiempo a pesar de que la larva trató de controlar la infección. Al igual que lo observado por Six et al.(5), se observó que la mortalidad de *Galleria* fue dependiente del inóculo. Inóculos $\leq 3.7 \times 10^6$ UFC/larva fueron subletales causando una mortalidad menor del 50% después de 96 h mientras que inóculos $\geq 9 \times 10^6$ UFC causaron $\geq 50\%$ de mortalidad a las 24 h ($p < 0.0001$). La DL_{50} después de 24 h fue definida entre $1-2 \times 10^7$ CFU y se utilizó como inóculo para los experimentos siguientes (Figura 2).

4.2 Efectos de la temperatura y el pH en larvas infectadas con SGB

Larvas infectadas con SGB que fueron incubadas a 37°C presentaron mayor mortalidad a las 24 horas comparadas con las que se incubaron a 28 °C sin embargo después de 48 horas la mortalidad fue similar (Figura 3). Al igual que lo descrito en estudios previos (6,7), el crecimiento de SGB fue dependiente del pH ($\text{pH } 7.2 > 6.5 > 5.5 > 4.5$). La tasa de crecimiento fue más rápida a pH 7.2 mientras que fue inhibida a pH 4.5 aunque la bacteria permaneció viable. Al infectar las

larvas con la DL 50 la mortalidad fue mayor en los pH probados (5.5, 6.5 y 7.2) siendo significativa a pH 7.2 después de las 24 h comparada con la obtenida a pH 5.5 y 6.5 (Figura 4). Estudios previos *in vitro* han demostrado que el cambio a altas temperaturas ($> 30^{\circ}\text{C}$) impulsa las modificaciones del transcriptoma del SGB y la expresión diferencial de genes. El crecimiento de GBS a 40°C induce la regulación positiva de los genes de virulencia, en particular los que codifican para hemolisinas, ADNsas, proteínas de homeostasis de hierro y el metabolismo de purinas / pirimidinas(8).

Se ha reconocido que la capacidad del GBS para soportar la variabilidad del pH varía desde la colonización del nicho ácido hasta la invasión del torrente sanguíneo neutro, la placenta o el pulmón (pH 6.4). Los estudios de expresión génica han demostrado una regulación positiva de los determinantes de virulencia a un pH casi neutro, mientras que los factores de colonización se sobreexpresan a un pH ácido (5.5) (9).

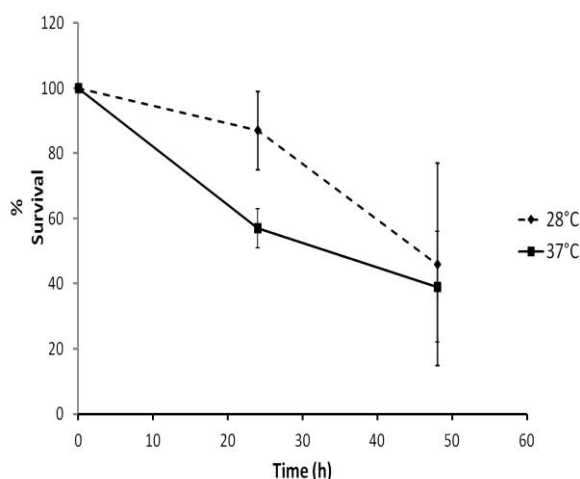


Figure 3. Temperature effects on killing rates induced by GBS infection. Larvae injected with 1×10^7 CFU were incubated at 37°C and 28°C . After 24 h infection the killing rate at 37°C was 43% vs 13% at 28°C . The means $\pm$ SD of three independent experiments are shown.

