



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR EN LA
TIPIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS
DE *Streptococcus agalactiae*.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

IRMA ELOISA MONROY MUÑOZ



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente PROFESORA MARÍA DEL CARMEN CORTÉS DECUIR

Vocal PROFESOR RAÚL GARZA VELASCO

Secretario PROFESOR LUIS MANUEL PEREA MEJÍA

1er. Suplente PROFESOR ALEJANDRO CAMACHO CRUZ

2do. Suplente PROFESOR LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio de Epidemiología Molecular, Tercer Piso, Torre de Investigación, Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM. Con el financiamiento de DEGAPA-UNAM, Proyectos: IN-218103 e IN-215608-3.

M. en C. Luis Manuel Perea Mejía
Asesor

M. en C. Alma Edna Inzunza Montiel
Supervisor Técnico

Irma Eloisa Monroy Muñoz
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

- **M. en C. Luis Manuel Perea Mejía:** Mil gracias por haberme brindado la oportunidad de trabajar con ustedes, por su confianza y apoyo en todo momento, por recordarme con su ejemplo lo maravillosa y gratificante que puede ser nuestra profesión, y sobretodo, gracias por no sólo haber sido mi profesor, sino un excelente amigo y un maravilloso ser humano.
- **M. en C. Alma Edna Insunza Montiel:** Gracias por todo su apoyo, paciencia y comprensión, por ser un modelo a seguir de dedicación, empeño y trabajo y por encima de todo, gracias por su amistad.
- **Dra. Laura Ongay y Guadalupe Codiz:** Por colaborar con las secuencias presentadas en este trabajo.
- **Q.F.B. Sara Juárez y Q.F.B. Mónica Tobias:** Por otorgarnos el material biológico que hizo posible la realización de este trabajo.
- **A mis padres:** Por ser el pilar que sostiene mi vida, por ser un ejemplo a seguir y por apoyar siempre todas y cada una de mis decisiones. Mil gracias por su cariño, y por esas palabras de aliento que me han hecho levantarme de todas mis derrotas y logrado todas mis metas. Gracias por creer en mí.
- **A mi hermano:** Por ser como eres, por siempre estar cuando te he necesitado, por todas y cada una de las peleas que le han dado el condimento necesario a mi vida, y aunque a veces no lo parezca, te quiero mucho.

- **A mis abuelos, tíos, primos y sobrinos:** Gracias por su comprensión en todos aquellos momentos en los que no pude estar con ustedes y por seguirme queriendo a pesar de ello. Gracias por creerme loca al estudiar esta carrera.

- **Noé:** Gracias por ser mi novio y compañero, por apoyarme siempre, por aguantar mis continuos ataques de histeria, por haberme sostenido todas y cada una de las veces que tropecé, por estar para mí en todo momento, hasta incluso a altas horas de la madrugada, por abrazarme y besarme cuando más lo necesitaba, por enseñarme a reír de mis errores y de los golpes de la vida, por ayudarme a aceptar mis defectos, por creer en mí, por brindarme siempre una sonrisa, por anteponer siempre el nosotros al yo, por nunca permitirme cargar con el peso sola; y por encima de todo, mil gracias por amarme.

- **Pancho:** Gracias por estar a mi lado, por aceptarme y quererme con todo y mis defectos, por brindarme siempre un abrazo sincero, por ser siempre honesto y transparente, pero sobretodo gracias por ser la definición más exacta de la frase “mi mejor amigo”. Te quiero mucho.

- **A las familias de Noé y Pancho:** Por haberme abierto las puertas de su hogar, por haberme dado su confianza y por habernos aguantado tanto durante estos 5 años.

- **Laura, Gustavo y Jonathan:** Gracias por ser mis eternos amigos, por mantener nuestra relación a través del tiempo y de toda circunstancia.

- **A mis maestras y maestros:** Cecilia Socorro, Araceli Rergis, Thalina Rodríguez, Raúl Garza, Ma. Carmen Cortés, Misael González, Yolanda González, Laura Bonifaz, Rosa Elena Sarmiento, José Cordero y Benita Leonor, por haberme formado; y algunos de ellos por honrarme con su amistad.

- **A mis amigos de la carrera Pedro, Dulce, Dorys, Oliver, Jenny, Juan Carlos, Fer, Faby, Adriana, Akemi, Hiro, Araceli, Rocío, Ángela, Alfred, Javis, Jeza, Meche y Claudio:** Mil gracias por su amistad y por haberme permitido ser parte de sus vidas. Los quiero y siempre los tendré presentes.

“El hombre más lento que no pierde de vista el fin, va siempre más veloz que el que va sin perseguir un punto fijo”.

Gotthold W. Lessing

ÍNDICE

ABREVIATURAS	IV
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	6
Objetivo General	6
Objetivos Específicos	6
I. GENERALIDADES	7
1. El género <i>Streptococcus</i>	7
2. <i>Streptococcus agalactiae</i>	9
2.1. Clasificación y características morfológicas	9
2.2. Identificación	10
2.3. Clasificación serológica	13
Carbohidrato del Grupo B	13
Carbohidrato capsular tipo específico (CPS)	15
Serotipos Ia y Ib	16
Serotipo II	18
Serotipo III	19
Serotipo IV	20
Serotipo V	21
Serotipo VI	22

Serotipo VII	23
Serotipo VIII	24
Importancia del ácido siálico como un componente estructural y factor de virulencia	25
Genética de los antígenos CPS	27
Proteínas C- α y C- β	28
Proteína Rib	29
Proteína del serotipo V tipo- α	29
Proteínas R	30
Factor de CAMP	30
2.4. Patogénesis e inmunidad	31
2.5. Epidemiología y transmisión	32
Colonización asintomática	32
Colonización materna	32
Colonización infantil	35
Enfermedades clínicas	36
Infecciones en varones y mujeres no embarazadas	36
Infecciones en mujeres embarazadas	37
Infecciones en neonatos	37
2.6. Tratamiento y prevención	38
II. PARTE EXPERIMENTAL	40

1. Material Biológico	40
2. Identificación de <i>Streptococcus agalactiae</i>	40
3. Tipificación de <i>Streptococcus agalactiae</i>	46
3.1. Extracción de ADN	46
3.2. Amplificación de los genes <i>cfb</i> , <i>cpsIa</i> , <i>cpsIb</i> , <i>cpsII</i> , <i>cpsIII</i> , <i>cpsIV</i> , <i>cpsV</i> , <i>cpsVI</i> , <i>cpsVII</i> y <i>cpsVIII</i>	48
3.3. Purificación de los productos de la PCR de los genes <i>cfb</i> , <i>cpsIa</i> , <i>cpsIb</i> , <i>cpsII</i> , <i>cpsIII</i> , <i>cpsV</i> , y <i>cpsVI</i>	55
3.4. Secuenciación de los productos de la PCR de los genes <i>cfb</i> , <i>cpsIa</i> , <i>cpsIb</i> , <i>cpsII</i> , <i>cpsIII</i> , <i>cpsV</i> , y <i>cpsVI</i>	57
4. Resultados y Discusión	58
4.1. Identificación de <i>Streptococcus agalactiae</i>	58
4.2. Tipificación de <i>Streptococcus agalactiae</i>	59
Extracción de ADN	59
Amplificación de los genes <i>cfb</i> , <i>cpsIa</i> , <i>cpsIb</i> , <i>cpsII</i> , <i>cpsIII</i> , <i>cpsIV</i> , <i>cpsV</i> , <i>cpsVI</i> , <i>cpsVII</i> y <i>cpsVIII</i>	60
Purificación de los productos de la PCR de los genes <i>cfb</i> , <i>cpsIa</i> , <i>cpsIb</i> , <i>cpsII</i> , <i>cpsIII</i> , <i>cpsV</i> , y <i>cpsVI</i>	70
Secuenciación de los productos de la PCR de los genes <i>cfb</i> , <i>cpsIa</i> , <i>cpsIb</i> , <i>cpsII</i> , <i>cpsIII</i> , <i>cpsV</i> , y <i>cpsVI</i>	72
Análisis de las secuencias	76

Establecimiento de posibles relaciones entre la frecuencia de serotipos por
aislamiento clínico80

Conclusiones88

Bibliografía89

SS	Secretaría de Salud
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
TBE	Buffer de Tris-Boratos-EDTA
TCA	Ácido Tricloroacético
Tris	Hidroximetilaminometano
U	Unidades
UFC	Unidad Formadora de Colonias
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV	Luz Ultravioleta

INTRODUCCIÓN

En la década de los 30's, con perspicacia en la interpretación de los resultados obtenidos con técnicas inmunológicas, consideradas como poco sensibles bajo los estándares actuales, Rebecca Lancefield y colaboradores, establecieron las bases que por décadas rigieron el estudio de *Streptococcus agalactiae*, también conocido como Estreptococo del Grupo B (EGB). En contraste con el Estreptococo del Grupo A, el cual fue aislado de humanos, las primeras cepas de *Streptococcus agalactiae* estudiadas por Lancefield, se obtuvieron de muestras de leche de vacas con diagnóstico de mastitis, e inclusive, a partir de "leche normal". En ese tiempo, *Streptococcus agalactiae* era bien conocido como causa de la mastitis bovina, representando una importante preocupación para la industria alimentaria (9, 15, 27, 42).

Las infecciones debidas al Estreptococo del grupo B pueden ser relativamente consideradas como enfermedades modernas. En el año de 1938, Fry ⁽¹³⁾ lo reportó por primera vez como patógeno para el ser humano, al describir tres casos graves de sepsis puerperal ^(36, 42). Sin embargo, no fue sino hasta los años 60's, cuando este patógeno llamó seriamente la atención, al generarse varios reportes acerca de la presencia de cepas hemolíticas del *Streptococcus agalactiae* en recién nacidos que presentaban septicemia y/o meningitis ^(7, 17). Más tarde, en la década de los 70's, el Estreptococo del Grupo B, se convirtió en el patógeno causante del mayor número de casos de septicemia (eclipsando a *Escherichia*

coli) y meningitis en niños menores de tres meses, obligando a las instituciones de salud de varios países a considerar prioritariamente la prevención de estas afecciones^(1, 9, 34, 36, 46).

Lancefield definió dos antígenos en la pared celular del estreptococo del grupo B; el específico de grupo o carbohidrato C, común a todas las cepas de este grupo, y el específico de tipo o sustancia S, el cual permitió la clasificación inicial en los serotipos I, II y III. Lancefield reportó variantes entre las cepas del serotipo I⁽²⁸⁾, las cuales a principios de la década de los 70's fueron designadas como Ia, Ib y Ic. Estas cepas poseen un antígeno polisacárido capsular, Ia o Ib, y algunas cepas Ia y todas las cepas Ib presentan una proteína antigénica de superficie, designada hoy en día como proteína C, la cual se encuentra en aproximadamente el 60% de los integrantes del serotipo II, y de forma ocasional en cepas de los serotipos III y V. La nomenclatura de *Streptococcus agalactiae* ha sido revisada para designar a los polisacáridos capsulares como antígenos específicos de grupo y a las proteínas de superficie como marcadores antigénicos adicionales. Por tanto, el anteriormente denominado serotipo Ic, actualmente es designado como Ia/c; en el caso del serotipo Ib, ahora es conocido como Ib/c; y las cepas denominadas como Ia, son aquellas que carecen de proteína C. Al menos se han descrito dos tipos de proteína C: las proteínas α y β . En general, *Streptococcus agalactiae* puede presentar una o ambas proteínas. Otras proteínas, conocidas como R y Rib, se encuentran en algunas cepas, pero su

importancia biológica aun se desconoce. Adicionalmente se han descrito los serotipos capsulares IV, V, VI, VII y VIII (también conocido como JM9), cada uno con polisacáridos únicos, con o sin proteínas antigénicas; y otros candidatos están siendo evaluados, como el recientemente descubierto serotipo IX ⁽⁵⁶⁾.

Lancefield demostró que los anticuerpos dirigidos contra los antígenos polisacáridos Ia, Ib y II, pero no en contra del III, proveen protección pasiva a ratones inoculados con cepas que poseen antígenos homólogos. Subsecuentemente con el uso de ensayos modificados se logró obtener anticuerpos contra el antígeno capsular tipo III. Las proteínas α , β y Rib, también pueden inducir anticuerpos protectores en modelos animales, aunque el papel que juegan dentro de la infección en humanos se desconoce. Los anticuerpos dirigidos contra el antígeno de grupo no generan protección alguna ^(35, 36, 42, 51).

Actualmente a nivel mundial, la colonización con *Streptococcus agalactiae*, factor de riesgo para la sepsis neonatal, ha sido detectada en hombres, mujeres embarazadas o no embarazadas, y ancianos. A pesar de que la incidencia de enfermedades debidas al Estreptococo del grupo B es baja, la situación antes descrita acentúa la necesidad de concretar el desarrollo de vacunas a nivel mundial en contra de este patógeno ⁽⁹⁾. Para ello se requiere de estudios epidemiológicos extensivos para entender la enfermedad, y conocer la distribución de los serotipos de *Streptococcus agalactiae*, lo que permitiría determinar óptimas formulaciones de antígenos en las vacunas. Una distribución basada en los

serotipos de una sola localización geográfica o de un pequeño grupo de pacientes, no resultaría útil. El continuo monitoreo promoverá la obtención de combinaciones antigénicas aplicables a diferentes poblaciones “blanco” en diversas zonas geográficas ^(24, 38).

Streptococcus agalactiae coloniza el tracto digestivo inferior, el tracto respiratorio, así como el tracto genitourinario ^(36, 40, 52). El 10 a 30% de las mujeres embarazadas han presentado un estado transitorio de colonización a nivel de tracto vaginal, debido a que alrededor del 40% de mujeres embarazadas tienen el tracto gastrointestinal colonizado con Estreptococos del grupo B, lo que establece la introducción de dichas bacterias en la vagina mediante malas prácticas de higiene y limpieza. En las mujeres no gestantes se ha observado una incidencia similar ⁽⁴⁰⁾.

Aproximadamente el 60% de los niños que nacen de madres colonizadas por *Streptococcus agalactiae* son infectados durante su paso a través del canal del parto. Los serotipos que se asocian con más frecuencia a la enfermedad neonatal son el Ia (35-40%), III (30%) y V (15%) ^(16, 40). A partir de 1990, el serotipo V ha aparecido rápidamente en Norteamérica, Europa y Asia, como causa frecuente de infecciones invasivas en neonatos y adultos; además, se le ha citado manifestando entre un 30 y 68% de resistencia a eritromicina para *Streptococcus agalactiae* ⁽³⁸⁾. Los serotipos Ia y V son los más comunes en la enfermedad del adulto, mientras que el serotipo III se aísla con menos frecuencia ^(1, 52). En

reportes sobre los casos no invasivos, los serotipos más predominantes en E.U.A y en el oeste de Europa son el Ia, III y V ⁽³⁹⁾.

La gama de infecciones ocasionadas por *Streptococcus agalactiae* es mayor en adultos que en neonatos, sin embargo la incidencia global en estos últimos es más elevada. El riesgo de enfermedad es mayor en las mujeres embarazadas que en hombres y mujeres no gestantes. Las infecciones del tracto urinario, la amnionitis, la endometritis e infecciones de heridas son las más frecuentes en mujeres embarazadas. Las infecciones en hombres y en mujeres no embarazadas son fundamentalmente de tipo cutáneo y de tejidos blandos, así como bacteriemia, sepsis urinaria y neumonía ^(40, 52).

I. GENERALIDADES

1. El género *Streptococcus*

El género *Streptococcus* pertenece a la familia *Streptococcaceae*, la cual incluye veinte especies, entre las que destacan por su mayor importancia clínica las siguientes: *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae* y *Enterococcus faecalis*. Es un grupo formado por cocos Gram-positivos que normalmente se disponen en pares o cadenas. La mayoría de las especies son anaerobias facultativas, y algunas sólo crecen en atmósfera enriquecida con dióxido de carbono (crecimiento capnofílico). Sus requerimientos nutricionales son complejos, necesiándose para su aislamiento el uso de medios enriquecidos con sangre o suero de carnero. Fermentan carbohidratos produciendo ácido láctico y, a diferencia de las especies de *Staphylococcus*, son catalasa-negativos. Los Enterococos también crecen en presencia de concentraciones de cloruro de sodio (6.5%), 0.1% de azul de metileno y en agar bilis-esculina ^(3, 40).

Algunos Estreptococos elaboran un polisacárido capsular comparable al de *Streptococcus pneumoniae*. La mayor parte de las cepas de los grupos A, B y C producen cápsulas constituidas por ácido hialurónico, las cuales permiten a la bacteria impedir la fagocitosis. La pared celular contiene proteínas (antígenos M, T, R), carbohidratos específicos de grupo y peptidoglucanos ⁽³⁾.

Este género bacteriano se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza. Algunos integrantes son miembros de la microbiota humana normal; otros se asocian a enfermedades humanas importantes ⁽³⁾. La diferenciación de las especies puede resultar complicada de entender, debido a que se utilizan tres esquemas diferentes para clasificar a los microorganismos ⁽⁴⁰⁾:

- a) **Variación Antigénica:** Los grupos de Lancefield van de la A a la V, exceptuando I, J y N. Este esquema de la clasificación serológica fue descrito por Lancefield en 1933 para diferenciar entre las distintas cepas β -hemolíticas y se basa en una reacción de precipitación en capilar en la que participan el carbohidrato antigénico específico de grupo presente en la pared celular y un antisuero de conejo ^(36, 40).

- b) **Patrones Hemolíticos:** Hemólisis completa (β), hemólisis incompleta (α) y ausencia de hemólisis (a la cual algunos autores la refieren como hemólisis γ o No Hemolítico) ⁽⁴⁰⁾.

- c) **Propiedades Bioquímicas:** Algunos de los Estreptococos β -hemolíticos y no hemolíticos carecen de los antígenos de la pared celular específicos de grupo. Esas cepas se deben identificar con base en sus propiedades fisiológicas o bioquímicas ⁽⁴⁰⁾.

Estas pruebas incluyen reacciones de fermentación de azúcar, para determinar la presencia de enzimas y la susceptibilidad o resistencia a ciertos agentes químicos ⁽³⁾.

Las infecciones estreptocócicas son comunes en humanos, destacando por su frecuencia las del tracto respiratorio superior, principalmente la faringitis, seguida por las que afectan al tejido cutáneo-subcutáneo, como la erisipela, impétigo y fiebre escarlatina. Al igual que las infecciones estafilocócicas, las estreptocócicas provocan lesiones piogénicas (con formación de pus) ⁽⁵⁰⁾.

2. *Streptococcus agalactiae*

2.1. Clasificación y características morfológicas

La especie *agalactiae* pertenece al grupo B de Lancefield y está conformada por cocos Gram-positivos, anaerobios facultativos que crecen en una variedad de medios de cultivo. Las colonias obtenidas en agar sangre son de color blanco a grisáceo, presentan un diámetro aproximado de 0.5 a 2 mm, son planas, de

aspecto mucoso y generalmente están rodeadas por un halo estrecho de β -hemólisis en comparación con el de *Streptococcus pyogenes* (12, 15). Si bien *Streptococcus agalactiae* está ubicado dentro de los estreptococos β -hemolíticos, ya que la mayor parte de las cepas presentan este tipo de hemólisis; no obstante, alrededor del 1 ó 2 % son no hemolíticas (NH), y llegan a detectarse casos raros de α -hemolíticas (36).

Para asegurar la detección de *Streptococcus agalactiae* de sitios como el tracto gastrointestinal o genital, se emplea una serie de medios de cultivo selectivos, tales como el caldo Todd-Hewitt, adicionados con o sin sangre de carnero y agentes antimicrobianos como el ácido nalidíxico y la gentamicina o la colistina (36).

2.2. Identificación

La identificación definitiva de *Streptococcus agalactiae* se basa en la detección del carbohidrato o antígeno específico de grupo presente en la pared celular. Se han desarrollado una serie de métodos serológicos para la detección de dicho antígeno, mediante el uso de antisueros específicos, entre los cuales se encuentran Inmunolectroforesis, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) y aglutinación en látex, siendo esta última la más utilizada a nivel mundial (36).

Entre los métodos no serológicos que permiten la identificación presuntiva de *Streptococcus agalactiae* destacan la de CAMP y la de hidrólisis del hipurato de

sodio.

- a) Prueba de CAMP (Christie, Atkins, Munch-Peterson):** Sólo los estreptococos del grupo B son capaces de sintetizar un péptido difusible y termoestable, conocido como factor de CAMP, cuya principal característica biológica consiste en realzar la β -hemolisina de *Staphylococcus aureus*, ya que en el punto en el que convergen el factor de CAMP y la β -hemolisina, se observa una hemólisis más evidente, que aparece comúnmente en forma de punta de flecha.

