



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**TIPIFICACIÓN CAPSULAR DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*
PROVENIENTES DE AISLAMIENTOS VAGINALES DEL HOSPITAL
GENERAL "DR. GONZALO CASTAÑEDA ESCOBAR" DEL ISSSTE**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PRESENTA

NAYELI MONDRAGÓN CONTRERAS



Ciudad Universitaria, CDMX

2023



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: **Profesor:** BONILLA ESPINOSA EDUARDO

VOCAL: **Profesor:** HERNÁNDEZ GÓMEZ LUCIANO

SECRETARIO: **Profesor:** LUIS MANUEL PEREA MEJÍA

SUPLENTE 1: **Profesor:** COELLO COUTIÑO MARTHA PATRICIA

SUPLENTE 2: **Profesor:** MENA ZEPEDA MARGARITA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR. 3er PISO TORRE DE INVESTIGACIÓN.
DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA, FACULTAD DE MEDICINA. CIUDAD
UNIVERSITARIA. UNAM. CON EL APOYO DE LOS PROYECTOS DGAPA-PAPIIT
IN221511 Y FM 066-2012**

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Luis Manuel Perea Mejía

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Alma Edna Inzunza Montiel

SUSTENTANTE:

Nayeli Mondragón Contreras

CONTENIDO

1.RESUMEN.....	I
2.INDICE DE FIGURAS	III
3.ÍNDICE DE TABLAS	V
4.LISTA DE ABREVIATURAS	VI
4. INTRODUCCIÓN	1
4.1 Características del género <i>Streptococcus</i>	1
4.2 Clasificación de <i>Streptococcus</i>	2
4.3 <i>Streptococcus agalactiae</i>	6
4.4 Identificación de <i>Streptococcus agalactiae</i>	6
4.4.1 Métodos	6
4.4.1.1 Determinación del carbohidrato “C” (Sustancia específica de grupo)	6
4.4.1.2 Prueba de hidrólisis de hipurato de sodio	8
4.4.1.3 Prueba CAMP	9
4.4.1.4 Identificación en medios especiales	10
4.4.1.5 Medio Granada (GM).....	10
4.4.1.6 ChromID Strepto B (STRB)	10
4.4.1.7. Tipificación capsular	11
4.5 Factores de virulencia de <i>Streptococcus agalactiae</i>	15
4.6 Importancia Clínica.....	17
4.6.1 Colonización e infección en mujeres embarazadas	17
4.6.2 Infección en recién nacidos	17
4.6.3 Infecciones en adultos	20
4.6 Epidemiología	21
4.7.1 Diagnóstico.....	23
4.7.2 Tratamiento y Prevención	24
4.7.3 Vacunación.....	25
5. HIPÓTESIS	28
6. OBJETIVO GENERAL.....	28
6.1 Objetivos particulares	28
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
7.1 Obtención y manejo de las cepas estudiadas	28
7.2 Identificación de las cepas estudiadas	29
7.3 Prueba de CAMP	29
7.4 Extracción de DNA	30

7.5 Tipificación molecular por PCR	31
8. RESULTADOS.....	36
8.1 Identificación de las cepas de <i>S. agalactiae</i>	36
8.2 Extracción de ADN	36
8.3 Tipificación capsular de <i>S. agalactiae</i>	37
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	47
10. CONCLUSIONES	51
11.REFERENCIAS.....	52
ANEXO I. Resultado de la tipificación de las cepas analizadas	58

1. RESUMEN

Streptococcus agalactiae, también conocido como Estreptococo beta-hemolítico de grupo B (EGB), es una bacteria gram positiva que forma parte de la microbiota del tracto gastrointestinal, urogenital y respiratorio afectando a mujeres embarazadas, neonatos y adultos mayores. En las mujeres, EGB se puede encontrar colonizando de manera asintomática la vagina (más frecuente), recto, cérvix y faringe, desarrollando infecciones oportunistas como: infecciones de vías urinarias, corioamnionitis, endometritis puerperal e infección de herida quirúrgica tras cesárea.

En la infección neonatal la principal vía de transmisión de EGB es a través del canal de parto. Entre los factores asociados a ésta se encuentran: colonización vaginal de la madre, rotura prolongada de membranas, fiebre intraparto, producto prematuro y bacteriuria por EGB en el embarazo. La enfermedad infecciosa en el neonato puede ser de inicio temprano (EOD) cuando se presenta durante los primeros 7 días con neumonía, shock séptico y muerte neonatal, o de inicio tardío (LOD) cuando se presenta entre los 7 y 26 días relacionándose con complicaciones obstétricas. De tal modo que la colonización vaginal por *S. agalactiae* representa un factor de riesgo de infección tanto para las gestantes como para los neonatos.