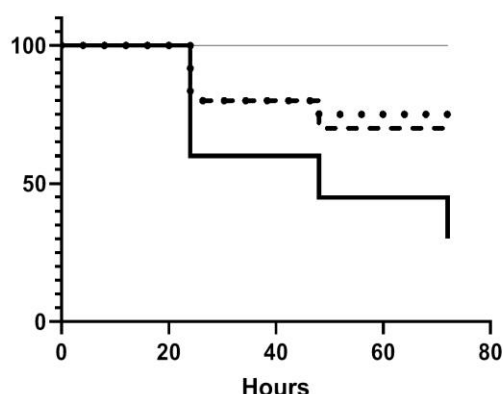


Figure 4. pH effects on killing rates depend on infection inoculum. Killing rates were significantly higher at pH 7.2 as the inoculum increases. Groups of larvae were injected with control media adjusted to each pH, all the control larvae survived over time.

4.3 *L. gasseri*, previene la mortalidad de larvas inducida por SGB

La infección de las larvas con *L. gasseri*, un colonizante de la vagina y el tracto gastrointestinal, muestra poca o ninguna mortalidad similar a los controles no infectados ($p = 0.35$) (Figura 5). Cuando *L. gasseri* ATCC 19992 se combinó con *S. agalactiae* ATCC 12403 en varias proporciones, se observó un cambio en la mortalidad en comparación con las larvas infectadas sólo con *S. agalactiae*. Mezclas en 1:2 y 7:1 *L. gasseri* / *S. agalactiae* que simulan poca o ninguna alteración de la microbiota (50% de *Lactobacillus* y $\sim 90\%$ de *Lactobacillus* respectivamente) mostraron tasas de mortalidad cercanas a las del control no infectado o *L. gasseri* por sí mismo. Los efectos protectores de *L. gasseri* se correlacionaron con la proporción de *Lactobacillus*.

Para verificar el potencial inhibitorio de *L. gasseri* sobre la virulencia de *S. agalactiae*, realizamos un ensayo de inhibición utilizando un aislado humano hipervirulento, ST-17 (GBS 44-ST17). Esta cepa mostró una mayor tasa de mortalidad después de 24 h con una DL_{50} mucho menor que la de *S. agalactiae* ATCC 12403 (es decir, $\sim 1 \times 10^6$ UFC frente a $\sim 1 \times 10^7$

UFC respectivamente). La incubación de GBS 44-ST17 con filtrados de *L. gasseri* (pH 5) evitó notablemente la mortalidad de las larvas en comparación con las inyectadas con GBS 44-ST17 en medio de cultivo y que murieron después de 24 h aún en el inóculo más bajo probado (3×10^6 UFC). Los efectos protectores de los filtrados de *L. gasseri* se observaron incluso en los inóculos más altos probados y particularmente en aquellos en la fase exponencial (Figura 6 A). Después de 6 días, el 20% de las larvas permanecieron vivas y la formación de capullos y pupas no se vio afectada. Los filtrados neutralizados de *L. gasseri* solo fueron protectores en inóculos bajos de GBS 44-ST17 con una mortalidad significativamente más bajas que GBS 44-ST17 en medio de cultivo a pH 7.2 ($p = 0.0023$).

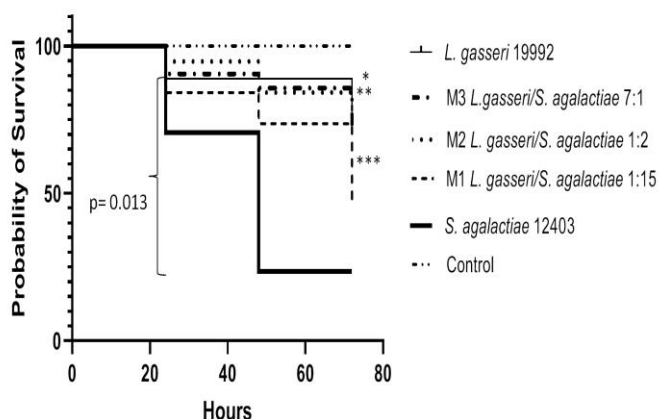


Figure 5. Influence of *L. gasseri* in larva infection with GBS. *S. agalactiae* ATCC 12403 and *L. gasseri* were grown overnight and inocula adjusted to $3-4 \times 10^8$ CFU/mL before being mixed at the ratios indicated. Little or no killing was observed over time after infection with *L. gasseri*. Survival of larvae injected with each combination was compared to that of the *L. gasseri* by its own as follows *M3 $p=0.66$, **M2 $p=0.53$ ***M1 $p=0.15$. Brackets shows the differential pathogenesis between GBS and *L. gasseri*. Three independent experiments were performed in duplicate, one representative experiment is shown. Both strains were recovered from dead larva in all cases.