Se siembra en agar gelosa sangre de carnero una estría recta de la cepa de *Staphylococcus aureus* y, previa esterilización del asa, se toma una asada del estreptococo problema, para trazar estrías rectas perpendiculares a la de *Staphylococcus aureus* (a 1cm aproximado de distancia). La placa se incuba durante 18 a 24 horas, a 35°C.

La producción del factor de CAMP se observa en un 98 a 100% de las cepas del grupo B ^(8, 14, 36).

- b) Prueba de Hidrólisis del Hipurato de Sodio:** *Streptococcus agalactiae* es el único capaz de producir la enzima hipuricasa, la cual actúa sobre el hipurato de sodio produciendo benzoato y glicina, compuestos que pueden identificarse con cloruro férrico y ninhidrina, respectivamente.

Para determinar la hidrólisis del hipurato de sodio se utiliza un medio compuesto por: Caldo Infusión Cerebro-Corazón (BHI) e Hipurato de Sodio. Se inoculan 2 ó 3 colonias del estreptococo problema y se incuba a 35°C durante 20 horas o más. Posteriormente, se centrifuga a 3,000 rpm y el sobrenadante se reparte en 2 tubos de 13x100, a razón de 0.8 mL en el marcado como #1 y 0.2 mL en el #2 ^(8, 14).

Los Estreptococos β -hemolíticos que son capaces de hidrolizar el hipurato de sodio, pueden pertenecer tanto al grupo B como D de Lancefield; estos pueden ser distinguidos mediante la prueba de hidrólisis de esculina en presencia de bilis. El 99% de las cepas del grupo D son capaces de hidrolizar la esculina, mientras que el 99% de las cepas del grupo B son incapaces de hacerlo ⁽⁸⁾.

La combinación de la prueba de CAMP y la hidrólisis del hipurato de sodio, resulta adecuada para la diferenciación a nivel bioquímico de *Streptococcus agalactiae* de los restantes serotipos de Estreptococos β -hemolíticos ^(8, 14, 36).

2.3. Clasificación Serológica

Carbohidrato del Grupo B

Es el antígeno común a todas las cepas y serotipos de *Streptococcus agalactiae*. Se encuentra próximo a la pared celular y está compuesto principalmente por ramnosa, galactosa, N-acetilglucosamina y glucitol. Estos carbohidratos forman cuatro diferentes unidades de oligosacáridos, unidos por enlaces fosfodiéster para crear una estructura tetra catenaria, altamente ramificada. La posición terminal, rica en ramnosa, sugiere que este carbohidrato puede constituir o formar parte del epítipo inmunodominante; esta hipótesis se probó mediante estudios de inhibición, en los cuales se enfrentaron oligosacáridos derivados con anticuerpos mono y policlonales contra el carbohidrato del grupo B ^(9, 58).

Lancefield y colaboradores ⁽³¹⁾ fueron los primeros en demostrar la incapacidad de los anticuerpos dirigidos contra el carbohidrato específico del grupo B, para proteger a ratones inoculados con cepas viables de *Streptococcus agalactiae*. En la clínica, la presencia de anticuerpos maternos en contra de dicho carbohidrato sólo se pudo relacionar con malos resultados neonatales, sin importar la concordancia entre los niveles de IgG específicos, del suero materno y del suero del cordón umbilical. Este resultado confirmó en humanos, lo que ya era conocido en modelos animales: que el carbohidrato del grupo B no es importante para la inmunidad natural ^(9,58).

A pesar de ello, los investigadores se preguntaban si una vacuna dirigida en contra del carbohidrato específico del grupo B, resultaría efectiva para generar anticuerpos funcionales, si la inmunogenicidad de este carbohidrato se veía incrementada mediante el uso de adyuvantes. Rainard demostró una mejora en la respuesta inmune en vacas, al conjugar el carbohidrato específico con ovoalbúmina. La clase de anticuerpos producidos mediante esta vacuna conjugada o compuesta, fueron de tipo IgG, y resultaron ser específicas para los principales azúcares que conforman el carbohidrato específico del grupo B, asimismo lograron inducir la opsonización en contra de cepas no capsuladas de origen bovino. Por otro lado, en estudios donde se utilizó una vacuna conjugada con la toxina tetánica, se demostró que estos anticuerpos específicos son menos activos en contra de cepas de *Streptococcus agalactiae* altamente capsuladas, provenientes de humanos. Más tarde, estudios de absorción, en los cuales se retó suero de conejo, previamente inmunizado con dicha vacuna, contra cepas altamente capsuladas de origen humano y contra cepas mutadas que carecían del Carbohidrato Capsular Específico de Tipo (CPS), demostraron que el CPS era capaz de interferir la unión de anticuerpos específicos. Esto confirmó la incapacidad de los anticuerpos de unirse al antígeno específico del grupo B en células altamente capsuladas. No era de sorprender, que los anticuerpos contra aislamientos bovinos, que poseían bajos niveles de CPS, pudieran ser efectivos para combatir enfermedades por *Streptococcus agalactiae* en vacas. La habilidad de los anticuerpos contra el grupo B de unirse a cepas con poca cápsula, merece

una mayor atención, dado que la expresión del CPS por parte de cepas de *Streptococcus agalactiae* (de origen humano) ha demostrado estar relacionada con la tasa de crecimiento celular, mientras que la expresión del antígeno específico de grupo no se encuentra relacionada con dicha tasa ⁽⁹⁾.

Carbohidrato capsular tipo específico (CPS)

La mayoría de las cepas del *Streptococcus agalactiae* aisladas de humanos son capsuladas, y pueden ser clasificadas con base a la estructura del CPS. Nueve distintos serotipos de *Streptococcus agalactiae* han sido identificados hasta hoy: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII y VIII; recientemente se ha propuesto la existencia del serotipo IX ⁽⁵⁶⁾. En el pasado, los serotipos Ia, Ib, II y III eran igualmente prevalentes en colonizaciones vaginales y en sepsis de temprano desarrollo (es decir, aquella que se desarrolla en neonatos de 7 días o menos de vida, en contraste con la sepsis de inicio tardío la cual ocurre entre los primeros 7 días y las 12 primeras semanas de vida). Sin embargo, las cepas con el serotipo V han emergido recientemente como una causa importante de infección ⁽³⁸⁾, y las cepas con serotipos VI y VIII se han vuelto prevalentes entre las mujeres japonesas ^(9, 39).

Tradicionalmente, el antígeno capsular o CPS ha sido utilizado para distinguir entre estos serotipos conocidos, a través de reacciones clásicas de antígeno-anticuerpo. Métodos de Biología Molecular como Campos Pulsados y el Análisis

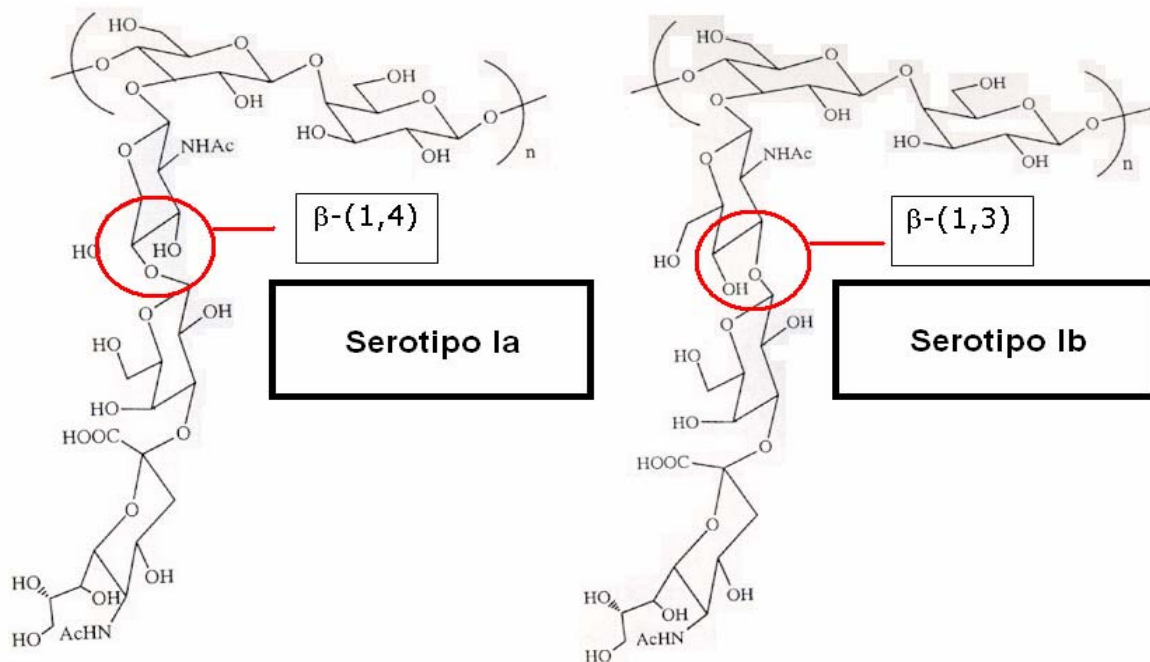
de Patrones de Restricción (RFLP), son sumamente útiles para estudios epidemiológicos, pero no así para la identificación de los serotipos capsulares. La aplicación de métodos de tipificación moleculares, resulta altamente atractivo debido a su alto poder discriminatorio y reproducibilidad. La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido utilizada en múltiples ensayos para detectar y genotipificar aislamientos de *Streptococcus agalactiae*, pero se requiere de un mayor desarrollo para volver práctico su uso en la tipificación capsular ^(24, 25, 26, 56).

Los modelos a continuación descritos, demuestran la heterogenicidad alrededor de las estructuras de los carbohidratos capsulares, esto sin importar que cada uno posee una unidad de repetición que contiene cuatro de cinco posibles azúcares (glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, ramnosa y ácido siálico) ⁽⁹⁾.

Serotipos Ia y Ib

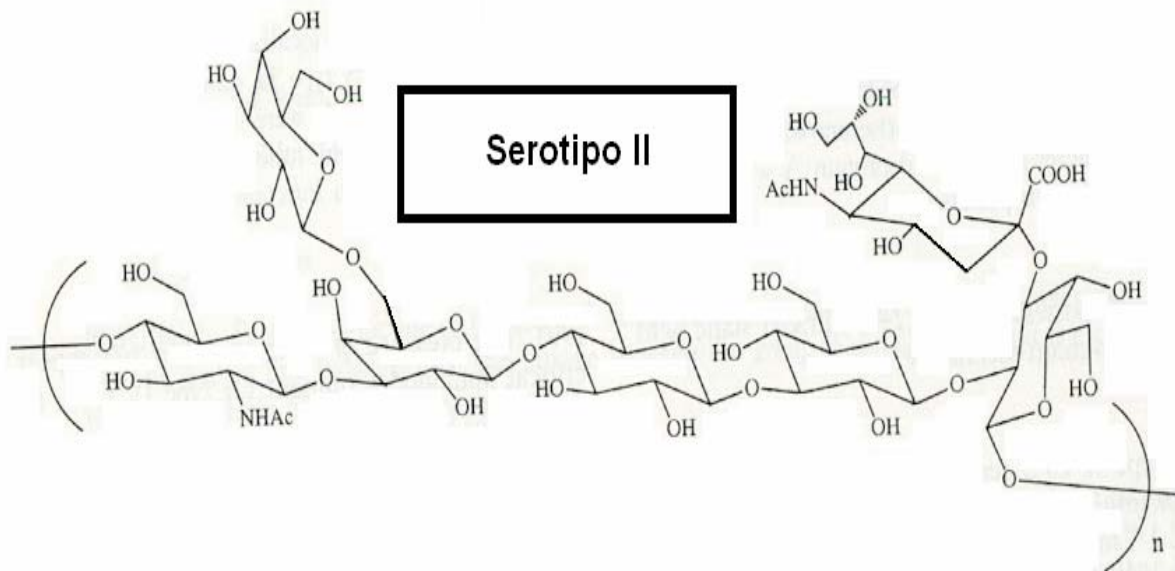
Lancefield ⁽²⁸⁾ fue la primera en descubrir las reacciones serológicas cruzadas entre las cepas que poseían los antígenos Ia y Ib, sin saber cual estructura celular era la que poseía dicha variación en epítopes. Estudios realizados 45 años después, mediante la técnica de resonancia magnética nuclear, demostraron que los CPS de los serotipos Ia y Ib eran estructuralmente similares, difiriendo únicamente en la conformación espacial del enlace entre la galactosa y N-acetilglucosamina de la cadena lateral; el CPS del serotipo Ia posee un enlace

β -(1,4), y el CPS del serotipo Ib presenta un enlace β -(1,3) en la posición antes descrita ⁽¹⁸⁾. Estos enlaces resultan críticos en la inmunoespecificidad del CPS. La unidad de repetición de los CPS de los serotipos Ia y Ib es un pentasacárido, cuya cadena principal es un disacárido que posee un trisacárido como cadena lateral. Al igual que todos los serotipos, sus CPS poseen un ácido siálico como cadena terminal unido mediante un enlace α -(2,3) ⁽⁹⁾.



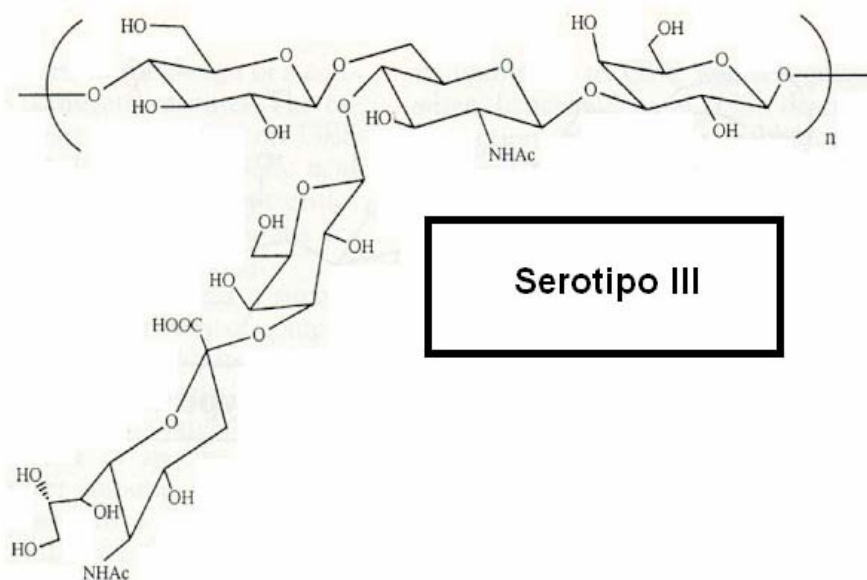
Serotipo II

La estructura de la unidad de repetición del CPS del serotipo II está compuesta por: galactosa, glucosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico en una proporción molar de 3:2:1:1. Esta unidad de repetición posee dos cadenas laterales (un residuo de ácido siálico y uno de galactosa), unidas a la cadena principal pentasacárida^(9, 19).



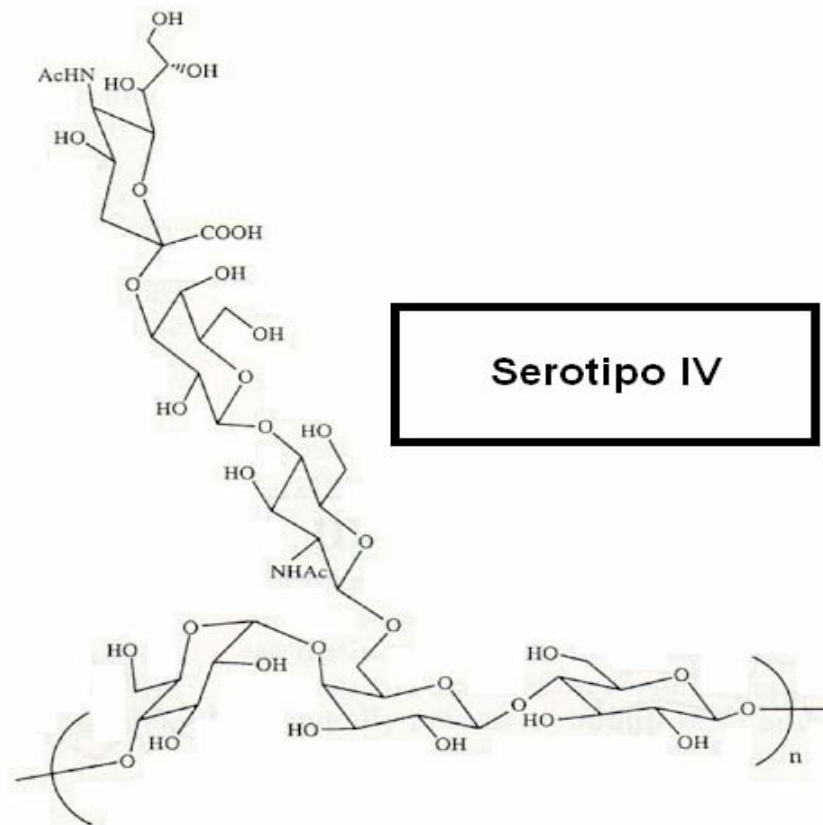
Serotipo III

El CPS del serotipo III posee un esqueleto trisacárido de glucosa, N-acetilglucosamina y galactosa; así como una cadena disacárido lateral de ácido siálico y galactosa unida mediante un enlace β -(1,4) a la N-acetilglucosamina de la cadena principal. A pesar de que el ácido siálico no es un sacárido inmunodominante por si mismo, el grupo carboxilo cargado negativamente en este sacárido influye en la conformación y por tanto a los epítopes inmunodeterminantes del polímero completo. La remoción del ácido siálico terminal de la unidad de repetición del CPS del serotipo III, mediante el uso de ácidos débiles o neuraminidasa, resulta en un CPS igual, tanto química como inmunológicamente, al CPS del serotipo 14 del *Streptococcus pneumoniae*. Este descubrimiento realza el entendimiento del papel que juega el ácido siálico dentro de la inmunidad generada por el *Streptococcus agalactiae* ^(9, 62).



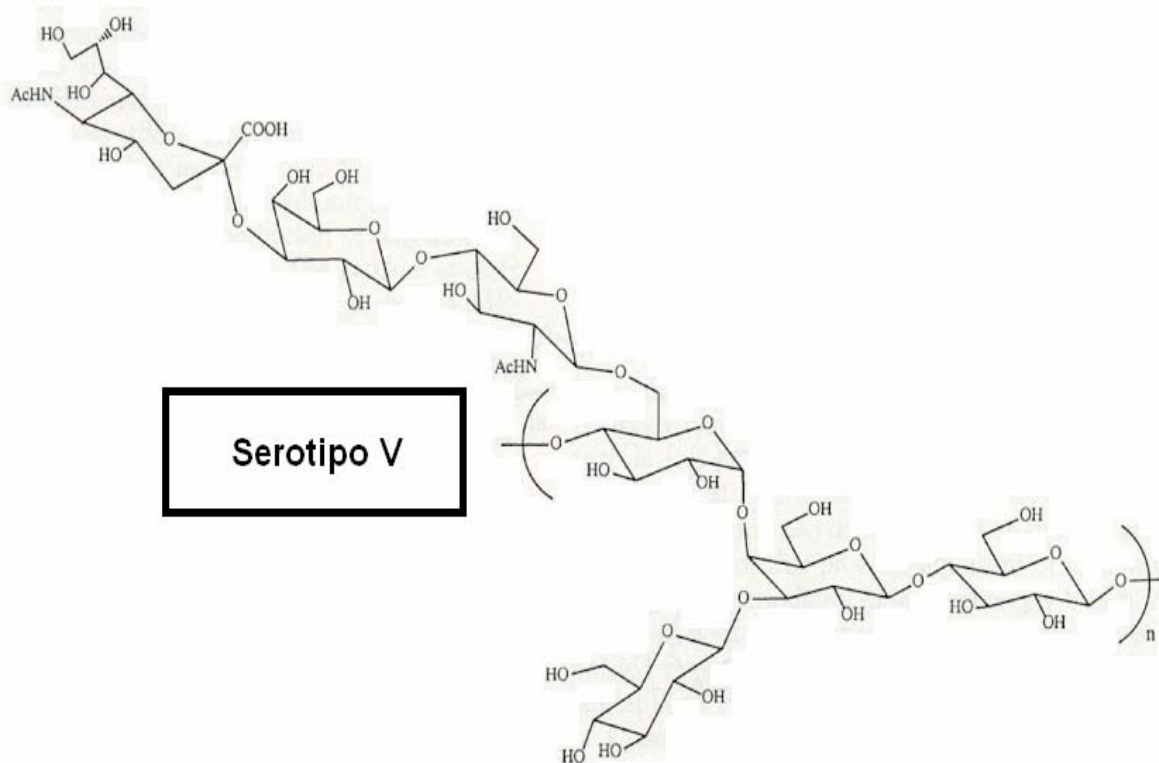
Serotipo IV

El CPS del serotipo IV posee: galactosa, glucosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico en una proporción molar de 2:2:1:1. La presencia de ácido siálico parece no ser un inmunodeterminante crítico para el CPS del serotipo IV ^(9, 60).