La cápsula de *S. agalactiae* representa el principal factor de virulencia, la estructura antigénica de polisacárido permite clasificarlo en 10 serotipos capsulares (**Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX**). Actualmente la tipificación capsular se realiza por técnicas moleculares como la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se ha observado que la distribución y frecuencia de los tipos capsulares varía entre las distintas áreas geográficas, origen étnico de los pacientes, edad, y fuente de las cepas. A nivel global en aislamientos de EGB colonizadores, el tipo **III** es predominante con el 25%, al igual que en aislamientos invasivos pero con un 48.9%. En los neonatos con EOD, los tipos capsulares **III** y **Ia** son los más comunes, mientras que los neonatos con LOD, se han reportado los tipos **II** y **Ia** principalmente. El tipo capsular **III** se reconoce como uno de los más agresivos porque se ha asociado a enfermedad neonatal severa. La identificación del tipo capsular de *S. agalactiae* ayuda a conocer su distribución en la colonización vaginal y el riesgo para el desarrollo de infecciones en el neonato.

El objetivo principal del trabajo es determinar la frecuencia de los tipos capsulares identificados en cepas de *S. agalactiae* provenientes de aislamientos vaginales en un periodo de 5 años.

Se analizaron 372 cepas de *S. agalactiae* provenientes de aislamientos vaginales del Hospital General “Dr. Gonzalo Castañeda Escobar” del ISSSTE del periodo 2007 al 2011. Las cepas conservadas en caldo BHI con glicerol al 15% a -72°C se sembrarán en agar sangre para evaluar su viabilidad, pureza y proceder al aislamiento del DNA para realizar la tipificación molecular. Para la determinación del tipo capsular se utilizó la técnica de la PCR, identificando el gen asociado con el tipo capsular de la bacteria. Se utilizaron técnicas de PCR múltiple, dual e individual previamente estandarizadas en el laboratorio. Nuestros resultados mostraron que la distribución de los tipos capsulares en la población de estudio es similar a lo reportado a nivel mundial. Los tipos capsulares más frecuentes fueron **Ia** y **V** representando el 33% cada uno, seguido de **III** y **Ib** con 13.7% y 11.3% respectivamente. En el grupo de pacientes de 15 a 30 años, el tipo **Ia** representó el 40% de los aislamientos y el tipo **V** no fue identificado, mientras que en pacientes mayores de 60 años el tipo **V** representó el 43% y **Ia** solo el 12.5%. Conocer la distribución capsular es importante para entender la frecuencia de los tipos capsulares asociados a infecciones severas y contribuir en el desarrollo de nuevas y potenciales estrategias de vacunación dirigidas contra diferentes tipos capsulares.

2. INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tinción de Gram de estreptococos del grupo B.	1
Figura 2. Cultivos en agar sangre de diferentes especies de estreptococos	3
Figura 3. Reacción de coagulación en látex positiva para <i>S. agalactiae</i> (Grupo B).....	7
Figura 4. A) Detección de benzoato. B) Detección de glicina.	8
Figura 5. Prueba de CAMP.	9
Figura 6. Medios cromogénicos en presencia de <i>S. agalactiae</i>	11
Figura 7. Modelos de silla de los polisacáridos capsulares la, lb, II, III y IV	13
Figura 8. Modelos de silla de los polisacáridos capsulares V, VI, VII, VIII y IX	132
Figura 9. Régimen de antibióticos recomendados para la profilaxis intraparto de <i>Streptococcus agalactiae</i> adaptado a las guías de CDC 2010.	25
Figura 10. Vacunas en investigación	13
Figura 11. Hospital general “Dr. Gonzalo Castañeda Escobar” del ISSSTE	28
Figura 12. Diagrama de temperaturas utilizadas en la PCR	32
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1%	36
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1.7% de los amplificados de PCR, <i>cps III</i> y <i>cps V</i> (PCR múltiple).....	37
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1.7% de los amplificados de PCR <i>cps Ia</i> y <i>cps Ib</i> (PCR dual).	38
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1.7% de los amplificados de PCR <i>cps II</i> (PCR individual).	39
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.7% de los amplificados de PCR <i>cps IV</i> (PCR individual).	40
Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.7% de los productos de PCR de <i>cps VI</i> (PCR individual).	40
Figura 19. Distribución de las 372 cepas pertenecientes a aislamientos vaginales en un periodo de 5 años (2007-2011)	41
Figura 20. Distribución de los tipos capsulares de <i>Streptococcus agalactiae</i> (2007-2011)	42
Figura 21. Distribución de los tipos capsulares de <i>Streptococcus agalactiae</i> en el año 2007	42
Figura 22. Distribución de los tipos capsulares de <i>Streptococcus agalactiae</i> en el año 2008	43