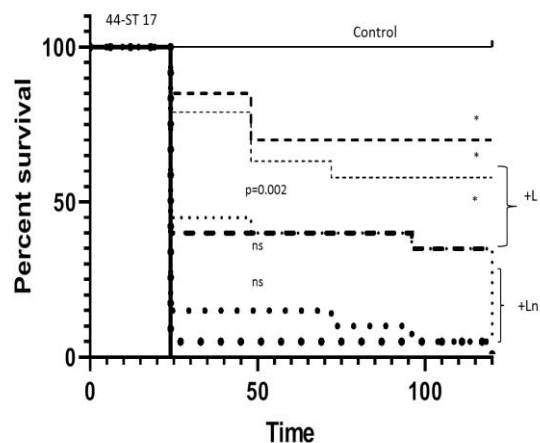


Figure 6. Filtrates of *L. gasseri* significantly improved survival of *G. mellonella* after infection with a GBS hypervirulent isolate. *L. gasseri* antagonism is dose-dependent. Solid lines represents killing curves after infection with GBS 44-ST17 in culture media. GBS 44-17ST inocula + *L. gasseri* filtrate (44 ST 17/L) is shown in dashed lines. GBS 44-ST17 inocula + neutralized filtrates of *L. gasseri* (44-ST17/Ln) is indicated in dotted lines. Inocula density is represented by line thickness. * $p < 0.001$

En general, nuestro estudio proporciona evidencia del antagonismo *in vivo* de células y filtrados de *L. gasseri* contra la infección por SGB. Se ha informado que esta especie de *Lactobacillus* es productora de altas cantidades de ácido láctico y una amplia gama de moléculas con una fuerte actividad antimicrobiana(10). Una variedad de productos secretados que incluyen bacteriocinas (gassericinas), péptidos bioactivos, biosurfactantes y exopolisacáridos (11) se han caracterizado por diferentes cepas de *L. gasseri* de origen humano y animal. Las moléculas derivadas de *L. gasseri* han mostrado una gama de efectos inhibitorios contra hongos, bacterias gram negativas y gram positivas, producción de biopelículas y células cancerosas (12). Además, Maldonado *et al.*, encontraron que una nueva bacteriocina de *L. gasseri* EV1461, la gassericina E fue capaz de inhibir el crecimiento de patógenos asociados a la vaginosis bacteriana(13). Los estudios sobre los efectos anti-GBS de *Lactobacillus* *in vivo* aún son limitados, sin embargo, varios grupos han demostrado los efectos *in vitro* de *Lactobacillus*, incluida la coagulación y la inhibición del crecimiento o la adherencia (14,15). Recientemente, un estudio de Marziali *et al.* sugirió actividad *in vitro* de *Lactobacillus* anti-SGB después de 60 minutos de exposición potencialmente mediada por componentes no proteicos de la pared celular (16).