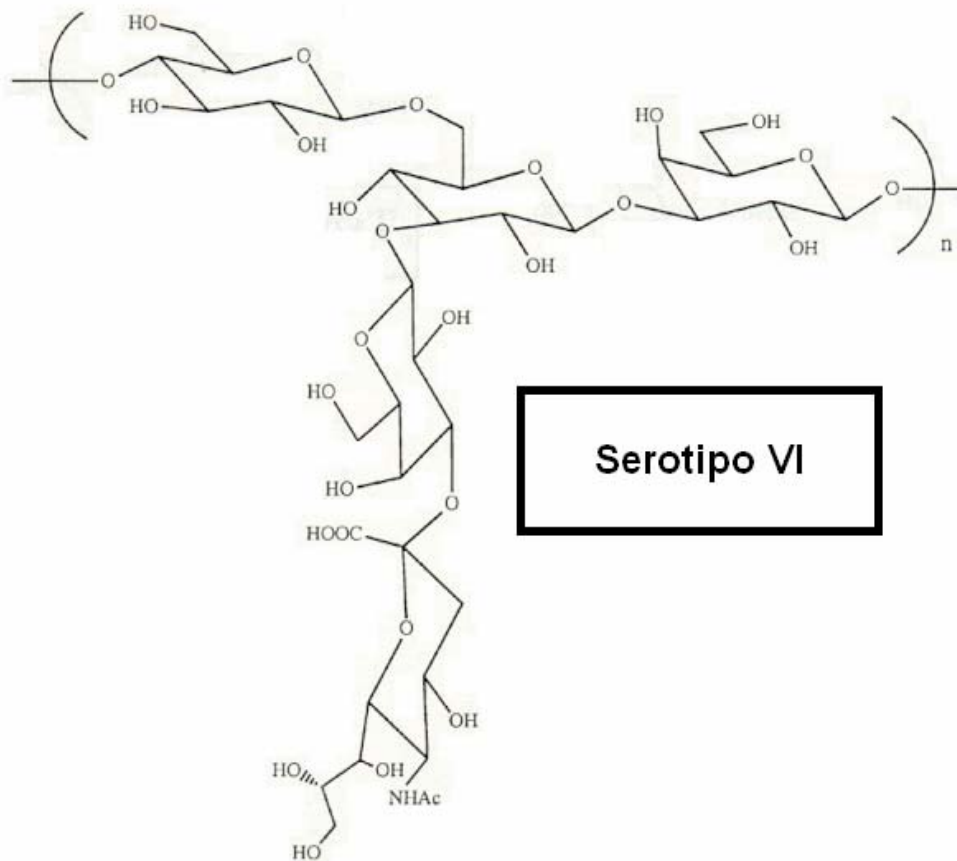
Serotipo V

La estructura de la unidad de repetición del CPS del serotipo V está conformada por siete azúcares. La cadena principal consiste de glucosa, galactosa y glucosa, y posee dos cadenas laterales. Una de las cadenas laterales está compuesta por glucosa, y está unida a la galactosa de la cadena principal mediante un enlace β -(1,3). La otra cadena lateral es un trisacárido de N-acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico terminal. Dicha cadena está unida a una glucosa de la cadena principal mediante un enlace β -(1,6) ^(9, 61).



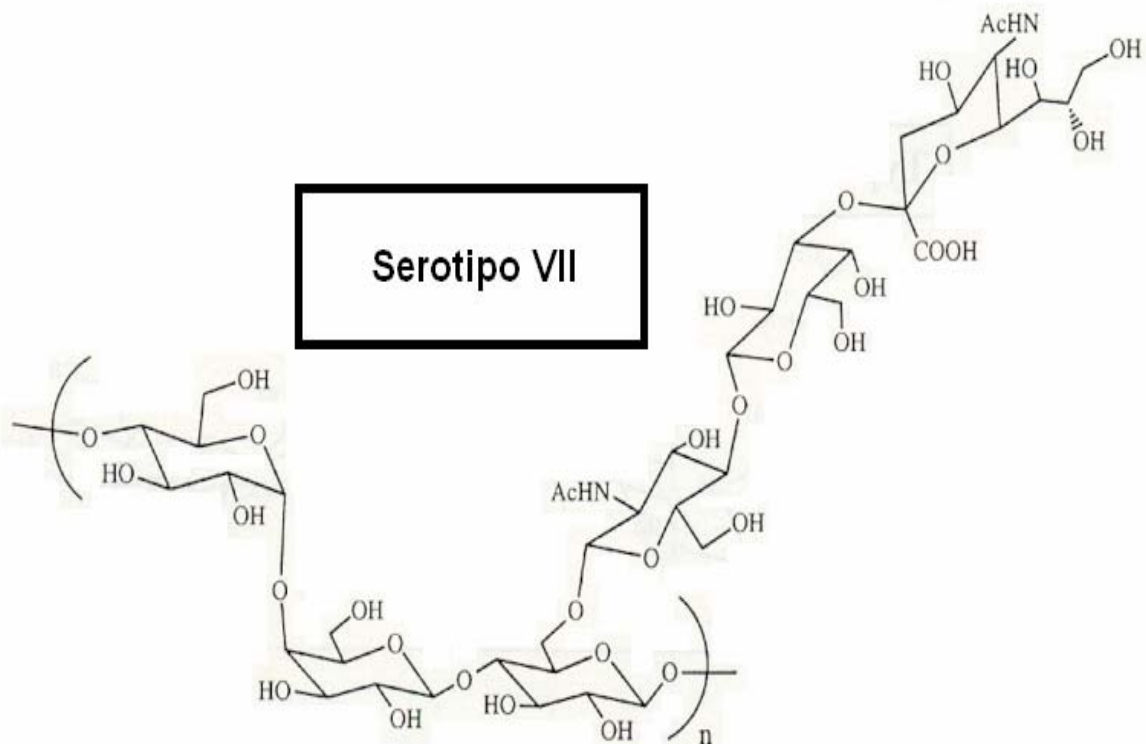
Serotipo VI

La unidad de repetición del CPS del serotipo VI está conformada por galactosa, glucosa y ácido siálico en una proporción molar de 2:2:1. Este CPS fue el primero en el cual se descubrió la ausencia de la N-acetilglucosamina ^(9, 23).



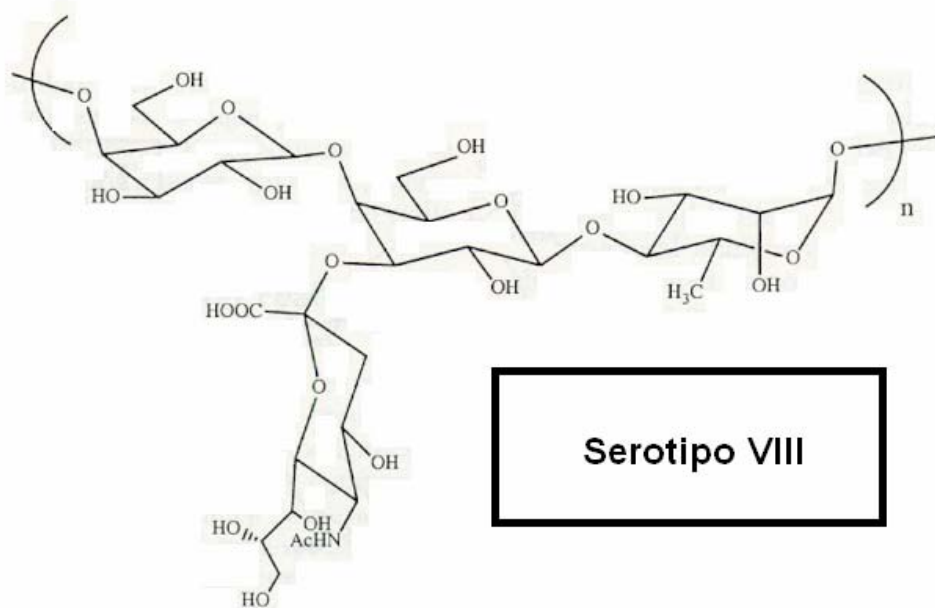
Serotipo VII

La unidad de repetición del CPS del serotipo VII contiene un esqueleto y cadena lateral trisacáridos, con una proporción molar de 2:2:1:1 de galactosa, glucosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico ^(9, 21).



Serotipo VIII

Recientemente descrita, la estructura del CPS del serotipo VIII, es la menos frecuente y la más simple entre todos los serotipos de *Streptococcus agalactiae*. Al igual que el CPS del serotipo VI, el CPS del serotipo VIII no posee N-acetilglucosamina. A diferencia de los CPS de los serotipos restantes, este tetrasacárido contiene ramnosa, un azúcar previamente asociada exclusivamente con el carbohidrato específico del grupo B. La unidad de repetición del serotipo VIII esta compuesta por glucosa, galactosa, ramnosa y ácido siálico en una proporción molar de 1:1:1:1, y presenta una cadena lateral monosacárida de ácido siálico ^(9, 22).



Importancia del ácido siálico como un componente estructural y factor de virulencia

Mediante métodos de extracción con HCl caliente o ácido tricloroacético (TCA), Lancefield y Freimer en 1966 ⁽³⁰⁾, obtuvieron antígenos inmunoquímicamente incompletos. Con dichos hallazgos supusieron que el componente faltante contribuía con la especificidad serológica, así como con la carga negativa del antígeno CPS. Más tarde en 1972, Liu le comunicó a Lancefield que todos los CPS contenían ácido siálico, resultando ser éste el componente antigénico faltante ⁽²⁹⁾. La naturaleza ácida de la extracción mediante TCA resulta en la purificación de un antígeno incompleto, debido a que el enlace α -(2,3) entre el ácido siálico y la galactosa es débil.

Las propiedades bioquímicas e inmunitarias del CPS han sido mayormente analizadas a través del estudio de cepas del serotipo III, ya que este es el serotipo más comúnmente aislado en casos invasivos en neonatos ^(1, 12, 52). El análisis estructural del CPS del serotipo III demostró que al remover el ácido siálico terminal de la unidad de repetición, la estructura base era idéntica al CPS del serotipo 14 de *Streptococcus pneumoniae*. Esta observación ayudó a definir la importancia del ácido siálico en la formación de un epítipo dependiente de su conformación, en el serotipo III. Específicamente, los grupos carboxilo de los residuos de ácido siálico forman puentes de hidrógeno intramoleculares, con los residuos de galactosa del esqueleto o cadena principal del CPS del serotipo III.

La reducción de dichos grupos, a grupos hidroximetilo, destruye la antigenicidad del CPS frente a antisueros contra el CPS nativo; mientras que la oxidación de los grupos carboxilo con sodio meta-peryodatado, remueve los carbonos 8 y 9, no afectando su antigenicidad. Este último hallazgo se volvió importante en el desarrollo de una estrategia acoplada para producir vacunas anti *Streptococcus agalactiae* conjugadas. Sin embargo, el requerimiento del ácido siálico para impartir antigenicidad en los CPS de *Streptococcus agalactiae* no es universal. Mientras que en el CPS del serotipo Ia es requerido para completar su antigenicidad, la unión a anticuerpos específicos contra el serotipo Ib no depende del ácido siálico ⁽⁹⁾.

La presencia del ácido siálico en *Streptococcus agalactiae* crea una superficie que no es capaz de activar la vía alterna del complemento. En contraste, los Estreptococos del grupo B que crecen en presencia de neuraminidasa, condición que resulta en un menor número de residuos de ácido siálico, permite la activación del complemento tanto en presencia como ausencia de anticuerpos específicos. Marques y colaboradores ⁽³⁷⁾, reportaron una menor cantidad de C3 unida a *Streptococcus agalactiae* que contiene residuos de ácido siálico, con respecto al que no. En general, estos descubrimientos sugieren un papel crítico del ácido siálico en la evasión de los mecanismos naturales de defensa del hospedero, así como en la modulación de la virulencia del CPS ⁽⁵⁴⁾.

El papel del ácido siálico como un factor de virulencia fue confirmado mediante

estudios realizados con mutantes del serotipo III (COH 31-21), los cuales carecen de la habilidad para sintetizar CPS ácido siálico. Dichas cepas produjeron un CPS que sólo fue capaz de unirse al antisuero contra el CPS neumocócico del serotipo 14, pero no así con el antisuero nativo anti-CPS del serotipo III. Asimismo la virulencia de las cepas mutantes fue dos veces menor al de la cepa silvestre, pero igual a la de otro mutante, COH 31-15, que carece completamente de CPS ⁽⁹⁾.

Genética de los antígenos CPS

Las mutantes antes descritas fueron las primeras utilizadas para mapear los genes importantes en la expresión del CPS en *Streptococcus agalactiae*. Siete genes han sido identificados en el serotipo III de *Streptococcus agalactiae* (*cpsA* hasta *cpsG*), localizados en tres regiones específicas: Región I, donde se regula la síntesis de monosacáridos, Región II la cual está involucrada en la síntesis de subunidades de oligosacáridos y Región III que incluye la información necesaria para el transporte y polimerización de subunidades de oligosacáridos. El gen *cpsF*, localizado en la región I, codifica para CMP-ácido siálico sintetasa, una enzima que interviene en la activación del ácido siálico durante la formación del CPS del serotipo III. El gen *cpsD*, localizado en la región II, codifica para una galactosiltransferasa; se propone que el *cpsA*, *cpsB* y *cpsC* están asociados a la polimerización de oligosacáridos. Recientemente, se han identificado río arriba de *cpsA*, a *cpsX* y *cpsY*, los cuales poseen secuencias homólogas con genes involucrados en la regulación de CPS en otras bacterias Gram-positivas. Estos 9

marcos de lectura abierta han servido para subrayar la complejidad del proceso de biosíntesis del CPS ^(5, 9, 65).

Proteínas C- α y C- β

Wilkinson y Eagon describieron un extracto de proteína obtenido de una cepa del serotipo Ic ⁽⁶⁴⁾. Lancefield descubrió que el serotipo anteriormente designado como Ic, en realidad involucraba al carbohidrato Ia y a la proteína Ibc. A pesar de ello, Wilkinson y Eagon encontraron que dicho extracto presentaba dos componentes, uno resistente a la digestión con tripsina, y otro sensible ⁽⁶⁴⁾, Bevanger y Maeland los denominaron α y β , respectivamente ⁽²⁾. El término proteínas C fue añadido para clarificar la distinción entre los antígenos de naturaleza proteica y los de naturaleza polisacárida; y la presencia de la o las proteínas C se denotó mediante el uso de una letra después del serotipo capsular (ejemplo, Ia/c). Más tarde, el trabajo de un número de investigadores, permitió la identificación de los componentes α y β como proteínas distintas, codificadas por genes diferentes ^(9, 35, 42).

Generalmente se encuentran presentes en cepas de serotipos capsulares Ia y Ib, frecuentemente se encuentran en aislamientos del serotipo II, y de forma ocasional se encuentran en los serotipos restantes. Algunos trabajos han demostrado la expresión de la proteína C- β en aproximadamente del 10 al 25% de las cepas, predominando para el serotipo Ib.

Russell y colaboradores ⁽⁴⁹⁾, descubrieron que la proteína C- β se une específicamente a las IgA humanas, vía su porción Fc, siendo dicha unión de alta afinidad. No se ha encontrado unión de este tipo para la proteína C- α ^(9, 41, 43).

Proteína Rib

Mientras que la proteína C está presente principalmente en cepas de los serotipos Ia, Ib y II, una proteína fenotípicamente similar pero inmunológicamente distinta, denominada como Rib, fue descubierta en cepas del serotipo III ⁽⁵⁷⁾. Es parte de la familia de proteínas de repeticiones en tandem que se caracterizan por: capacidad protectora en modelos murinos, resistencia a la digestión por tripsina, patrón específico de corte en SDS-PAGE (bandas con un espaciado regular de 8 KDa, presentando la banda mayor un peso molecular entre 70 y 160 KDa) ^(9, 42).

Proteína del serotipo V tipo- α

Durante los años 80's, el anteriormente desconocido serotipo V emergió en cepas altamente patógenas de *Streptococcus agalactiae*. Una nueva proteína fenotípicamente similar a las proteínas C- α y Rib, fue identificada en la mayoría de las cepas del serotipo V. Al igual que las proteínas C y Rib, pertenece a la familia de proteínas de repeticiones en tandem ^(9, 33).

Proteínas R

También identificadas por su resistencia a la digestión con tripsina, fueron inicialmente descubiertas en *Streptococcus pyogenes* por Lancefield y Perlmann⁽³²⁾. Wilkinson⁽⁶³⁾ identificó cuatro proteínas R, inmunológicamente distintas (R1, R2, R3 y R4), presentes en diversas combinaciones en estreptococos de los grupos A, B y C. Flores y Ferrieri⁽¹⁰⁾ encontraron dos subtipos de la proteína R, R1 y R4, en el 37% de las cepas clínicas de *Streptococcus agalactiae*. Dichas proteínas se encontraron principalmente en cepas de los serotipos II y III. La presencia de anticuerpos anti-proteína R en suero humano, se correlaciona con la ausencia de casos invasivos por cepas de *Streptococcus agalactiae* que expresan proteínas R, en neonatos. Es parte de la familia de proteínas de repeticiones en tandem⁽⁹⁾.

Factor de CAMP

Es una proteína extracelular de 23.5 KDa, la cual desestabiliza y lisa las membranas de los eritrocitos de carnero previamente tratados con β -hemolisina, una esfingomielinasa estafilocócica. Tanto en eritrocitos de humano como en los de carnero, no se ha observado hemólisis con la sola exposición al factor de CAMP.

El gen que codifica para el factor de CAMP (*cfb*) ha sido clonado y expresado en *Escherichia coli*, y la proteína recombinante, bloquea anticuerpos que inhiben al

factor de CAMP ^(36, 45, 55).

2.4. Patogénesis e inmunidad

Los anticuerpos que se desarrollan frente a los antígenos capsulares específicos de tipo de los Estreptococos del grupo B son protectores, un hecho que explica en parte la predilección de este microorganismo por los neonatos. La colonización genital con *Streptococcus agalactiae* se ha asociado con un mayor riesgo de parto prematuro. Los niños prematuros presentan un mayor riesgo para la enfermedad porque tienen valores más bajos de anticuerpos maternos específicos de tipo.

Además, se necesitan las vías clásica y alterna del complemento para eliminar los Estreptococos del grupo B, fundamentalmente a los serotipos Ia, III y V. Por eso, hay una mayor probabilidad de diseminación sistémica del microorganismo en niños prematuros colonizados, con valores de complemento fisiológicamente bajos o en niños cuyos receptores para el complemento o para la fracción Fc de los anticuerpos IgG no se encuentran expuestos en los neutrófilos. Como se dijo anteriormente, los polisacáridos capsulares específicos de tipo de los serotipos Ia, Ib y II poseen un residuo terminal de ácido siálico ⁽⁵⁴⁾, el cual puede inhibir la activación de la vía alterna del complemento, interfiriendo así en la fagocitosis de estas cepas de *Streptococcus agalactiae*.

Streptococcus agalactiae produce varias enzimas, como las DNasas, hialuronidasa, neuraminidasa, proteasa, hipuricasa y hemolisinas. Aunque estas

enzimas son útiles en la identificación del microorganismo, no se conoce su papel en la patogénesis de la infección ^(9, 40).

2.5. Epidemiología y transmisión

Colonización asintomática

El estreptococo del grupo B es una de las bacterias de la microbiota normal del tracto gastrointestinal, urogenital y respiratorio humano. Ha sido aislada en cultivos provenientes del tracto gastrointestinal y vaginal de mujeres embarazadas y no-embarazadas, en un porcentaje que oscila entre el 5 y 40% ^(36, 40). Estas variaciones en la prevalencia reportada de colonizaciones asintomáticas, está relacionada no sólo con los sitios muestreados y el método bacteriológico usado para la detección del microorganismo, sino también con las diferencias demográficas de las poblaciones estudiadas (Tablas 1 y 2) ⁽³⁶⁾.

Colonización materna

Muchas mujeres embarazadas están colonizadas con *Streptococcus agalactiae*, pero de forma asintomática. Sin embargo, la colonización en mujeres embarazadas es importante debido al riesgo de transmisión a los neonatos. Las mujeres pueden ser colonizadas en múltiples sitios, incluyendo el recto, la vagina, el cervix y la faringe. La colonización rectal es más frecuente que la vaginal, por su parte la colonización cervical es relativamente menos común, y la colonización

faríngea es aún más rara ⁽⁴⁸⁾.