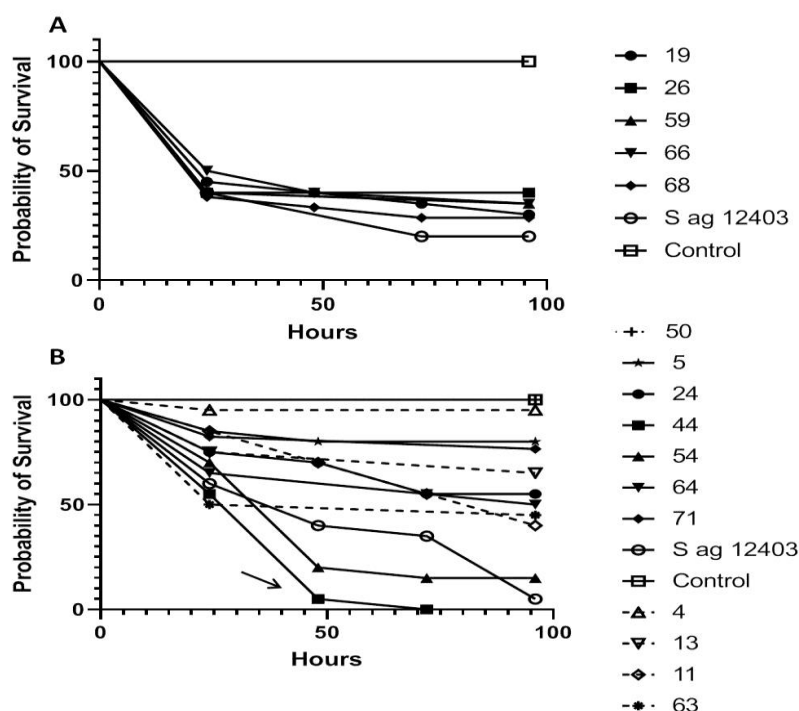
4.4 Infección de *G. mellonella* con aislados clínicos de SGB

La infección de 16 aislados de GBS humanos se evaluó en el modelo de *Galleria* y las curvas

de mortalidad se compararon con las de *S. agalactiae* ATCC 12403. Cinco aislados de SGB-I mostraron mortalidad > 45% después de 24 h y las curvas de supervivencia fueron similares a las de *S. agalactiae* ATCC 12403 ($p = 0.938$) (Figura 7A). Por el contrario, la mayoría de los aislamientos de SGB-NI generalmente causaron niveles de mortalidad más bajas (<45%), sólo 3 de 11 mostraron tasas de mortalidad más altas (Figura 7B). En general, las tasas de eliminación de larvas después de 24 h fueron diferentes en SGB-I vs SGB-NI ($p = 0.025$). No se encontraron tendencias particulares entre el tipo de cápsula o tipo de muestra y la mortalidad.

4.5 Análisis fenotípicos y de interacción con el hospedero

Se examinó la expresión fenotípica de dos factores de virulencia de SGB antes y después de la infección por *Galleria*. La mayoría de los aislamientos de GBS (12/16) eran productores débiles de biopelícula, mientras que sólo 4 de 16 presentaron poca o ninguna hemólisis. El SGB recuperado de las larvas no mostró cambios relevantes en la producción de hemólisis o la formación de biopelícula. La tasa de mortalidad en las larvas no mostró asociación con la formación de biopelícula o la hemólisis. No se observaron diferencias en la internalización de los aislados invasivos y no invasivos en los hemocitos.



5.0 CONCLUSIONES

El invertebrado *Galleria mellonella* es un modelo útil y reproducible para comprender la virulencia de SGB y sus interacciones *in vivo*. A pesar de las limitaciones inherentes de un modelo de invertebrados (falta de respuesta inmune adaptativa), *G. mellonella* parece ser representativa para el estudio básicos de aislados clínicos de SGB en humanos. Las observaciones en el modelo *Galleria* sugieren que el control del inóculo *in vivo* es relevante. La

inhibición competitiva de *Lactobacillus* y el pH ácido impidieron la muerte en el modelo, respaldando que el equilibrio de la microbiota y las condiciones de pH son fundamentales para inhibir la proliferación de SGB y la eventual producción de factores de virulencia.

Hemos proporcionado evidencia que sustenta el antagonismo de *L. gasseri* sobre la replicación de SGB y la expresión de virulencia *in vivo*. Hasta donde sabemos, estos son los primeros datos sobre la infección de *L. gasseri* y ensayos antagonistas en *G. mellonella*. Aunque los efectos inhibitorios de *L. gasseri* en *Galleria* infectada con SGB pueden ser mediados por la acidificación del pH, otros mecanismos subyacentes pueden tener participación y deberían ser investigados a fondo. También queda por explorar si se observan efectos inhibitorios similares sobre el clon hipervirulento ST17 en otras especies de *Lactobacillus* o si se observan selectivamente en cepas de *L. gasseri*. Dados sus posibles efectos sobre las cepas hipervirulentas, *L. gasseri* debe considerarse en las estrategias alternativas de control de SGB basadas en formulaciones de *Lactobacillus*.

Referencias

1. Morach M, Stephan R, Schmitt S, Ewers C, Zschöck M, Reyes-Velez J, et al. Population structure and virulence gene profiles of Streptococcus agalactiae collected from different hosts worldwide. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2018;37(3):527–36.
2. Jorjão AL, Oliveira LD, Scorzoni L, Figueiredo-Godoi LMA, Prata MCA, Jorge AOC, et al. From moths to caterpillars: Ideal conditions for galleria mellonella rearing for in vivo microbiological studies. Virulence [Internet]. 2018;9(1):383–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1397871>
3. Nizet V, Gibson RL, Chi EY, Framson PE, Hulse M, Rubens CE. Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. Infect Immun. 1996;64(9):3818–26.
4. D'Urzo N, Martinelli M, Pezzicoli A, De Cesare V, Pinto V, Margarit I, et al. Acidic pH strongly enhances in vitro biofilm formation by a subset of hypervirulent ST-17 Streptococcus agalactiae strains. Appl Environ Microbiol. 2014;80(7):2176–85.
5. Six A, Krajangwong S, Crumlish M, Zadoks RN, Walker D. Galleria mellonella as an infection model for the multi-host pathogen Streptococcus agalactiae reflects hypervirulence of strains associated with human invasive disease. Virulence [Internet]. 2019;10(1):600–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1631660>
6. Borges S, Silva J, Teixeira P. Survival and biofilm formation by Group B streptococci in simulated vaginal fluid at different pHs. Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol. 2012;101(3):677–82.
7. Yang Q, Porter AJ, Zhang M, Harrington DJ, Black GW, Sutcliffe IC. The impact of pH and nutrient stress on the growth and survival of streptococcus agalactiae. Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol. 2012;
8. Mereghetti L, Sitkiewicz I, Green NM, Musser JM. Remodeling of the Streptococcus agalactiae transcriptome in response to growth temperature. PLoS One. 2008;3(7).
9. Santi I, Grifantini R, Jiang SM, Brettoni C, Grandi G, Wessels MR, et al. CsrRS regulates group B Streptococcus virulence gene expression in response to environmental pH: A new

- perspective on vaccine development. *J Bacteriol.* 2009;191(17):5387–97.
10. Atassi F, Pho Viet Ahn DL, Lievin-Le Moal V. Diverse Expression of Antimicrobial Activities Against Bacterial Vaginosis and Urinary Tract Infection Pathogens by Cervicovaginal Microbiota Strains of *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus crispatus*. *Front Microbiol.* 2019;10(December):1–13.
 11. Wang K Di, Xu DJ, Wang BY, Yan DH, Lv Z, Su JR. Inhibitory Effect of Vaginal *Lactobacillus* Supernatants on Cervical Cancer Cells. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2018;
 12. Kasuga G, Tanaka M, Harada Y, Nagashima H, Yamato T, Wakimoto A, et al. Homologous expression and characterization of gassericin T and gassericin S, a novel class IIb bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA327. *Appl Environ Microbiol.* 2019;85(6):1–13.
 13. Maldonado-Barragán A, Caballero-Guerrero B, Martín V, Ruiz-Barba JL, Rodríguez JM. Purification and genetic characterization of gassericin E, a novel co-culture inducible bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* EV1461 isolated from the vagina of a healthy woman. *BMC Microbiol* [Internet]. 2016;16(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-016-0663-1>
 14. Ortiz L, Ruiz F, Pascual L, Barberis L. Effect of two probiotic strains of *Lactobacillus* on in vitro adherence of *listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*, and *Staphylococcus aureus* to vaginal epithelial cells. *Curr Microbiol.* 2014;
 15. Ruíz FO, Gerbaldo G, García MJ, Giordano W, Pascual L, Barberis IL. Synergistic effect between two bacteriocin-like inhibitory substances produced by *lactobacilli* strains with inhibitory activity for *Streptococcus agalactiae*. *Curr Microbiol.* 2012;
 16. Marziali G, Foschi C, Parolin C, Vitali B, Marangoni A. In-vitro effect of vaginal *lactobacilli* against group B *Streptococcus*. *Microb Pathog.* 2019;