La capacidad para detectar la colonización por *Streptococcus agalactiae* en un laboratorio microbiológico, depende tanto de, los sitios muestreados como de los medios de cultivo utilizados. El uso de medios de cultivo selectivos permite una mayor recuperación de *Streptococcus agalactiae*; un estudio demostró un incremento del 50% en la recuperación de *Streptococcus agalactiae*, usando medios de cultivo selectivos en comparación con el uso del medio de cultivo estándar de agar sangre ⁽⁶⁾.

La colonización puede ser crónica, intermitente o transitoria. En un estudio más exhaustivo en mujeres embarazadas que fueron monitoreadas durante finales del primer trimestre hasta el tercero, se encontró que el 67% de las mujeres eran portadoras y el 8.5% que no lo eran, resultaron cultivo-positivas al momento del parto, el 24.5% restante resultaron cultivo negativas ⁽³⁶⁾.

En un análisis múltiple se encontró que las mujeres caribeñas y de tez negra tienen una mayor predisposición a ser portadoras, de lo que son las mujeres de tez blanca y las mexicanas. Este mismo estudio reveló que la colonización por *Streptococcus agalactiae* está asociada con la edad, número de partos, así como con el nivel de educación, ver Tablas 1 y 2 ⁽³⁶⁾.

Factores que influyen en la detección de colonización por <i>S. agalactiae</i>		
	Efecto sobre el porcentaje de aislamientos	
Factor	<i>Incremento</i>	<i>Disminución</i>
Método empleado		
Medio de Cultivo	Caldo	Agar
	Medio adicionado con antibióticos (selectivo)	Medio no-selectivo
Sitio (s)	Región vaginal inferior y recto	Cervix
	Varios Sitios	Un solo sitio
Intervalo	≥ 2 cultivos en un intervalo de 6 a 8 semanas	Tiempo de muestreo simple
Día del ciclo menstrual	Primera mitad	
Edad	≤ 20 años	
Actividad Sexual	Activa	Virgen
Método anticonceptivo	DIU u otro método intrauterino	
Número de embarazo	Primogénito	> 3 embarazos
Origen étnico	Africano Americano	
Grupo Socioeconómico	Bajos ingresos	

Tabla 1. Factores que influyen en la Detección de Colonización por *Streptococcus agalactiae* ⁽³⁶⁾.

Factores que no influyen en la detección de colonización por

Streptococcus agalactiae

- Embarazo
- Frecuencia de encuentros sexuales o número de parejas
- Descarga vaginal
- Estado Civil

Tabla 2. Factores que no influyen en la detección de colonización por *Streptococcus agalactiae* ⁽³⁶⁾.

Colonización infantil

Los infantes nacidos de mujeres colonizadas con *Streptococcus agalactiae*, son más susceptibles de ser colonizados por esta bacteria⁽⁴⁰⁾.

En la mujer, a partir de la microbiota intestinal, puede colonizar el tracto genital y de allí la posibilidad de transmisión al neonato. El recién nacido puede adquirir el microorganismo en forma vertical a partir de la colonización vaginal por:

- 1) Infección intrauterina ascendente poco antes del parto (a través de membranas rotas o intactas).
- 2) Invasión microbiana de la cavidad amniótica durante el trabajo de parto.
- 3) Durante el paso a través del canal del parto.

La transmisión horizontal (tanto hospitalaria como extranosocomial) ha sido descrita alternativamente, para explicar posibles brotes intrahospitalarios y

ciertas infecciones de inicio tardío ^(11, 59).

Enfermedades clínicas

Infecciones en varones y mujeres no embarazadas

Los síndromes más comunes causados por *Streptococcus agalactiae* en adultos son: infecciones de piel, tejido blando y hueso. Estas infecciones son por lo general complicaciones de enfermedades como la diabetes crónica o úlceras decúbitas. Celulitis, úlceras en los pies y abscesos son las manifestaciones más comunes, pero otras infecciones como fascitis necrotizante, son ocasionalmente reportadas ^(40, 52, 53).

Otra presentación común de infección por *Streptococcus agalactiae* es la bacteremia, siendo el mayor factor de riesgo el uso de catéteres contaminados. Asimismo puede causar neumonía, la cual es una forma severa de enfermedad causada por *Streptococcus agalactiae*, y posee un alto índice de mortalidad.

Hace algunos años, la endocarditis era uno de los síndromes más comunes causados por *Streptococcus agalactiae*, pero hoy en día la incidencia es mucho menor. En los años 30 y 40's, la endocarditis era predominantemente una enfermedad aguda en mujeres embarazadas, y afectaba básicamente a la válvula mitral. Más tarde en los años 50's, alrededor de la mitad de los pacientes eran hombres, y la válvula mitral continuaba siendo el sitio de infección más común.

Infecciones menos comunes como la artritis, infecciones urinarias, meningitis y

peritonitis llegan a presentarse ⁽⁹⁾.

Infecciones en mujeres embarazadas

Streptococcus agalactiae también es una causa importante de infecciones durante el embarazo y en el puerperio, causando infección urinaria, corioamnionitis, endometritis posparto, infección de herida quirúrgica post-cesárea y sepsis materna ^(9, 51).

Infecciones en neonatos

La infección neonatal suele manifestarse como neumonía, sepsis o meningitis. Varios factores se asocian a un mayor riesgo de infección neonatal: rotura prolongada de membranas (> 18 h); fiebre intraparto (> 38° C), premadurez (< 36 semanas), embarazo gemelar, hijo anterior con infección por *Streptococcus agalactiae*, bacteriuria por *Streptococcus agalactiae* en el embarazo, etc. ⁽⁵⁹⁾.

Existen dos síndromes distintos: El de inicio temprano (EOD, por sus siglas en inglés, Early-Onset disease), el cual aparece durante la primer semana de vida, usualmente en las primeras 24 horas de vida con una mortalidad cercana al 10%; y el de inicio tardío (LOD por sus siglas en inglés, Late-Onset Disease), el cual ocurre entre los primeros 7 días y las 12 semanas de vida, pero se puede llegar a presentar en niños mayores de tres meses de vida. Los niños con LOD son menos susceptibles de presentar una enfermedad severa, y su incidencia está relacionada en menor grado con complicaciones obstétricas ^(9, 11, 40).

Los infantes con EOD, generalmente presentan sepsis o neumonía; meningitis e infecciones de hueso o de tejido blando también pueden ocurrir. Este síndrome es originado por una infección ascendente del tracto genital o por colonización durante el parto. La infección amniótica puede ocurrir incluso cuando las membranas están intactas. La estimación de casos fatídicos por EOD es del 4.5%.

Los casos de meningitis son más comunes con el LOD, que con el EOD. A pesar de ello, en el LOD también se puede presentar como infecciones de huesos o tejido blando, infecciones del tracto urinario, o neumonía.

Entre los pacientes con EOD, los serotipos III y Ia son los más comúnmente identificados, pero se llegan a generar casos por los serotipos V y II. La mayoría de los pacientes con LOD presentan el serotipo II, sin embargo el serotipo Ia también es común ⁽⁹⁾.

2.6. Tratamiento y prevención

Los Estreptococos del grupo B son generalmente sensibles a la penicilina, que es el fármaco de elección. Sin embargo, la concentración mínima inhibitoria (CIM, por sus siglas en inglés) que se necesita para inhibir al microorganismo es aproximadamente 10 veces superior a la que se necesita para inhibir a *Streptococcus pyogenes*, además, se ha descrito tolerancia a la penicilina. Por estos motivos, se utiliza con frecuencia en el control de las infecciones graves la

combinación de penicilina con un aminoglucósido. La vancomicina es un tratamiento alternativo en los pacientes alérgicos a la penicilina, y por otro lado se ha observado resistencia del microorganismo a la eritromicina y a la tetraciclina (20, 40, 59).

En un intento por prevenir la enfermedad neonatal, se ha recomendado que todas las mujeres embarazadas sean examinadas entre las semanas 35 y 37 de gestación para valorar la colonización por *Streptococcus agalactiae*. Se debe utilizar quimioprofilaxis en todas las mujeres que estén colonizadas o que sean de alto riesgo. Se considera que una mujer embarazada tiene un alto riesgo de dar a luz a un niño con una enfermedad invasiva del grupo B si ha tenido previamente a otro niño con la enfermedad o si hay factores de riesgo para la enfermedad en el momento del nacimiento (Tabla 1). Se recomienda administrar penicilina G intravenosa al menos 4 horas antes del parto; en las mujeres alérgicas a la penicilina se utiliza clindamicina o cefalosporina. Este esquema asegura unos valores de antibióticos elevados y protectores en el torrente circulatorio del niño en el momento del nacimiento (34, 44).

Debido a que la enfermedad del recién nacido se asocia con una disminución de los anticuerpos circulantes en la madre, se ha intentado hacer una vacuna polivalente contra los serotipos Ia, Ib, II, III y V. Los polisacáridos de la cápsula son poco inmunogénicos; sin embargo, al combinarlos con el toxoide tetánico se mejora la inmunogenicidad de la vacuna (9, 40).

OBJETIVOS

Objetivo General

- ❖ Tipificar molecularmente cepas de *Streptococcus agalactiae* provenientes de muestras clínicas obtenidas en hospitales de la Ciudad de México.

Objetivos Específicos

- ❖ Estandarizar la técnica de la PCR para la tipificación molecular de *Streptococcus agalactiae*.
- ❖ Detectar por la técnica de la PCR el gene *cfb* en todas las cepas de *Streptococcus agalactiae*.
- ❖ Identificar el tipo capsular de las cepas, evaluando la amplificación específica para alguno de los pares de primers asociados a los nueve tipos capsulares de la bacteria.
- ❖ Demostrar la especificidad de los productos de la PCR por secuenciación y comparación con secuencias reportadas en el GenBank.
- ❖ Determinar, mediante comparación, las posibles similitudes o diferencias presentes entre las secuencias reportadas en el GenBank y las problema.
- ❖ Establecer si existe relación entre la frecuencia de los serotipos con el origen clínico de las cepas.

II. PARTE EXPERIMENTAL

1. Material Biológico

Se analizaron 207 cepas de *Streptococcus agalactiae* aisladas de cultivos vaginales, faríngeos, urocultivos y otros, de pacientes que acudieron a los diferentes hospitales de la Ciudad de México en el periodo comprendido entre los años 2002 y 2007. La distribución por hospital de las cepas caracterizadas se muestra en la Tabla 3.

Hospital	Número de Aislamientos
Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE	150
Hospital General Dr. Gonzálo Castañeda, ISSSTE	47
Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE)	6
Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS	1
Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS	1
Hospital Juárez de México, SS	1
Otros Orígenes	1

Tabla 3. Distribución por hospital de las cepas analizadas de *Streptococcus agalactiae*.

2. Identificación de *Streptococcus agalactiae*

Los criterios para la identificación de *Streptococcus agalactiae* que se emplearon en el laboratorio fueron: la determinación de la β -hemólisis en agar sangre; la susceptibilidad a 0.04 U de bacitracina; la prueba del factor de CAMP, la hidrólisis del hipurato de sodio y la presencia del carbohidrato C antigénico "B" de

Lancefield. Por ello en forma rutinaria, todas las cepas que se recibieron en el laboratorio se confirmó su pureza mediante el análisis de la morfología colonial, se resembraron en placas de agar sangre de carnero al 5%, se les colocó un disco de 0.04U de bacitracina TIPIBACT A[®] (BIO-RAD[®]) y se incubaron por 24 horas a 37°C en atmósfera enriquecida de CO₂ (crecimiento capnofílico). Una vez transcurrido dicho tiempo, se buscó colonias aisladas rodeadas por halo de hemólisis completa (Figura 1), recordando que no todas las cepas de *Streptococcus agalactiae* generan β-hemólisis, y crecimiento alrededor del disco de bacitracina (Figura 2). Seguidamente, se procedió a realizar la prueba de CAMP, sembrando en agar sangre de carnero al 5% una estría recta de la cepa de *Staphylococcus aureus* y, previa esterilización del asa, se tomó una asada de la cepa que se presume del grupo B, para trazar estrías rectas perpendiculares a la de *Staphylococcus aureus*, finalmente se incubó durante 24 horas, a 37°C. Se tomó como prueba positiva a aquellas cepas que formaron una zona de mayor lisis que aparece comúnmente en forma de punta de flecha (Figura 3). La última prueba no-serológica fue la hidrólisis del hipurato de sodio, la cual se evaluó en el laboratorio sólo mediante la producción de benzoato. Para ello se inocularon 2 ó 3 colonias del Estreptococo problema en un tubo con caldo BHI (Bioxon[®]) adicionado al 1% de hipurato de sodio (compuesto por 25 g de caldo BHI (Bioxon[®]), 10 g de hipurato de sodio y 1000 mL de agua destilada), incubándolo a 37°C por 24 horas. Posteriormente, se centrifugó a 3,000 rpm y del sobrenadante con una micropipeta se tomaron 0.8 mL y se colocaron en un tubo nuevo, al cual se le agregó 0.2 mL de una solución de Cloruro Férrico al 12% (el cual se preparó al añadir a 100 mL de HCl al 2% en agua, 12 g de FeCl₃-6H₂O). Se tomó como

resultado positivo a la formación de un precipitado color café con leche, que permaneció hasta por 10 minutos (Figura 4).

La determinación del grupo de Lancefield se realizó mediante una prueba de coagulación en látex con el kit comercial Pastorex[®] Strep (BIO-RAD[®]), siguiendo las indicaciones del proveedor, que se describen a continuación:

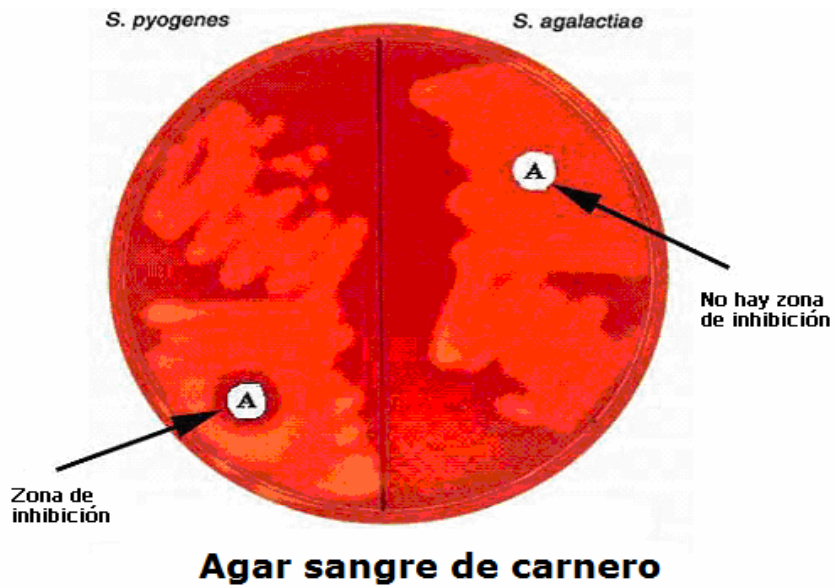
1. Colocar 300 μ L de solución de enzima de extracción en un tubo de hemólisis para cada cepa a estudiar.
2. Tomar de 5 a 10 colonias aisladas de cultivo fresco y disociadas en la solución de enzima, procurando obtener una turbidez evidente.
3. Incubar de 15 a 45 minutos a temperatura ambiente.
4. Homogenizar por agitación con vórtex cada uno de los antiseros (suspensiones de partículas de látex recubiertas de los anticuerpos específicos de cada grupo: A, B, C, D, F y G).
5. Depositar una gota de cada antisuero en cada uno de los círculos de la tarjeta de aglutinación.
6. Con ayuda de una micropipeta colocar una gota del lisado en cada uno de los círculos de la tarjeta, procurando no tocar la gota de antisuero que fue añadida en el paso anterior.
7. Utilizando un palillo para cada círculo, mezclar el lisado con su respectivo antisuero hasta obtener una mezcla homogénea.
8. Agitar la tarjeta con un movimiento orbital durante un minuto como máximo.

Una reacción positiva se manifiesta por la aparición de aglutinados rojos sobre un fondo verde (Figura 5).

Por tanto, para considerar a la cepa analizada como *Streptococcus agalactiae*, es necesario observar la β -hemólisis en las placas de agar sangre, presentar resistencia a 0.04 U de Bacitracina, pruebas de CAMP e hipurato de sodio positivas y haber presentado aglutinación evidente y única para el carbohidrato que caracteriza al estreptococo del grupo B con el kit empleado.



Figura 1. Hemólisis completa o tipo β en agar gelosa sangre de carnero.



ASM MicrobeLibrary.org © Chamberlain

Figura 2. Prueba de Susceptibilidad a 0.04U de bacitracina TIPIBACT A[®] (BIO-RAD[®]). El crecimiento alrededor del disco no se ve inhibido por dicha concentración de antibiótico.

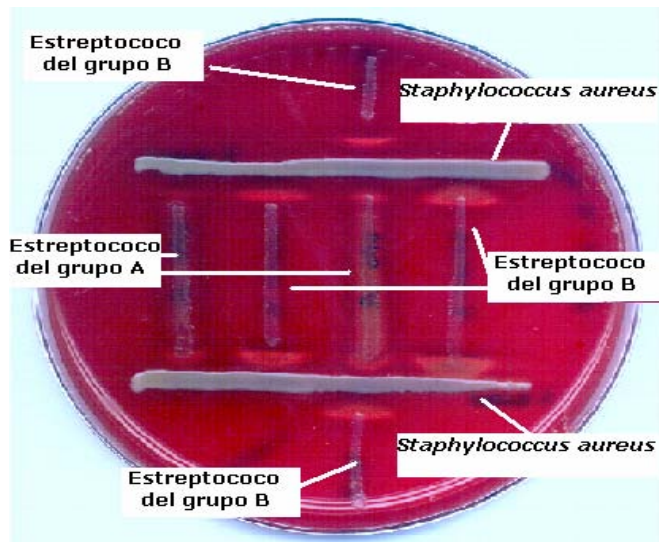


Figura 3. Prueba del factor de CAMP. Se puede observar como para el estreptococo del grupo B aparece una zona de mayor lisis en forma de punta de flecha y que apunta hacia la estría de *Staphylococcus aureus*.

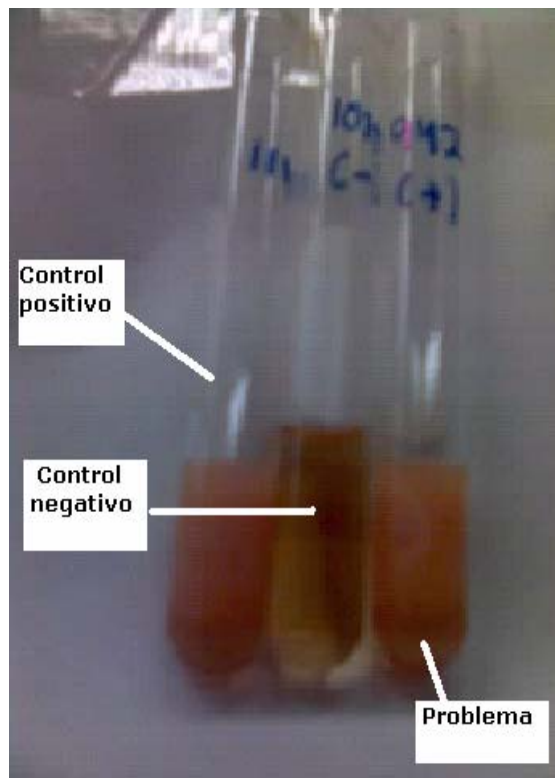


Figura 4. Prueba de hidrólisis del hipurato de sodio. Se puede observar como al añadir el cloruro férrico, tanto en el tubo perteneciente al control positivo como al problema se formó un precipitado color café con leche que permaneció por más de 10 minutos.



Figura 5. Prueba de determinación del grupo de Lancefield por coagulación en látex con el kit comercial Pastorex® Strip (BIO-RAD®). Obsérvese la aparición de aglutinados rojos sobre un fondo verde.

3. Tipificación de *Streptococcus agalactiae*

Una vez comprobada la identidad de las cepas se procedió a la tipificación de las mismas. Todas las técnicas utilizadas a excepción de la PCR, se emplean en el laboratorio, por lo que se pretende la implementación de esta última de forma rutinaria para las cepas subsecuentes.

3.1. Extracción de ADN

La extracción del ADN se realiza empleando el kit comercial DNeasy[®] Tissue (QIAGEN[®]) siguiendo las instrucciones del proveedor, según la siguiente metodología:

1. Preparar el buffer de lisis enzimática agregando lisozima (Research Organics[®]) a una concentración final de 20 mg/mL.
2. En un tubo eppendorf agregar 180 µL de buffer de lisis enzimática recién preparado y obtener una suspensión bacteriana de un cultivo de 24 horas con una concentración aproximada de 2×10^9 UFC/mL.
3. Incubar a 37°C durante al menos 30 minutos.
4. Adicionar al tubo 25 µL de proteinasa K (>20U/mg) y 200µL de buffer AL
5. Incubar a 70°C durante 30 minutos.
6. Agregar a la mezcla 200 µL de etanol absoluto frío y agitar en el vórtex vigorosamente.
7. Pasar todo el contenido del tubo a la columna de extracción colocada sobre un tubo de colecta y centrifugar a 8000 rpm por un minuto. Eliminar el líquido del tubo de colecta.

8. Transferir la columna de extracción a un tubo de colecta nuevo y agregar a la columna 500 μ L de buffer AW1. centrifugar a 8000 rpm durante un minuto. Eliminar el líquido del tubo de colecta.
9. Transferir la columna de extracción a otro tubo de colecta nuevo y agregar a la columna 500 μ L de buffer AW2. Centrifugar a máxima velocidad por 3 minutos. Eliminar el líquido del tubo de colecta.
10. Transferir la columna de extracción a un tubo eppendorf nuevo y estéril y agregar a la columna 200 μ L de buffer AE. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto para eluir el ADN.
11. Repetir la elusión del paso 10.

Para evaluar la pureza y cantidad de ADN extraído se realizó una electroforesis. Se cargaron 5 μ L de cada muestra de ADN en un gel de agarosa al 0.8% (Research Organics[®]), con 0.5 μ g/mL de bromuro de etidio (Research Organics[®]), sumergido en buffer 1 \times de Tris-Boratos-EDTA (TBE). El gel se observa en un transiluminador de luz ultravioleta MacroVue UVis-20 (Hoefer[®]) para visualizar las bandas de ADN.

3.2. Amplificación de los genes *cfb*, *cpsIa*, *cpsIb*, *cpsII*, *cpsIII*, *cpsIV*, *cpsV*, *cpsVI*, *cpsVII* y *cpsVIII*

La amplificación se realizó a partir del ADN extraído de cada cepa mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Consta de 30 ciclos de reacción, cada uno de los cuales está formado por tres etapas: desnaturalización, alineamiento y enlongación. La PCR se realizó en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®).

La etapa de desnaturalización, consiste en abrir la doble cadena de ADN, a una temperatura de 94°C por un minuto. Para la etapa de alineamiento, se disminuyó la temperatura hasta 60°C por un minuto, lo cual permite que los primers o iniciadores localicen su secuencia complementaria en el ADN y se peguen a ella para así iniciar la siguiente etapa. En la etapa de enlongación se aumenta la temperatura a 72°C por dos minutos para que la ADN polimerasa pueda sintetizar el ADN. Una vez concretados los 30 ciclos, la temperatura se disminuye hasta alcanzar los 4°C para parar la reacción (Figura 6).

Algunas cepas que dieron negativas para los nueve tipos capsulares, fueron evaluadas utilizando dos diferentes temperaturas de alineamiento: 50 y 55°C. Posteriormente se implementó el uso de adyuvantes como el glicerol y el DMSO en la mezcla maestra y se utilizó la temperatura inicial de 60°C, asegurando que en la mayor parte de las cepas se amplificara cualquiera de los genes que codifican para los diferentes serotipos en estudio.

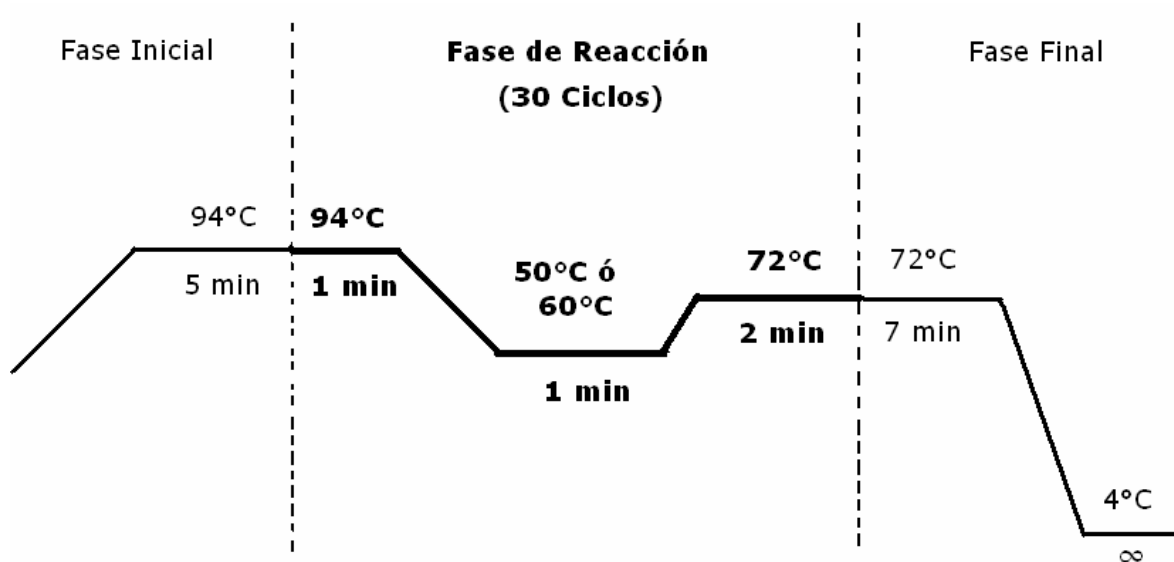


Figura 6. Diagrama de temperaturas empleadas para la PCR.

Se utilizó un volumen final de 30 μL para cada uno de los genes que codifican los diferentes serotipos (*cps1a*, Ib, II-VIII) y para el gen *cfb*. La mezcla de reacción por tubo se describe en la Tabla 4.

Reactivo	Volumen (μL)	
	A	B

Agua Ultrapura	19.43	19.43
Deoxinucleótidos Trifosfatados o Trifosfato (dNTP's) (Applied Biosystems®) Solución 1.25mM de cada dNTP	5.0	5.0
Buffer para PCR con MgCl ₂ 1.5mM (Roche®)	3.0	3.0
Primer "Forward" 10mM	0.6	0.6
Primer "Reverse" 10mM	0.6	0.6
Adyuvante: DMSO (Pharmacia Biotec®) o Glicerol (Stratagen®)	-	0.2
ADN de la muestra	1.0	1.0
Taq DNA polimerasa 5 U/ µL (Alltaenzima®)	0.17	0.17

Tabla 4. Composición de la mezcla de reacción para la PCR. **A.** Muestra la mezcla de reacción utilizada originalmente, la cual se probó con tres distintas temperaturas de alineamiento: 50 y 60°C. **B.** Muestra la mezcla de reacción utilizando adyuvantes, temperatura de alineamiento de 60°C.

A continuación se muestra la secuencia nucleotídica de cada uno de los primers utilizados.

Gen	Primer	Secuencia (5' a 3')
<i>cfb</i>	CFB-F	ATGATGTATCTATCTGGA ACTCTAGTG
	CFB-R	CGCAATGAAGTCTTTAATTTTTC

<i>cpsIa</i>	Ia-HF	ATACAGTTGTCGTAAGAAGAAAAC
	Ia-HR	TGTTTAGCTTTCCTACCAATATTAG
<i>cpsIb</i>	Ib-HF	TTTAGAAGTCCAGAATTTTCATAGAGTC
	Ib-HR	CAAAGAAAGCCATTGCTCTCTG
<i>cpsII</i>	II-KF	CTCCAGATGGTCTTTGTGAC
	II-KR	AAAATTGGTATATTTCTCTTGAC
<i>cpsIII</i>	III-HF	CCACATATGAGAATAAGACTTGC
	III-HR	CCTAGTGATAGTACTTTGGTTTCTG
<i>cpsIV</i>	IV-HF	TGTAAATCATCTACACCCCC
	IV-HR	ATAGCCTTTTGACAGGTAGGTT
<i>cpsV</i>	V-HF	CTTTTTTATAGGTTTCGATACCATC
	V-HR	GATGTTCTTTTAACAGGTAGATTACAC
<i>cpsVI</i>	VI-HF	TGTTTTTCTTACAAAGTGGAGTC
	VI-HR	CCTGTTTTGTTTGATAGCTTCTC
<i>cpsVII</i>	VII-MF	GTGCAATTAGAGGACAAAAATTTA
	VII-MR	CATCGAATCAGGAAAAATAGAT
<i>cpsVIII</i>	VIII-JF	ATCTCATGGCATGTCTGG
	VIII-JR	CATTCGAATAACAATCTTATTGC

Tabla 5. Secuencia nucleotídica de cada uno de los primers utilizados para la amplificación del gen *cfb*, y los nueve serotipos capsulares.

Para observar los productos de PCR, se realizó un corrimiento electroforético de las muestra junto con un marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®) en un gel de agarosa (Research Organics®) al 1.7% en buffer de TBE 1X con bomuro de etidio (Research Organics®) a una concentración final de 0.5 µg/mL., para así poder observar las bandas de ADN resultantes, al momento de incidir sobre el gel luz ultravioleta en el transiluminador (MacroVue UVis-20, Hoefer®).

El tamaño de los productos de la PCR para los diferentes genes fue de 240 hasta 350 pb; para determinarlos, se tomó una fotografía digital a cada uno de los geles, estos se analizaron con el programa Kodak[®] 1D 3.5v.

El esquema de tipificación se dividió en tres etapas:

- ❖ **Etapa 1:** Se evaluó la presencia del gen *cfb*, junto con los genes que codifican para los serotipos capsulares reportados con mayor frecuencia en la literatura (Ia, II y III). Las cepas negativas se probaron para el gen *cpsIa* a 50°C. Una vez obtenido un lote de aproximadamente 20 cepas que no amplificaron para ninguno de los serotipos antes mencionados, se realizó un PCR para determinar los genes de los serotipos restantes, en el cual observamos que el *cpsIb* y *cpsV* fueron los más comunes.

- ❖ **Etapa 2:** Con base a lo anterior, se realizó un PCR para los genes *cfb*, *cpsIa*, *cpsIb*, *cpsII*, *cpsIII* y *cpsV*, para cada cepa; y aquellas que dieron negativas se probaron en un PCR para el resto de los serotipos (IV, VI, VII y VIII).

- ❖ **Etapa 3:** A fin de optimizar materiales y reactivos se hicieron ensayos de PCR múltiples (más de 1 par de primers para amplificar simultáneamente 2 ó 3 genes). Primero se determinaron los pesos moleculares de los amplificadores del gen *cfb*, y de los nueve serotipos capsulares, con base a

ellos se eligieron amplificadores cuyos tamaños se diferenciaran entre sí visualmente, y se decidió que las combinaciones más adecuadas se incluyeran en dos PCR: Uno múltiple, con el gen *cfb*, y los genes para los serotipos III y V; y un PCR dual el cual incluía los genes que codifican para serotipos Ia y Ib. Las mezclas de reacción por tubo se describen en las Tablas 6 y 7.

Reactivos	Volumen (µL)
Agua Ultrapura	17.23
Deoxinucleótidos Trifosfatados o Trifosfato (dNTP's) (Applied Biosystems®) Solución 1.25mM de cada dNTP	5.0
Buffer para PCR con MgCl ₂ 1.5mM (Roche®)	3.0
CFB-F 10mM	0.6
CFB-R 10mM	0.6
III-HF 10mM	0.6
III-HR 10mM	0.6
V-HF 10mM	0.6

V-HR 10mM	0.6
Adyuvante: DMSO (Pharmacia Biotec [®]) o Glicerol (Stratagen [®])	0.2
ADN de la muestra	1.0
Taq DNA polimerasa 5 U/ μ L (Alltaenzima [®])	0.17

Tabla 6. Composición de la mezcla de reacción para la PCR múltiple, para los genes *cfb*, *cpsIII* y *cpsV*. Temperatura de alineamiento de 60°C. El volumen de DMSO no se incluyó en el volumen final del tubo de reacción

Reactivos	Volumen (μ L)
Agua Ultrapura	18.43
Deoxinucleótidos Trifosfatados o Trifosfato (dNTP's) (Applied Biosystems [®]) Solución 1.25mM de cada dNTP	5.0
Buffer para PCR con MgCl ₂ 1.5mM (Roche [®])	3.0
Ia-HF 10mM	0.6
Ia-HR 10mM	0.6
Ib-HF 10mM	0.6
Ib-HR 10mM	0.6
Adyuvante: DMSO (Pharmacia Biotec [®]) o Glicerol (Stratagen [®])	0.2
ADN de la muestra	1.0
Taq DNA polimerasa 5 U/ μ L (Alltaenzima [®])	0.17

Tabla 7. Composición de la mezcla de reacción para la PCR dual, para los genes *cpsIa* y *cpsIb*. Temperatura de alineamiento de 60°C. El volumen de DMSO no se incluyó en el volumen final del tubo de reacción.

3.3. Purificación de los productos de la PCR de los genes *cfb* y *cpsI a*, *cpsI b*, *cpsI I*, *cpsI II*, *cpsV*, y *cpsVI*

Mediante el uso del kit comercial Microcon[®] de Millipore[®], que consiste en columnas que contienen una membrana que impide el paso de las moléculas grandes de ADN (por arriba de 100,000 Da), se eliminaron todas las impurezas de reactivos, así como amplificadas inespecíficas o incompletas generadas durante la reacción, con la finalidad de obtener alta calidad en la secuenciación de los productos amplificadas. La metodología de purificación se describe a continuación:

1. Colocar cada columna sobre un tubo de colecta y agregar 370 μ L de agua estéril desionizada, sin tocar la membrana de la columna.
2. Agregar el producto de la PCR a la columna, incorporándolo delicadamente con la ayuda de una micropipeta.
3. Centrifugar a 2500 rpm por 14 minutos. Eliminar el filtrado.
4. Agregar a la columna 390 μ L de agua estéril desionizada evitando tocar la membrana de la columna.
5. Centrifugar a 2500 rpm durante 14 minutos y eliminar nuevamente el filtrado.
6. Invertir cuidadosamente la columna en un nuevo tubo de colecta y centrifugar a 10000 rpm durante 3 minutos.
7. El líquido colectado es el producto purificado. Puede agregarse agua ultrapura estéril para obtener un volumen final aproximado de 30 μ L.

La pureza de los productos de la PCR se observó mediante un corrimiento electroforético, utilizando como marcador de peso molecular el Low DNA Mass (Invitrogene®) con el cual, es posible calcular el peso molecular y la masa aproximada de ADN presente en cada banda.

3.4. Secuenciación de los productos de la PCR de los genes *cfb* y *cpsIa*, *cpsIb*, *cpsII*, *cpsIII*, *cpsV*, y *cpsVI*

Los productos purificados de la PCR fueron secuenciados en el equipo automatizado ABI-3100 de Applied Biosystems®, en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Las muestras fueron secuenciadas empleando los primers especificados en la Tabla 8. Las secuencias nucleotídicas fueron descritas anteriormente en la Tabla 5.

Gen	Primer	Clave de Cepa
<i>cfb</i>	CFB-F	1017
<i>cpsIa</i>	Ia-F	581, 602
<i>cpsIb</i>	Ib-F	1089
<i>cpsII</i>	II-F	1093
<i>cpsIII</i>	III-F	1017
<i>cpsV</i>	V-F	1224, 1250

<i>cpsVI</i>	VI-F	1287
--------------	------	------

Tabla 8. Primers empleados en las reacciones de secuenciación para los diferentes genes capsulares.

Como resultado del proceso de secuenciación se obtuvo un electroferograma y un archivo electrónico.

Cada secuencia electrónica se comparó con su respectivo electroferograma, a fin de resolver y editar posibles ambigüedades, empleando para ello el software EditSeq[®] (DNASTAR[®] Madison Wis). Se compararon con las secuencias publicadas en el GenBank, para poder establecer el porcentaje de identidad de las muestras, demostrando que tanto los primers como el proceso de amplificación en general funcionan adecuadamente y por ende confirmar el serotipo capsular al cual pertenecen las muestras.

Finalmente se procedió mediante el uso del software MegAlign[®] (DNASTAR[®] Madison Wis), a identificar las posibles mutaciones en los genes, que van desde simples sustituciones nucleotídicas, hasta inserciones o deleciones de varios pares de bases, se compararon las secuencias problemas con su correspondiente secuencia de referencia. Este programa permite a través del uso del algoritmo clustal V, un alineamiento de las secuencias, presentando el resultado con un código de colores, en el cual cada color representa un porcentaje de similitud entre las secuencias introducidas. Asimismo se obtuvo a través de este programa un árbol filogenético para cada uno de los genes secuenciados.

4. Resultados y Discusión

4.1. Identificación de *Streptococcus agalactiae*

Todas las cepas estudiadas mostraron el perfil típico de *Streptococcus agalactiae* (Tabla 9) tanto en las pruebas bioquímicas como en las serológicas realizadas de rutina dentro del laboratorio, a excepción de la determinación del tipo de hemólisis, que como antes se dijo para el caso de *Streptococcus agalactiae* es variable.

Prueba	Resultado
Bioquímica	
Tipo de Hemólisis	β en el 94% de las cepas, α en el 6% de los casos
Resistencia a 0.04 U de Bacitracina	Positiva (cepas resistentes)
Factor de CAMP	Positivo
Hidrólisis del hipurato de sodio (Generación de benzoato)	Positiva
Serológica	
Grupo de Lancefield	B

Tabla 9. Perfil bioquímico y serológico de cepas de *Streptococcus agalactiae* analizadas.

5.2. Tipificación de *Streptococcus agalactiae*

Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó empleando el kit comercial DNeasy[®] Tissue (QIAGEN[®]), dicha técnica ha mostrado una alta eficiencia en cuanto a rendimiento y pureza del ADN. Estos dos parámetros fueron evaluados mediante un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 0.8%, cuya fotografía digital se muestra en la figura 7.

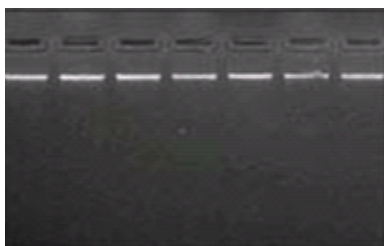


Figura 7. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 0.8%, del ADN extraído por medio del kit comercial DNeasy[®] Tissue (QIAGEN[®]). Se cargaron 4 μ L de ADN en cada pozo.

Otra ventaja del kit DNeasy[®] Tissue (QIAGEN[®]) es la estabilidad del ADN que se obtiene, ya que permite conservarlo a -20°C por varios años, lo que ha dado lugar a una colección de muestras de ADN desde hace 6 años en el laboratorio.

Amplificación de los genes *cfb* y *cpsIa*, *cpsIb*, *cpsII*, *cpsIII*, *cpsV*, y *cpsVI*

Entre las cepas analizadas se identificaron por la PCR 6 de los 9 tipos capsulares reportados (Ia, Ib, II, III, V y VI). No se encontraron cepas de los tipos capsulares IV, VII y VIII. El gen *cfb*, fue amplificado en todas las cepas evaluadas, incluso en 7 que no amplificaron con ningún tipo capsular. Como se esperaba los pesos moleculares de los genes amplificados fluctuaron entre 240 y 350 pb (Tabla 10).

Gen	Peso Molecular
-----	----------------

	(pb)
<i>cfb</i>	260
<i>cpsIa</i>	340
<i>cpsIb</i>	250
<i>cpsII</i>	300
<i>cpsIII</i>	340
<i>cpsV</i>	300
<i>cpsVI</i>	290

Tabla 10. Pesos moleculares de los genes amplificados por la técnica de la PCR.

Esquema de Tipificación

Etapa 1

Inicialmente, la temperatura de alineamiento utilizada fue de 60°C y los únicos primers que se emplearon fueron los correspondientes a los genes *cfb*, *cpsIa*, *cpsII* y *cpsIII* (reportados con mayor frecuencia en la literatura), la mayoría fueron Ia (Figura 8).