4. Impactos actual o potencial:

Haga una descripción y/o relacione los impactos que tenga el proyecto en los diferentes ámbitos:

Académico (aportes a la docencia, aportes a la formación de recursos humanos)

Investigativo (divulgación de resultados)

Desarrollos futuros

Impactos del proyecto

Impacto académico: el proyecto ha contribuido a la generación de conocimiento en lo concerniente al establecimiento de un modelo para el estudio in vivo de la virulencia e interacciones de microorganismos. Se vinculó a este proyecto un estudiante en calidad de monitor el cual realizó su entrenamiento con el modelo y en el montaje de ensayos específicos. En el futuro el estudiante ha solicitado realizar su trabajo de campo en el área. También se ofrecerá un cupo para un estudiante de maestría para examinar en profundidad algunos de los hallazgos. En el Departamento y específicamente en el área de entomología se inició una colonia local del modelo para continuar con la línea de investigación. .

Impacto investigativo: Durante el desarrollo de este trabajo se han realizado tres ponencias en congresos, dos orales y una a manera de poster. Una de las ponencias se realizó en un evento internacional. Se ha sometido un artículo que nos posicionará dentro del grupo de investigadores que trabaja con el modelo y que dará continuidad a nuestra línea de investigación. La información generada por el estudio, realizará un aporte para el diseño y/o fortalecimiento de estrategias para la prevención de las infecciones por el *Streptococcus* del grupo B en población susceptible.

Desarrollos futuros. Se espera que el establecimiento y experiencia obtenida en el manejo del modelo permitan su aplicación en diferentes áreas de la investigación en microbiología como por ej: realizar estudios de virulencia con otros microorganismos, interacción con la respuesta inmune, ensayos de toxicidad, tamizaje de antibióticos y combinaciones antibióticos. También se piensa en adaptar otros modelos invertebrados.

5. Productos:

Tabla No. 1. **Cantidad y tipo de productos pactados en el Acta de Trabajo y Compromiso y productos finalmente presentados**

TIPO DE PRODUCTOS	No. de PRODUCTOS PACTADOS				No. de PRODUCTOS PRESENTADOS			
Productos de nuevos conocimientos	1				<u>1 articulo sometido</u>			
Artículo en revista ISI-SCOPUS:	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
			X			x		
Artículo completo publicado en revistas indexadas	A1	A2	B	C	A1	A2	B	C
			X			x		
Libros de autor que publiquen resultados de investigación	-							
Capítulos en libros que publican resultados de investigación	-							
Productos o procesos tecnológicos patentados o registrados	-							
• Prototipos y patentes	-							
• Software	-							
Productos o procesos tecnológicos usualmente no patentables o protegidos por secreto industrial	-							
Normas basadas en resultados de investigación	-							
Formación de recursos humanos	No. de estudiantes vinculados	No. de tesis			No. De estudiantes Vinculados	No. De tesis		
Estudiantes de pregrado	-	-			1 Monitor			
Semillero de Investigación	-	-			1			
Estudiantes de maestría	-	-			-	-		

TIPO DE PRODUCTOS	No. de PRODUCTOS PACTADOS		No. de PRODUCTOS PRESENTADOS	
Estudiantes de doctorado	-	-	-	-
Joven investigador	-	-		
Productos de divulgación				
Publicaciones en revistas no indexadas				
Ponencias presentadas en eventos (congresos, seminarios, coloquios, foros)	No. de ponencias nacionales 1	No. de ponencias internacionales	No. de ponencias nacionales 2	No. de ponencias internacionales 1
Propuesta de investigación	-	-		
Propuestas presentadas en convocatorias externas para búsqueda de financiación.				