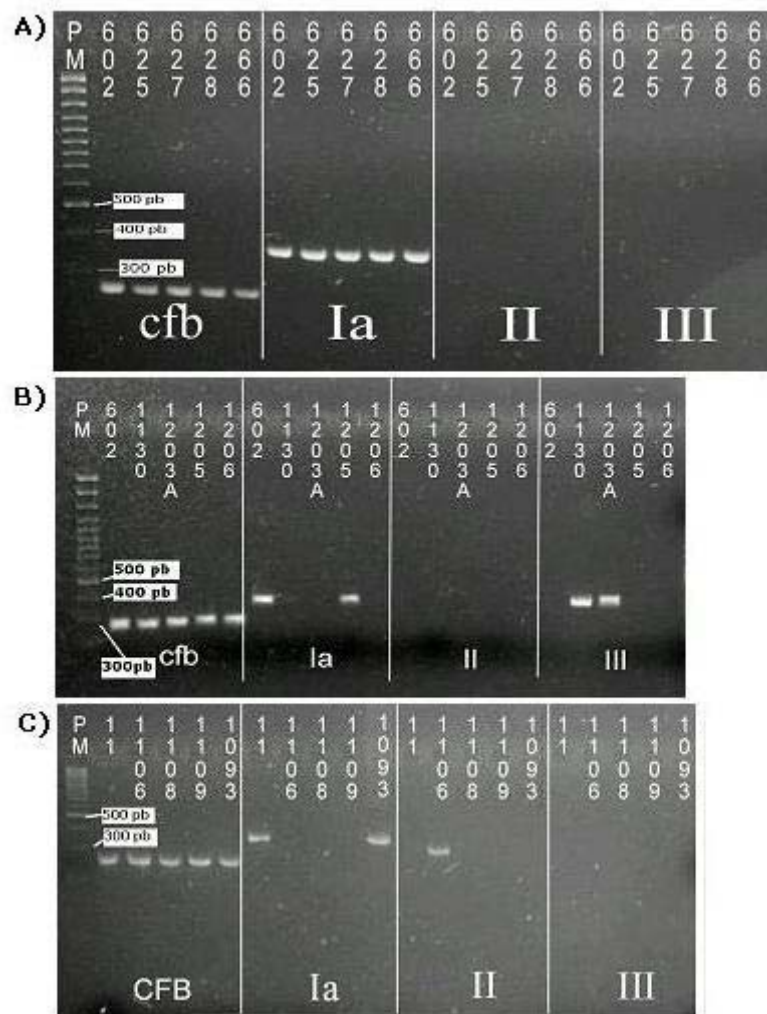


Figura 8. Corrimientos electroforéticos en gel de agarosa al 1.7%, de los productos de amplificación mediante la técnica de PCR (Temperatura de alineamiento: 60°C). PM representa al marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®). **A)** Se puede observar que las cinco cepas pertenecen al serotipo capsular Ia, cuyo amplificado posee un peso molecular aproximado de 340 pb. **B)** Aquí se muestran dos cepas que pertenecen al serotipo capsular Ia y dos al III. **C)** Se muestran dos cepas positivas para el serotipo una cepa positiva Ia y una para el serotipo capsular II.

Las cepas negativas se evaluaron nuevamente a una temperatura de alineamiento de 50°C, no se observaron cambios con respecto a los resultados a 60°C, por lo que las cepas negativas fueron evaluadas con los primers de los

Figura 9. Corrimientos electroforéticos en gel de agarosa al 1.7%, de los productos de amplificación mediante la técnica de PCR (Temperatura de alineamiento 60°C). PM representa al marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®). **A)** Se muestran 5 cepas positivas para el serotipo V. **B)** Se muestran dos cepas positivas para el serotipo Ib, y dos para el serotipo V. **C)** Se muestran 2 cepas positivas para el serotipo V, y una positiva para el serotipo capsular VI.

En cuanto a las cepas que seguían sin amplificar, se probó nuevamente la temperatura de alineamiento de 50°C, pero esta vez sólo para el gen *cpsV*, obteniéndose resultados positivos para algunas cepas cuyos amplificados presentaban el tamaño correspondiente al gen *cpsV* y con un buen rendimiento (Figura 10).

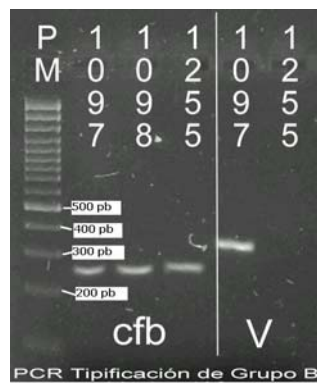


Figura 10. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.7%, de los productos de amplificación mediante la técnica de PCR (Temperatura de alineamiento 50°C). PM representa al marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®)

Etapa 2

Las observaciones anteriores nos permitieron probar otra estrategia de tipificación que incluyera el uso de los primers de los tipos capsulares más frecuentes en nuestros aislamientos como son: Ia, Ib, II, III y V, en un lote de cepas nuevas. Los resultados obtenidos fueron de gran ayuda, ya que más del 90% de las cepas presentaban alguno de los genes que codifican para

Etapa 3 (PCR múltiple y dual)

Finalmente en esta etapa se decidió realizar PCR múltiples, siempre con la finalidad de establecer una estrategia que redujera tiempo y costo en la tipificación molecular de *Streptococcus agalactiae*. Se tomó en cuenta el peso molecular de los productos de la PCR (Tabla 11) y la prevalencia de los mismos en nuestra población.

Se procedió a evaluar visualmente la distancia entre los genes amplificados de los serotipos que se sometieron juntos a una misma reacción de PCR. Las mezclas evaluadas fueron: genes *cpsIa/cpsIb* y genes *cfb/cpsIII/cpsV*. Se corrieron en un mismo pozo de un gel de electroforesis, productos de PCR positivos obtenidos previamente para los serotipos Ia y Ib (colocando 2 µL de cada producto en el pozo), y en otro pozo productos de PCR para los serotipos III y V, junto con un amplificado positivo para el gen *cfb*. Se demostró que visualmente pueden ser identificados con base en la diferencia entre los pesos moleculares de dichos productos, para ambos casos descritos.

Se realizaron las primeras pruebas, a fin de evaluar si existía algún tipo de interacción negativa entre los pares de primers utilizados en cada una de las reacciones, la cual pudiera inactivar de algún modo a un par de primers. Como para la PCR dual Ia/Ib que se buscaba implementar no existía ADN alguno que pudiera dar positivo para ambos serotipos, se realizó una mezcla de dos ADN, los cuales habían dado positivo, por separado, para cada uno de los genes *cpsIa* y *cpsIb*. Al mismo tiempo se utilizaron controles positivos de ambos genes y utilizando la misma mezcla de reacción, en la cual se agregaron los dos pares de primers correspondientes. El resultado fue la

obtención de dos bandas para la mezcla de ADN, y bandas únicas para cada uno de los controles. De la prueba antes descrita, se halló que no existía interacción negativa entre los pares de primers utilizados, además se obtuvieron amplificados de peso molecular correspondiente al esperado (Figura 12).

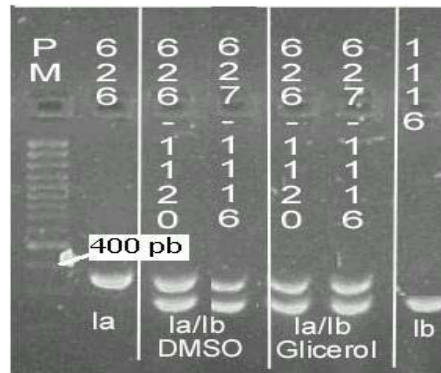


Figura 12. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.7%, de los productos de amplificación mediante la técnica de PCR (Temperatura de alineamiento 60°C). Se muestran cuatro cepas dos positivas para la, pero que habían amplificado anteriormente a temperaturas diferentes 627 (60°C) y 626 (50°C); y dos positivas para lb 1116 y 1120; así como la mezcla de los ADN, en presencia de glicerol y DMSO. PM representa al marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®).

Al mismo tiempo se realizó la prueba para la PCR múltiple *cfb/cpsIII/cpsV*, y al igual que para la PCR dual, se tuvo que recurrir a la mezcla de ADN, debido a que un solo ADN no puede dar positivo para más de un serotipo. Se obtuvieron dobles bandas para el caso de los controles, y tres bandas para la mezcla de ADN, con lo cual se observó que no existía interacción negativa entre los pares de primers utilizados y mezclados en la misma reacción (Figura 13).

estas dos reacciones se logró tipificar 11 de las 15 cepas evaluadas. PM representa al marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®).

En cuanto a las cepas que resultaron ser no tipificables por PCR, es posible que pertenezcan al serotipo recientemente descubierto, el serotipo IX, o a algún serotipo aun no identificado como tal, ya que también se han reportado variaciones alélicas importantes entre cepas, presuntivamente consideradas dentro de los serotipos III y V.

Purificación de los productos de la PCR de los genes *cfb* y *cpsIa*, *cpsIb*, *cpsII*, *cpsIII*, *cpsV*, y *cpsVI*

Utilizando el kit comercial Microcon® de Millipore®, se eliminaron todas las impurezas de reactivos, así como amplificadores inespecíficos o incompletos generados durante la reacción, con la finalidad de obtener alta calidad en la secuenciación de los productos amplificados. Con el uso del marcador de peso molecular el Low DNA Mass (Invitrogene®) y el software Kodak® 1D 3.5v, se calculó el peso molecular y la masa aproximada de ADN presente en cada banda. Los resultados se muestran en la Tabla 11 y Figura 15.

Gen	Clave de Cepa	Peso Molecular (pb)	Masa (ng)
<i>Cfb</i>	1017	274.4	50.23
<i>cpsIa</i>	581	376.9	24.05
	602	371.8	47.8
<i>cpsIb</i>	1089	269.6	40.17
<i>cpsII</i>	1093	318.6	64.3

<i>cpsIII</i>	1017	382.1	19.86
<i>cpsV</i>	1224	321.7	99.2
	1250	317.4	163.8
<i>cpsVI</i>	1287	293.7	15.74

Tabla 11. Pesos moleculares y masas de cada uno de los productos de PCR purificados para ser secuenciados. Todos amplificaron a una temperatura de alineamiento de 60°C, a excepción de las cepas 581 y 1250. Las unidades de los pesos moleculares son los pares de bases (pb), y las de las masas son los nanogramos (ng).

Con la finalidad de confirmar mediante secuenciación y comparación de las secuencias, que no existía diferencia alguna entre los productos amplificados a 50°C y 60°C, para los genes *cpsIa* y *cpsV*, se purificaron para cada caso dos productos de PCR. Para el tipo capsular Ia, se purificaron los productos de las cepas 602 y 581, el primero amplificó a 50°C y el segundo a 60°C. En el caso del tipo capsular V, se purificaron los productos de las cepas 1224 y 1250, el primero amplificó a 60°C y el segundo a 50°C (Figura 15).

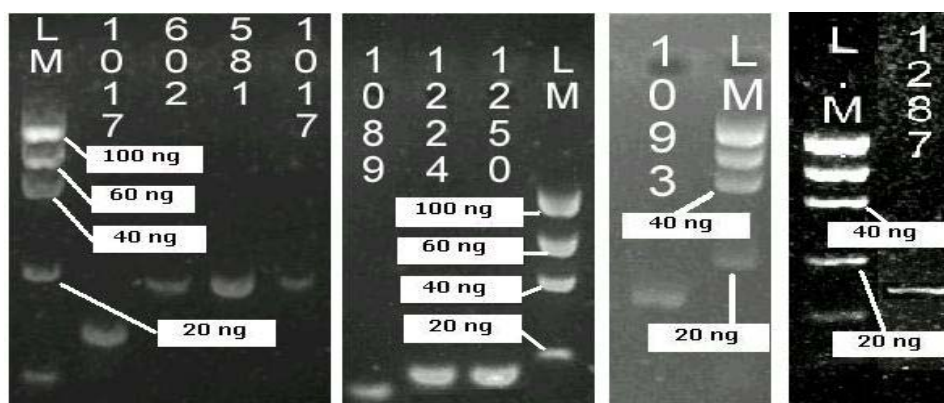


Figura 15. Corrimientos electroforéticos en gel de agarosa al 1.7%, de los productos de amplificación purificados; la cepa 1017 amplificó para los genes *cfb* y *cpsIII* (los resultados se muestran en dicho orden), las cepas 602 y 581, amplificaron para el gen *cpsIa*, 1089 para *cpsIb*, 1224 y 1250 para *cpsV*, la 1287 para *cpsVI* y finalmente la 1093 para *cpsII*.

LM es el marcador de peso molecular Low DNA Mass (Invitrogene®). Las masas de los productos se evalúan en función de la intensidad de la banda y no del corrimiento de esta.

Secuenciación de los productos de la PCR de los genes *cfb* y *cpsIa*, *cpsIb*, *cpsII*, *cpsIII*, *cpsV*, y *cpsVI*

Como resultado del proceso de secuenciación se obtuvo un electroferograma y su correspondiente secuencia electrónica para cada muestra. En total se mandaron a secuenciar 9 amplificados (Tabla 12), uno correspondiente al gen *cfb* (Figura 16), dos para el *cpsIa* (Figuras 17) y el *cpsV* (Figura 21), ya que como se dijo anteriormente, con estos dos genes (tipos capsulares Ia y V) se evaluaron dos temperaturas de alineación diferentes, finalmente para los genes *cpsIb* (Figura 18), *cpsII* (Figura 19), *cpsIII* (Figura 20) y *cpsVI* (Figura 22), pertenecientes a los serotipos II, III y VI respectivamente, se secuenció un amplificado por gen.

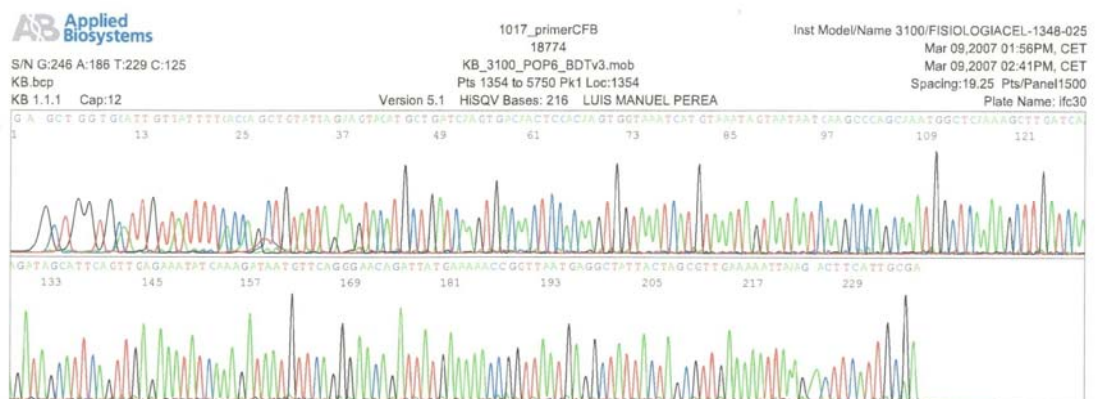


Figura 16. Electroferograma obtenido de la secuenciación del gen *cfb*, cepa 1017.

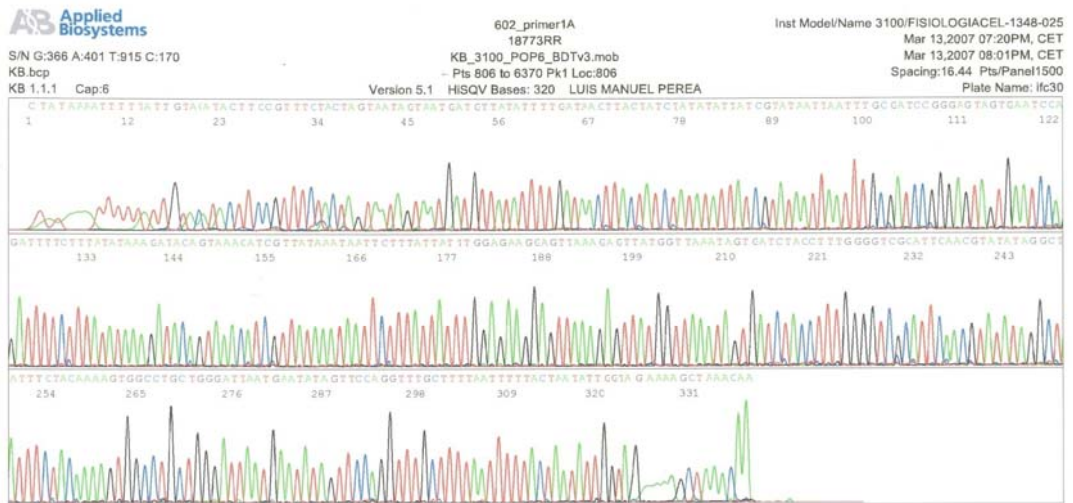


Figura 17. Electroferograma obtenido de la secuenciación del gen *cps1a*, cepa 602.

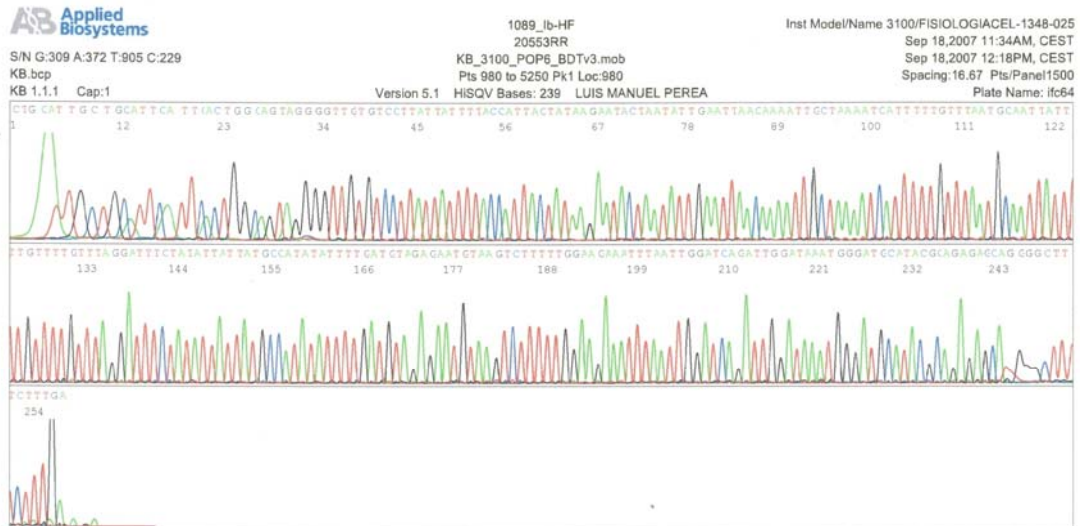


Figura 18. Electroferograma obtenido de la secuenciación del gen *cps1b*, cepa 1089.

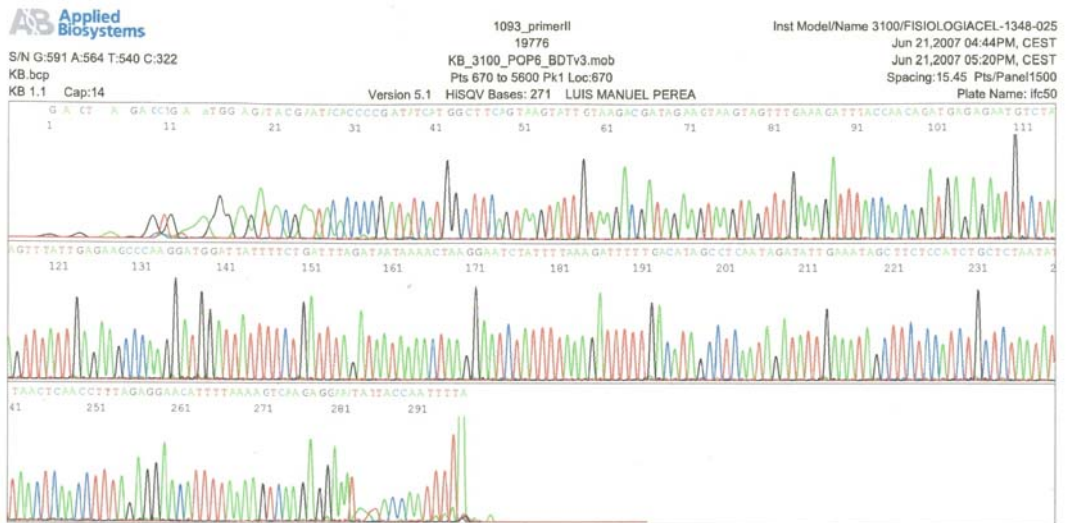


Figura 19. Electroferograma obtenido de la secuenciación del gen *cpsII*, cepa 1093.

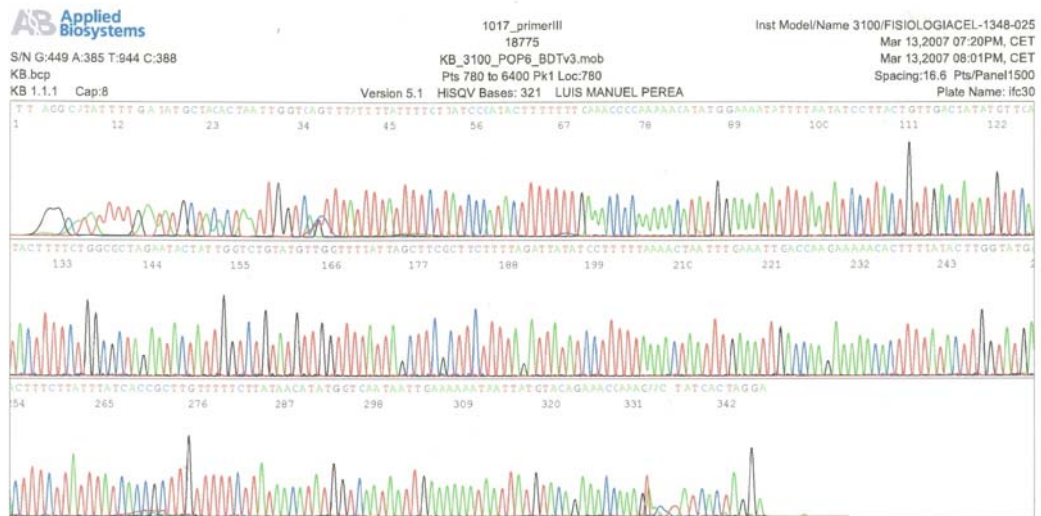


Figura 20. Electroferograma obtenido de la secuenciación del gen *cpsIII*, cepa 1017.



Figura 21. Electroferograma obtenido de la secuenciación del gen *cpsV*, cepa 1224.

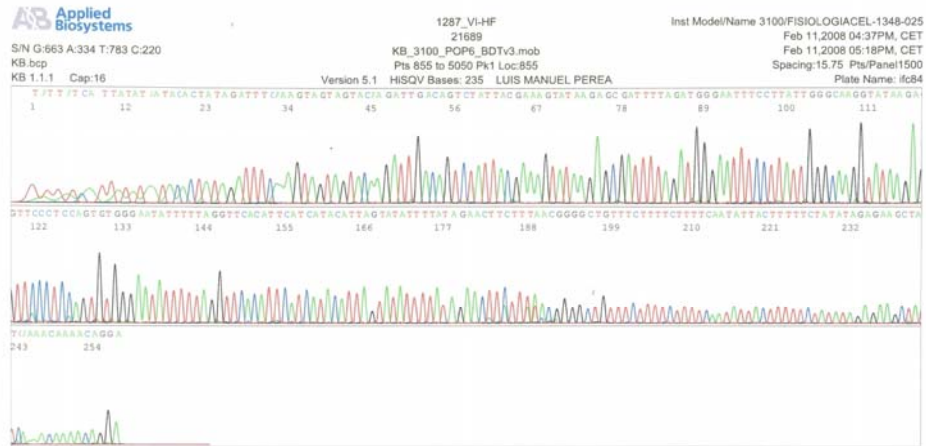


Figura 22. Electroferograma obtenido de la secuenciación del gen *cpsVI*, cepa 1287.

Análisis de las secuencias

Cada secuencia electrónica fue comparada con su respectivo electroferograma, y no se halló ambigüedad alguna. Se compararon con secuencias previamente reportadas en el GenBank, utilizando para ello el programa megablast, presente en la página del NCBI. Con dicho programa se determinó el porcentaje de identidad entre las secuencias problema y las de referencia (Tabla 12).

Gen	Secuencia de Referencia (GenBank) Clave de acceso/descripción	Porcentaje de Identidad
cfb	gi/152002345/gb/EF694027.1/	100%
	<i>Streptococcus agalactiae</i> CAMP factor (cfb) gene, complete cds.	
cpsIa	gi/39725904/gb/AY375362.1/	99%
	<i>Streptococcus agalactiae</i> Strain 090 capsular polysaccharide biosynthesis gene cluster, partial sequence. Serotype Ia.	
cpsIb	gi/12697593/dbj/AB050723.1/	100%
	<i>Streptococcus agalactiae</i> cpsIbD, cpsIbF, cpsIbG, cpsIbH, cpsIbI, cpsIbJ, cpsIbK, cpsIbL, neuB, neuC, genes, complete cds.	
cpsII	gi/39725904/gb/AY375362.1/	100%
	<i>Streptococcus agalactiae</i> serotype II cps2C, cps2D, cps2E, cps2F, cps2G, cps2H, cps2I, cps2J, cps2K, cps2L, neuB, neuC and neuD genes; complete cds; and neuA gene, partial cds.	
cpsIII	gi/18029147/gb/AF363056.1/AF363056/	100%
	<i>Streptococcus agalactiae</i> strain GBOO/031 capsular polysaccharide biosynthesis gene cluster, partial sequence. Serotype III.	
cpsV	gi/13549124/gb/AF349539.1/	100%
	<i>Streptococcus agalactiae</i> CNCTC 1/82 type V capsular polysaccharide, synthesis operon, complete sequence.	
cpsVI	gi/13022158/gb/AF337958.1/	98%
	<i>Streptococcus agalactiae</i> strain NT6 type VI capsular polysaccharide synthesis operon, complete sequence	

Tabla 12. Secuencias reportadas en el GenBank contra las cuales fueron comparadas las secuencias problema, su descripción, y el porcentaje de identidad obtenido.

Como se observa en la Tabla 12, las secuencias obtenidas de las muestras problema para cada uno de los genes encontrados, posee una elevada identidad con las secuencias de referencia reportadas en el GenBank, siendo

el porcentaje más bajo de 98%, lo que nos demuestra que los amplificados secuenciados pertenecen a los genes deseados, y que los pares de primers, como la técnica de PCR utilizada permiten una amplificación específica.

Mediante el uso del MegAlign[®] se buscaron posibles mutaciones presentes en las secuencias problema. Se encontraron cambios de base (Tabla 13), únicamente para el caso de los genes *cpsIa* y *cpsVI* (de ahí el 1 ó 2% de variación con respecto a las secuencias de referencia), que se pueden deber a variaciones alélicas presentes entre las cepas de estudio, estos se encontraban al interior de los genes, ello no impide que los primers se peguen a la secuencia templado, afirmando que estos se pegan en zonas altamente conservadas del gen de estudio, permitiendo que el proceso de tipificación sea confiable.

Gen	Secuencia	Posición	Base
<i>cpsIa</i>	Referencia	133	G
	Problema		T
<i>cpsVI</i>	Referencia	19	T
	Problema		A

Tabla 13. Cambios de base hallados por comparación de las secuencias problema con su respectiva de referencia. Los cambios son de una base púrica por una pirimídica y viceversa. Para el caso del gen *cpsIa*, sólo se incluye un resultado para la secuencia problema, ya que ambos genes secuenciados resultaron idénticos.

Finalmente se obtuvieron los árboles filogenéticos para los dos genes mencionados (Figura 23), se muestra el grado de divergencia entre las secuencias alineadas, resumido en el número presente por debajo de cada

árbol filogenético (el cual va de 0 a 1), representa el número de pares de bases en que difieren dichas secuencias, por cada 100 pares de bases de una secuencia.

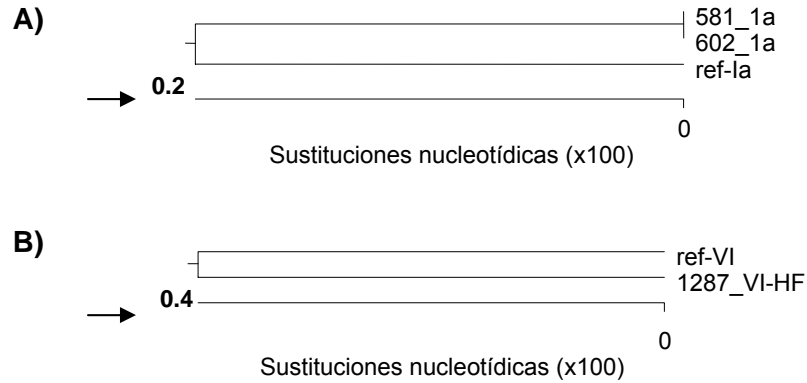


Figura 23. Árboles Filogenéticos obtenidos del alineamiento de las secuencias de referencia (Tabla 13) con las secuencias problema para los genes *cpsIa* y *cpsVI*. El número que establece el grado de divergencia entra las secuencias alineadas se encuentra resaltado con una flecha y en negritas.

Como se pudo observar para los gen *cpsIa* (Figuras 23-A) se halló que las secuencias problema divergían de la de referencia en 0.2 pb por cada 100 pb (1 cambio por cada 500pb), resultado del cambio de base mencionado en la Tabla 13; en el árbol filogenético, se observa como existen dos ramas, una de mayor intensidad que otra, en la banda más intensa se encuentran presentes ambas secuencias problema (las de los genes amplificados a 50°C y a 60°C) y en la rama restante se encuentra presente la secuencia de referencia. Lo anterior nos deja ver que a pesar de que se utilizaron diferentes temperaturas de alineamiento, el resultado obtenido fue el mismo. Resultaría de gran importancia, explorar a futuro más secuencias problema de este gen, para así ver si la variación con respecto a la de referencia se sigue manteniendo. Para el caso del gen *cpsVI* (Figura 23-B), se encontró una divergencia de 0.4 pb por cada 100 pb (1 cambio por cada 250pb) de la secuencia problema con

respecto a la de referencia. Para el caso de los restantes genes secuenciados (*cfb*, *cpsIb*, *cpsII*, *cpsIII* y *cpsV*) no hubo diferencia alguna entre las secuencias, es decir el grado de homología entre las secuencia problema y su respectiva de referencia fue del 100% para todos los casos; por ello no se incluyeron sus árboles filogenéticos.

Establecimiento de posibles relaciones entre la frecuencia de serotipos por aislamiento clínico

Las cepas de *Streptococcus agalactiae* se clasificaron inicialmente con base al serotipo al que pertenecen. Las frecuencias son mostradas en la Tabla 14 y representadas en un gráfico de frecuencias o de pay (Gráfico 1).

Serotipo	Frecuencia
Ia	90
V	57
Ib	24
III	18
II	10
NT	7
VI	1
Total	207

Tabla 14. Frecuencia por serotipo de todas las cepas evaluadas. NT se refiere a las cepas que no pudieron ser tipificados mediante los primers empleados.

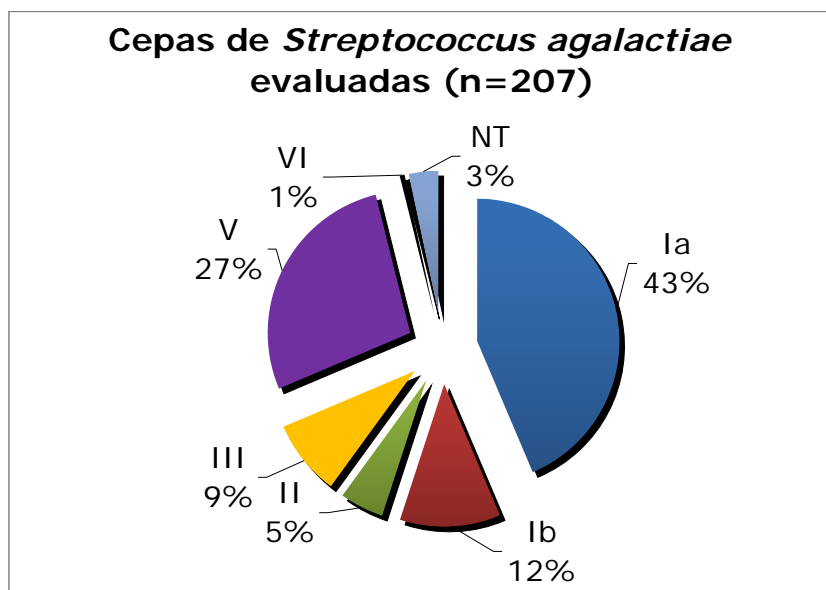


Gráfico 1. Distribución de los tipos capsulares determinados en las 207 cepas evaluadas de *Streptococcus agalactiae*.

Se puede observar tanto en la tabla 14 como en el gráfico 1, el serotipo más prevalente entre las cepas estudiadas fue el serotipo Ia (43%), seguido por el serotipo V (27%) lo cual concuerda con los datos reportados en Estados Unidos y el oeste de Europa, siendo los serotipos más frecuentes entre los casos no invasivos el Ia, III y V ⁽³⁹⁾. La reciente prevalencia del serotipo V en países de América es el resultado de las cada vez más frecuentes migraciones, que han generado que este serotipo no sea solamente propio de países como Japón, si no que ha logrado extenderse a lo largo de nuestro continente ^(38, 39). Lo mismo ocurre para el serotipo VI, que a pesar de que sólo se halló en una de las 207 cepas evaluadas, ya está presente en nuestro país, y posiblemente su frecuencia pudiera aumentar con el paso del tiempo ⁽³⁹⁾.

Origen Clínico

A fin de relacionar las frecuencia de serotipos con el origen clínico de las cepas, se procedió a dividir las cepas en cuatro grupos: Exudado Vaginal (Tabla 15 y Gráfico 2), Exudado Faríngeo (Tabla 16 y Gráfico 3), Urocultivo (Tabla 17 y Gráfico 4) y Otros (Tabla 18 y Gráfico 5), esta última categoría incluye a los aislamientos de orígenes clínicos diferentes a los tres anteriores (Escaras, heridas, narina, vulvar, aspirado bronquial, espermocultivo, secreción y COD), así como las cepas de las cuales se desconocía el tipo de aislamiento del cual procedían. Cada grupo de cepas se subdividió por el serotipo al que pertenecieron y se procedió a sacar los porcentajes y el gráfico de frecuencias.

Serotipo	Frecuencia
Ia	37
V	24
Ib	10
III	10
NT	2
II	5
VI	1
Total	89

Tabla 15. Frecuencia por tipo capsular de las cepas de *Streptococcus agalactiae* provenientes de exudados vaginales.

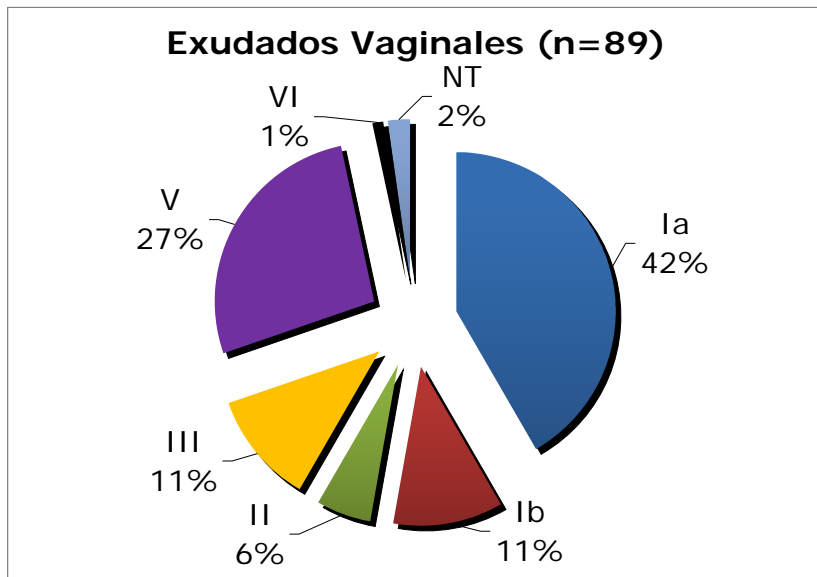


Gráfico 2. Distribución de los tipos capsulares determinados en las cepas de *Streptococcus agalactiae* provenientes de exudados vaginales.

Para las cepas provenientes de exudados vaginales se observó que al igual que para la totalidad de cepas, los serotipos más prevalentes son el Ia (42%) seguido por el V (27%), similar a lo encontrado en estudios realizados en Italia y la República Checa ^(39, 51), ya que en estos países se tipificaron cepas provenientes de exudados vaginales, tanto de mujeres embarazadas como no embarazadas, siendo los serotipos sobresalientes el Ia, III y V. Las migraciones humanas influyen a la aparición y diseminación de tipos capsulares nuevos en una población, como es el caso del tipo V, que inicialmente sólo se encontraba presente en Japón ^(38, 39). En nuestro estudio observamos la presencia abundante de este tipo capsular y la aparición del tipo capsular VI, no reportado con anterioridad en nuestra población.

Serotipo	Frecuencia
Ia	20
NT	5

II	3
V	3
Ib	1
Total	32

Tabla 16. Frecuencia y tipo capsular de las cepas de *Streptococcus agalactiae* provenientes de exudados faríngeos.

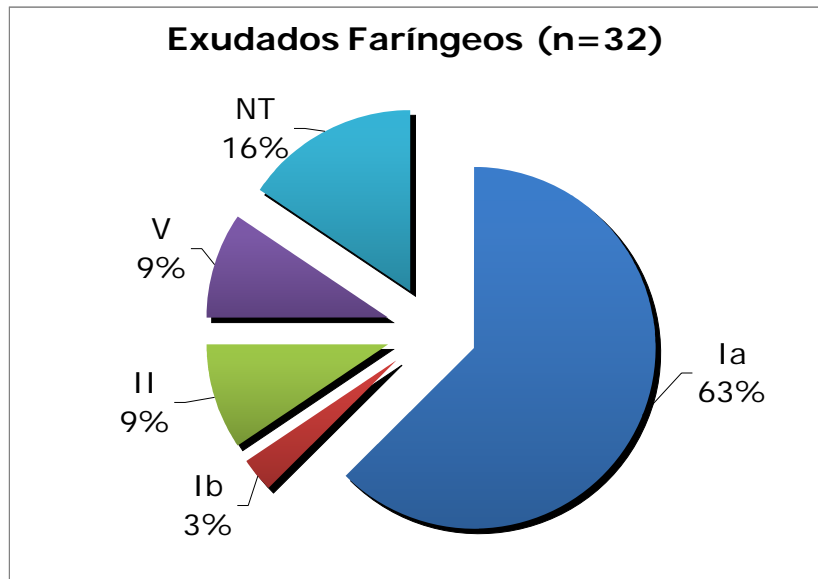


Gráfico 3. Distribución de los tipos capsulares determinados en las cepas de *Streptococcus agalactiae* provenientes de exudados faríngeos.

En cuanto a las cepas provenientes de exudados faríngeos, el tipo capsular más abundante fue el Ia (63%), a este le siguieron las cepas que no pudieron ser tipificadas mediante el uso de los primers empleados (16%) y después los tipos capsulares II y V, con 9% cada uno. A pesar de que la prevalencia del tipo capsular Ia concuerda con lo reportado en Estados Unidos y el oeste de Europa para los casos no invasivos, debemos prestarle más atención a la prevalencia de las no tipificables, las cuales pueden ser variantes alélicas de los tipos capsulares III y VII ⁽⁵²⁾, o en su defecto del recientemente descubierto, el tipo capsular IX, o de alguno aún no descubierto.

Serotipo	Frecuencia
V	26
Ia	17
Ib	8
II	2
III	1
Total	54

Tabla 17. Frecuencia por tipo capsular de las cepas de *Streptococcus agalactiae* provenientes de urocultivos.

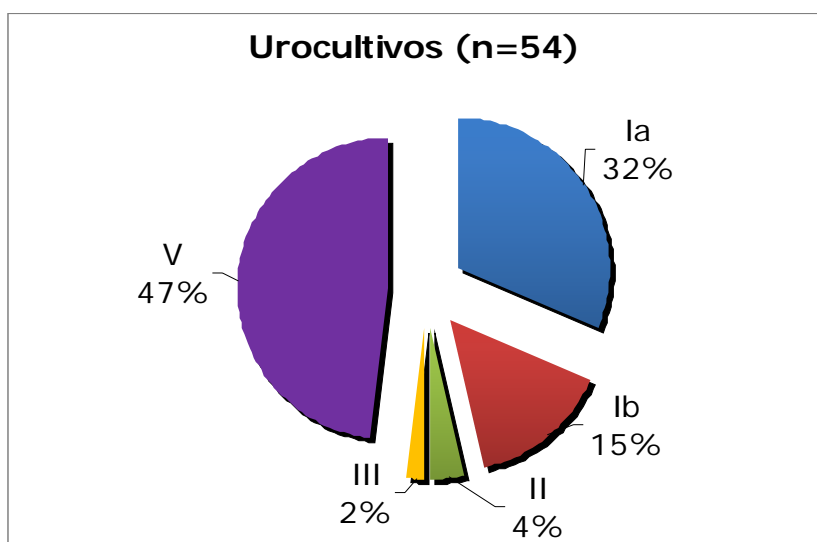


Gráfico 2.4. Distribución de los tipos capsulares determinados en las cepas de *Streptococcus agalactiae* provenientes de urocultivos.

En lo referente a las cepas provenientes de urocultivos, el serotipo más prevalente es el V, seguido por el serotipo Ia, los dos siguen estando incluidos entre los más prevalentes en casos no invasivos ⁽³⁹⁾.

Serotipo	Frecuencia
Ia	16
Ib	5
III	7
V	4

Total	32
--------------	-----------

Tabla 18. Frecuencia y tipo capsular de las cepas provenientes de otros orígenes clínicos.