Tabla No. 2. Detalle de productos

Para cada uno de los productos obtenidos y relacionados en la tabla anterior, indique la información solicitada para cada uno, anexando copia de las respectivas constancias. Como anexo a este formato encontrará el instructivo para instructivo para la revisión de informes finales y productos

Tipo de producto:	Ponencia Nacional (1) (productos de divulgación)
Nombre General:	Simposio de Investigaciones Universidad del Valle
Nombre Particular:	Establecimiento de un modelo invertebrado para el estudio in vivo de la patogénesis in vivo de aislados humanos de <i>Streptococcus agalactiae</i> (SGB)
Ciudad y fechas:	Cali, Universidad del Valle, Octubre 23, 24 y 25 de 2019
Participantes:	María del Pilar Crespo-Ortiz, María Elena Burbano, Mauricio Barreto
Sitio de información:	Vicedecanato de Investigaciones de la Facultad de Salud
Formas organizativas:	Grupo de Microbiología y Enfermedades Infecciosas

Tipo de producto:	Ponencia Nacional (2) (productos de divulgación)
Nombre General:	XVII Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical
Nombre Particular:	<i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera) un modelo para el estudio de la patogénesis de microorganismos causantes de infección humana.
Ciudad y fechas:	Cali, ICESI , Diciembre 4 al 6 de 2019
Participantes:	María del Pilar Crespo-Ortiz, María Elena Burbano, Mauricio Barreto
Sitio de información:	Biomédica, 2019, 39 Supl 4: 152
Formas organizativas:	Grupo de Microbiología y Enfermedades Infecciosas

Tipo de producto:	Ponencia Internacional (1) (productos de divulgación)
Nombre General:	The American Society of Tropical Medicine and Hygiene 68th Annual Meeting
Nombre Particular:	<i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera) a potential <i>in vivo</i> model for assessing the pathogenesis of Group B <i>Streptococcus</i>
Ciudad y fechas:	National Harbor, Maryland (adjacent to Washington, DC) USA. November 20-24, 2019
Participantes:	María del Pilar Crespo-Ortiz, María Elena Burbano, Mauricio Barreto
Sitio de información:	ASTMH 2019, Abstract Book
Formas organizativas:	Grupo de Microbiología y Enfermedades Infecciosas

Tipo de producto:	Artículo (1) (Nuevo conocimiento)
Nombre General:	Microbial Pathogenesis
Nombre Particular:	Pathogenesis and <i>in vivo</i> interactions of human <i>Streptococcus agalactiae</i> isolates in the <i>Galleria mellonella</i> invertebrate model
Ciudad y fechas:	Sometido 30 de Abril 2020
Participantes:	María del Pilar Crespo-Ortiz, María Elena Burbano, Mauricio Barreto
Sitio de información:	https://www.sciencedirect.com/journal/microbial-pathogenesis
Formas organizativas:	Grupo de Microbiología y Enfermedades Infecciosas

Tipo de producto:	Formación de recurso humano
Nombre General:	Estudiante de Semillero de Investigación
Nombre Particular:	Semillero de Investigación Grupo Microbiología y Enfermedades Infecciosas
Ciudad y fechas:	Cali, 2019
Participantes:	Farid Uribe Código 1342213 (también fue el monitor)
Sitio de información:	Escuela de Bacteriología. Universidad del Valle
Formas organizativas:	Grupo de Microbiología y Enfermedades Infecciosas

La presente versión del informe contiene las observaciones de los evaluadores:



MARIA DEL PILAR CRESPO ORTIZ

Firma del investigador principal

VoBo. Vicedecano de Investigaciones



*Por favor presente su informe impreso y en formato digital en hoja tamaño carta, letra arial 11,
con espacios de 1 1/2*