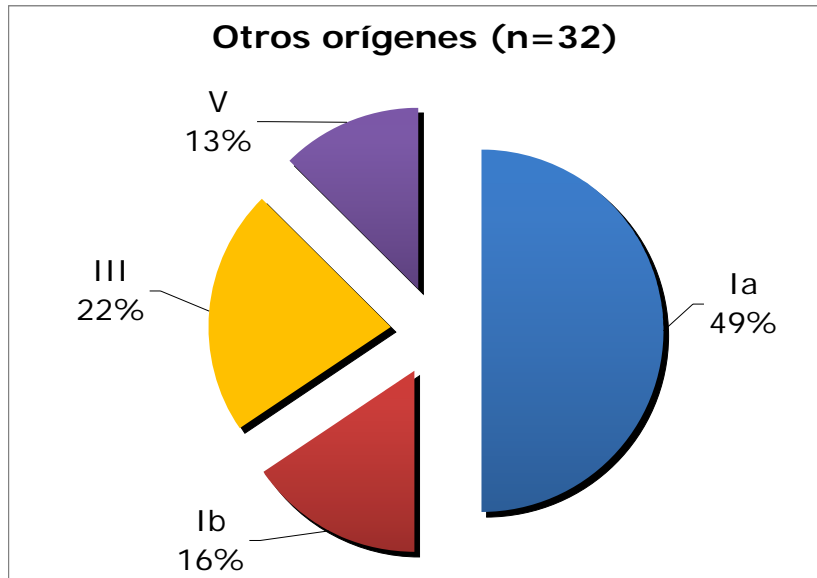


Gráfico 4. Distribución de los tipos capsulares determinados en las cepas de *Streptococcus agalactiae* provenientes de otros orígenes clínicos.

Sólo 4 tipos capsulares fueron detectados entre las cepas pertenecientes a otros orígenes clínicos, estos son el Ia (50%), seguido del III (22%), el Ib (16%) y el V (12%), lo cual al igual que para los casos anteriores concuerda con lo reportado en Estados Unidos y el oeste de Europa ⁽³⁹⁾.

Asimismo como se pudo observar los serotipos IV, VII y VIII, no estuvieron presentes en ninguna de las 207 cepas evaluadas. Esto concuerda con la reportado en un estudio en Boston, en el cual en muestras provenientes de casos no invasivos y colonizaciones, hallaron todos los serotipos capsulares, a excepción del IV, VII y VIII ⁽⁴⁷⁾. También en un estudio realizado en Chile ⁽³⁸⁾, en muestras de casos no invasivos y colonizaciones vaginales, se encontraron

todos los serotipos capsulares a excepción del IV. No podemos asegurar la extrapolación de estos datos, pero debido a la proximidad con los Estados Unidos y Chile (en comparación con los países de los cuales se reportan la mayor parte de los artículos de investigación), podríamos tratar de relacionarlos con mayor afán.

El conocimiento de la distribución de los serotipos, permite desarrollar óptimas formulaciones de antígenos en las vacunas, las cuales cada vez son más necesarias debido a la cada vez más frecuente incidencia de enfermedades debidas al *Streptococo* del grupo B.

A pesar de que el uso actual de la técnica de PCR en la tipificación de cepas de *Streptococcus agalactiae*, es epidemiológico, en recientes fechas, resulta una promesa para la detección rápida y precisa de este patógeno. Lo anterior, favorecería el tratamiento oportuno de los diversos padecimientos generados por ésta bacteria, pero sobretodo se ayudaría a reducir la incidencia de la infección neonatal precoz, mediante la administración de profilaxis antimicrobiana intraparto en mujeres embarazadas.

Conclusiones

- ❖ El empleo de la técnica de la PCR, permite facilitar el proceso de tipificación de cepas de *Streptococcus agalactiae*, reduciendo el tiempo de trabajo e incrementando la sensibilidad y especificidad.
- ❖ El conocimiento de los tipos capsulares predominantes en nuestra población, favoreció el desarrollo de PCR duales y múltiples.
- ❖ La aplicación de las técnicas de PCR duales y múltiples permitió la optimización de reactivos y tiempo invertidos en el proceso de tipificación, así como la posibilidad de abarcar los tipos capsulares más prevalentes, utilizando sólo dos mezclas de reacción.
- ❖ En las 207 cepas analizadas de *Streptococcus agalactiae*, los serotipos más prevalentes son el Ia, III y V, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura en cuanto a los casos no invasivos.
- ❖ El tipo capsular Ia de *Streptococcus agalactiae* fue aislado con mayor frecuencia de exudados vaginales y faríngeos. Mientras que en urocultivos el tipo capsular V fue el predominante, el cual hasta hace unos años se presentaba únicamente en Asia.
- ❖ No se hallaron cepas pertenecientes a los tipos capsulares IV, VII y VIII.

- ❖ La caracterización molecular de cepas de *Streptococcus agalactiae* puede ayudar a mantener una vigilancia sobre la incidencia y severidad de las infecciones causadas por ésta bacteria.

Bibliografía

- 1. Baker, C. J. and Edwards, M. S.. (1995). Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant.** 4th ed. W. B. Saunders Co. Philadelphia; 980–1028.
- 2. Bevanger, L. and Maeland, J. (1979). Complete and Incomplete Ibc Protein Fraction in Group B Streptococci.** Acta Pathologica, Microbiologica and Immunologica .Scandinavian; 87:51-54.
- 3. Brooks. G., Butel, J. and Morse, S. (2005). Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg.** 18^a ed. El Manual Moderno, S.A de C.V. México; 227-231.
- 4. Butter, M. and Moor, C. (1967). Streptococcus agalactiae as a Cause of Meningitis in the Newborn, and of Bacteraemia in Adults. Differentiation of Human and Animal Varieties.** Journal of Bacteriology and Serology; 33:430-450.
- 5. Cieslewicz, M., Chaffin, D., Glusman, G., Kasper, D., Madan, A., Rodrigues, S., Fahey, J., Wessels, M. and Rubens, C. (2005). Structural and Genetic Diversity of Group B Streptococcus Capsular Polysaccharides.** Infection and Immunity; 73:3096–3103.

6. **Díaz, M. y [Nieves, B.](#) (2008). Comparación de Medios de Cultivo y Procedimientos para Detectar Colonización por *Streptococcus agalactiae* en Mujeres Embarazadas.** Revista Chilena de Infectología; 25: 108-113.

7. **Eickhoff, T., Klein, J., Daly, A., Ingall, D. and Finland, M. (1964). Neonatal Sepsis and Other Infections Due to Group B Beta-Hemolytic Streptococci.** English Journal of Medicine; 271:1221-1228.

8. **Facklam, R. (1974). Manual de Procedimientos. Aislamiento e Identificación de Estreptococos.** U.S. Department of Health, Education and Welfare. Atlanta, Georgia; 37-40.

9. **Fischetti, V., Novick, R., Ferretti, J., Portnoy, D. and Rood, J. (2000). Gram-Positive Pathogens.** ASM Press. Washington, D.C.; 13-15:125-162.

10. **Flores, A. and Ferrieri, P. (1989). Molecular Species of R Protein Antigens Produced by Clinical Isolates of Group B Streptococci.** Journal of Clinical Microbiology; 27:1050-1054.

11. **Fluegge, K., Greiner, P. and Berner, R. (2003). Late Onset Group B Streptococcal Disease Manifested by Isolated Cervical Lymphadenitis.** Archives of Disease in Childhood; 88:1019–1020.

12. **Fluegge K., Supper S., Siedler, A. and Berner, R. (2005). Serotype Distribution of Invasive Group B Streptococcal Isolates in Infants: Results from a Nationwide Active Laboratory Surveillance Study over 2 Years in Germany.** *Clinical Infectious Diseases*; 40:760–763.
13. **Fry, R. (1938). Fatal Infections by Hemolytic Streptococcus of Group B.** *Lancet*; i:199-201.
14. **Garza, R. (2003). Bacterias Patógenas. Parte III.** Facultad de Química, Departamento de Biología, UNAM. México; 33-51.
15. **[Getahun, K.](#), [Kelay, B.](#), Bekana, M. and Lobago, F. (2008). Bovine Mastitis and Antibiotic Resistance Patterns in Selalle Smallholder Dairy Farms, Central Ethiopia.** *Tropical animal health and production*; 40:261-268.
16. **González, A., Ortiz, M. y Mota, R. (2002). Serotypes and Antimicrobial Susceptibility of Group B Streptococcus Isolated from Pregnant Women in Mexico.** *Revista Latinoamericana de Microbiología*; 44:133-136.
17. **Hood, M., Janney, A. and Dameron, G. (1961). Beta Hemolytic Streptococcus Group B Associated with Problems of the Perinatal Period.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology*; 82:809-818.
18. **Jennings, H., Katzenellenbogen, J., Lugowski, C. and Kasper, D. (1983). Structure of Native Polysaccharide Antigens of Type Ia and Type Ib Group B Streptococcus.** *Biological Chemistry*; 22:1258-1264.

19. **Jennings, H., Rosell, K., Katzenellenbogen, J. and Kasper, D. (1983). Structural Determination of the Capsular Polysaccharide Antigen of Type II Group B Streptococcus.** Journal of Biological Chemistry; 258:1793-1798.
20. [Kimura, K.](#), [Suzuki, S.](#), [Wachino, J.](#), [Kurokawa, H.](#), [Yamane, K.](#), [Shibata, N.](#), [Nagano, N.](#), [Kato, H.](#), [Shibayama, K.](#) and [Arakawa, Y.](#) (2008). **First Molecular Characterization of Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 10:1128-1135.
21. **Kogan, G., Brisson, J., Kasper, D., Von Hunolstein, C, Orefici, G. and Jennings, H. (1995). Structural Elucidation of the Novel Type VII group B Streptococcus Capsular Polysaccharide by High Resolution NMR Spectroscopy.** Carbohydrate Research; 277:1-9.
22. **Kogan, G., Uhrin, D., Brisson, J., Paoletti, L., Blodgett, A., Kasper, D., and Jennings, H. (1996). Structural and Immunochemical Characterization of the Type VIII Group B Streptococcus Capsular Polysaccharide.** Journal of Biological Chemistry; 271:8786-8790.
23. **Kogan, G., Uhrin, D., J., Paoletti, L., Blodgett, A., Kasper, D., Von Hunolstein, C, Orefici, G. and Jennings, H. (1994). Structure of the Type VI Group B Streptococcus Capsular Polysaccharide Determined by High Resolution NMR Spectroscopy.** Carbohydrate Research; 13:1071-1078.

24. **Kong, F., Gowan, S., Martin, D., James, G. and Gilbert, G. (2002). Serotype Identification of Group B Streptococci by PCR and Sequencing.** Journal of Clinical Microbiology; 40:216-226.
25. **[Kong, F.](#), [Lambertsen, L.](#), [Slotved, H.](#), [Ko, D.](#), [Wang, H.](#) and [Gilbert, G.](#) (2008). Use of Phenotypic and Molecular Serotype Identification Methods to Characterise Previously Non-Serotypeable Group B Streptococci (GBS). [Journal of Clinical Microbiology](#); 10:1128-1132.**
26. **Kong, F., Ma, L. and Gilbert, G. (2005). Simultaneous Detection and Serotype Identification of Streptococcus agalactiae Using Multiplex PCR and Reverse Line Blot Hybridization.** Journal of Medical Microbiology; 54:1133-1138.
27. **Lancefield, R. (1934). A Serological Differentiation of Specific Types of Bovine Hemolytic Streptococci (Group B).** Journal of Experimental Medicine; 59:441-458.
28. **Lancefield, R. (1938). Two Serological Types of Group B Hemolytic Streptococci with Related, but not Identical, Type-Specific Substances.** Journal of Experimental Medicine; 67:25-40.

29. **Lancefield, R. (1972). Cellular Antigens of Group B Streptococci. Streptococci and Streptococcal Diseases, Recognition, Understanding and Management.** Academic Press Inc. New York; 57-65.
30. **Lancefield, R. and Freimer, E. (1966). Type-Specific Polysaccharide Antigens of Group B Streptococci.** Journal of Hygiene Cambridge; 64:191-203.
31. **Lancefield, R., McCarty, M., and Everly, W. (1975). Multiple Mouse-Protective Antibodies Directed Against Group B Streptococci. Special Reference to Antibodies Effective Against Protein Antigens.** Journal of Experimental Medicine; 142:165-179.
32. **Lancefield, R. and Perlmann, G. (1952). Preparation and Properties of a Protein (R Antigen) Occurring in Streptococci of Group A, Type 28 and in Certain Streptococci of Other Serological Groups.** Journal of Experimental Medicine; 96:83-87.
33. **Lachenauer, C. and Madoff, L. (1996). A Protective Surface Protein from Type V Group B Streptococci Shares N-Terminal Sequence Homology with the Alpha C Protein.** Infection and Immunity; 64:4255-4260.
34. **[Larsen, J.](#) and [Sever, J.](#) (2008). Group B Streptococcus and Pregnancy: A Review.** American Journal of Obstetrics and Gynecology; 198:440-448.

35. **Maeland, J., Brakstad, O., Bevanger, L. and Krokstad, S. (2000).**
Distribution and Expression of bca, the Gene Encoding the C alpha Protein, by Streptococcus agalactiae. Journal of Medical Microbiology; 49: 193-198.
36. **Mandell, Douglas. (2000).** 5th ed. **Principles and Practice of Infectious Disease.** Churchill Livingstone; Chapter 190.
37. **Marques, M., Kasper, D., Pangburn, M. and Wessels, M. (1992).**
Prevention of C3 Deposition by Capsular Polysaccharide is a Virulence Mechanism of Type III Group B Streptococci. Infection and Immunity; 60:3986-3993.
38. **Martínez, M., Ovalle A., Durán, C., Reid, I., Urriola, G., Garay, B. y Cifuentes, M. (2004).** **Serotipos y Susceptibilidad Antimicrobiana de Streptococcus agalactiae.** Revista Médica Chilena; 132:549-555.
39. **Motlová, J. and Straková, L. (2004).** **Vaginal & Rectal Carriage of Streptococcus agalactiae in the Czech Republic: Incidence, Serotypes Distribution & Susceptibility to Antibiotics.** The Indian Journal of Medical Research; 119:84-87.
40. **Murray, P., Rosenthal, K., Kobayashi, G., and Pfaller, M. (2002).** 4^a ed. **Microbiología Médica.** Elsevier Science. Barcelona, España; 213, 221-224.

41. [Pannaraj, P.](#), [Kelly, J.](#), [Rench, M.](#), [Madoff, L.](#), [Edwards, M.](#) and [Baker, C.](#) (2008). Alpha C Protein-Specific Immunity in Humans with Group B Streptococcal Colonization and Invasive Disease. [Vaccine](#); 26:502-508.
42. **Patterson, M.** and **Batool, A.** (1976). **Group B Streptococci in Human Disease.** *Bacteriological Reviews*; 40:774-792.
43. **Persson, E.**, **Berg, S.**, **Bevanger, L.**, **Bergh, K.**, **Valsö-Lyng, R.**, and **Trollfors, B.** (2008). **Characterisation of Invasive Group B Streptococci Based on Investigation of Surface Proteins and Genes Encoding Surface Proteins.** *Clinical Microbiology and Infection*; 14: 66–73.
44. **Phares, C.**, [Lynfield, R.](#), [Farley, M.](#), [Mohle-Boetani, J.](#), [Harrison, L.](#), [Petit, S.](#), [Craig, A.](#), [Schaffner, W.](#), [Zansky, S.](#), [Gershman, K.](#), [Stefonek, K.](#), [Albanese, B.](#), [Zell, E.](#), [Schuchat, A.](#) and [Schrag, S.](#) (2008). **Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005.** *Journal of the American Medical Association*; 299:2056-2065.
45. **Podbielski, A.**, **Blankenstein, O.** and **Lutticken, R.** (1994). **Molecular Characterization of the cfb Gene Encoding Group Streptococcal CAMP-Factor.** *Medical Microbiology and Immunology*; 183:239-256.

46. **Puopolo, K., Madoff, L. and Eichenwald, E . (2007). Early-Onset Group B Streptococcal Disease in the Era of Maternal Screening.** *Pediatrics*; 115:1240-1246.
47. **Ramaswamy, S., Ferrieri, P., Flores, A. and Paoletti, C. (2006). Molecular Characterization of Nontypeable Group B Streptococcus.** *Journal of Clinical Microbiology*; 44: 2398–2403.
48. **Reyna, J. Ortiz, F., [Pérez, B.](#), [Navarro, S.](#), [Casanova, G.](#) y [García, L.](#) (2008). Quimioprofilaxis para Evitar la Colonización Materna por Estreptococo del Grupo B. Consecuencias de No Adoptar la Recomendación Internacional.** *Salud Pública de México*; 50:155-161.
49. **Russell, G., Gotschlich, E. and Blakje, M. (1984). A Surface Receptor Specific for Human IgA on Group B Streptococci Possessing the Ibc Antigens.** *Journal of Experimental Medicine*; 160:1467-1475.
50. **Salyers, A. and Whitt, D. (2002). 2nd ed. Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach.** ASM Press. Washington, D.C.; 236-237.
51. **[Savoia D.](#) and [Gottimer C.](#) (2008). Streptococcus agalactiae in Pregnant Women: Phenotypic and Genotypic Characters.** *Journal of Infection*; 56:120-125.

52. **Sellin, M., Olofsson C., Håkansson, S. and Norgren, M. (2000). Genotyping of the Capsule Gene Cluster (cps) in Nontypeable Group B Streptococci Reveals Two Major cps Allelic Variants of serotypes III and VII.** Journal of Clinical Microbiology; 38:3420-3428.
53. **Sendi, P., Johansson, L. and Norrby-Teglund, A. (2008). Invasive Group B Streptococcal Disease in Non-pregnant Adults. A Review with Emphasis on Skin and Soft-tissue Infections.** Infection; 36: 100–111.
54. **[Severi, E.](#), [Hood, D.](#) and Thomas, G. (2007). Sialic Acid Utilization by Bacterial Pathogens.** Microbiology; 153:2817-2822.
55. **Shyur, S., Raff, H., Bohnsack, J., Kelsey, D. and Hill, H. (1992). Comparison of the Opsonic and Complement Triggering Activity of the Human Monoclonal IgG1 and IgM Antibody Against Group B Streptococci.** Journal of Immunology; 148:1879-1884.
56. **Slotved, H., Kong, F., Lambertsen, L., Sauer, S. and Gilbert G. (2007). Serotype IX, a Proposed New Streptococcus agalactiae Serotype.** Journal of Clinical Microbiology; 45:2929-2936.
57. **Stalhammar, M., Stenberg, L. and Lindahl, G. (1993). Protein Rib: A Novel Group Streptococcal Cell Surface Protein that Confers Protective**

Immunity and is Expressed by Most Strains Causing Invasive Infections.

Journal of Experimental Medicine; 177:1593-1603.

58. **Sutcliffe, I., Black, G. and Harrington, D. (2008). Bioinformatic Insights into the Biosynthesis of the Group B Carbohydrate in Streptococcus agalactiae.** Microbiology; 154:1354-63.
59. **Sutich, E., Notario, R., Montedoro, H. y Salgado, C. (2005). Streptococcus agalactiae: Colonización en Embarazadas en un Centro Asistencial de Rosario.** Revista Médica de Rosario; 71:64-67.
60. **Wessels, M., Benedí, W., Jennings, H., Michon, F., DiFabio, J. and Kasper, D. (1989). Isolation and Characterization of Type IV Group B Streptococcus Capsular Polysaccharide.** Infection and Immunity; 57:1089-1094.
61. **Wessels, M., DiFabio, J., Benedí, V., Kasper, D., Michon, F., Brisson, J., Jelinkova, J. and Jennings, H. (1991). Structural Determination and Immunochemical Characterization of the type V Group B Streptococcus Capsular Polysaccharide.** Journal of Biological Chemistry; 266:6714-6719.
62. **Wessels, M., Pozsgay, V., Kasper, D., and Jennings, H. (1987). Structure and Immunochemistry of an Oligosaccharide Repeating Unit of the Capsular Polysaccharide of Type III Group B Streptococcus. A Revised**

Structure for the Type II group B Streptococcal Polysaccharide Antigen.

Journal of Biological Chemistry; 262:8262-8267.

63. **Wilkinson, H. (1972). Comparison of Streptococcal R Antigens.** Applied Microbiology; 24:669-670.

64. **Wilkinson, H and Eagon , R. (1971). Type-Specific Antigens of Group B Type Ic Streptococci.** Infection and Immunity; 4:596-604.

65. **Yim, H. (1998). Regulation of Capsular Polysaccharide Production in Group B Streptococcus.** ASM Conference on Streptococcal Genetics, Vichy, France. American Society for Microbiology; 27:36.