Figura 23. Distribución de los tipos capsulares de <i>Streptococcus agalactiae</i> en el año 2009.....	44
Figura 24. Distribución de los tipos capsulares de <i>Streptococcus agalactiae</i> en el año 2010.....	44
Figura 25. Distribución de los tipos capsulares de <i>Streptococcus agalactiae</i> en el año 2011.....	45
Figura 26. Distribución de tipos capsulares de <i>S. agalactiae</i> por grupos de edad.....	46
Figura 27. Comparación de los tipos capsulares de cepas de <i>S. agalactiae</i> provenientes de aislamientos vaginales del año 2010 del Hospital de Gineco Obstetricia No.4 “Luis Castelazo Ayala” y Hospital General “Dr. Gonzalo Castañeda Escobar” del ISSSTE.	49

3. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los estreptococos de importancia médica	4
Tabla 2. Aminoglúcido del carbohidrato específico de los principales grupos de Lancefield.....	5
Tabla 3. Mecanismos de virulencia de estreptococo grupo B implicados en la infección neonatal.	16
Tabla 4. Características distintivas de las enfermedades causadas por Estreptococo de grupo B en pacientes pediátricos.....	19
Tabla 5. Distribución geográfica de los tipos capsulares de <i>S. agalactiae</i> asociados a colonización.....	22
Tabla 6. Estado de desarrollo de vacunas candidatas actuales contra EGB	27
Tabla 7. Controles utilizados para Prueba CAMP	29
Tabla 8. Temperaturas de alineamiento para cada gen amplificado.	32
Tabla 9. Composición de la mezcla para PCR múltiple de los genes <i>cfb</i> , <i>cpsIII</i> y <i>cpsV</i> , con volumen final de 30µL	33
Tabla 10. Composición de la mezcla para PCR dual de los genes <i>cpsIa</i> y <i>cpsIb</i> con un volumen final de 15µL.....	33
Tabla 11. Composición de la mezcla para PCR individual de los genes <i>cpsII</i> , <i>cpsIV</i> , <i>cpsVI</i> con un volumen final de 15 µL	33
Tabla 12. Secuencia nucleotídica de los primers utilizados.	34
Tabla 13. Tamaño de los productos de PCR amplificados.....	35
Tabla 14. Distribución de los tipos capsulares (2007-2011).....	41
Tabla 15. Variación porcentual de los tipos capsulares de <i>S. agalactiae</i> (2007-2011)....	48

4. LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
AL	Buffer de Lisis
AS	Agar Sangre
AW1	Buffer de Lavado 1
AW2	Buffer de Lavado 2
BibA	Adhesina BibA, de unión a C3bp componente de la vía clásica del complemento
BHI	Caldo Infusión Cerebro Corazón
C4bp	Proteína de unión a C4b, es un complejo proteico implicado en el sistema complemento, actuando como inhibidor
C5a	Molécula quimioatrayente del complemento
CAMP	Referente a la proteína o factor de CAMP, por las iniciales de los apellidos de sus autores Christie, Atkins y Munch- Petersen
CDC	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
CE	Caldo de enriquecimiento
Cfb	Gen del factor de CAMP
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
Cps	Polisacárido capsular
CO₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotidos trifosfatos
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGB	Estreptococo del grupo B
EOD	Enfermedad de comienzo temprano por sus siglas en inglés Early onset disease
FbsA	Proteína adhesina FbsA, de unión a fibrinógeno
FbsB	Proteína adhesina FbsB, de unión a fibrinógeno
GADPH	Enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GM	Medio Granada
GSK	GlaxoSmithKline
HCl	Ácido clorhídrico
IL-1	Interleucina 1
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
IV	Intravenosa
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
Lmb	Proteína adhesina Lmb, de unión a laminina
MEC	Matriz extracelular
mm	Milímetro
ml	Mililitro
mg	miligramo
LOD	Enfermedad de comienzo tardío por sus siglas en inglés Late onset disease

MgCl₂	Cloruro de Magnesio
NaCl	Cloruro de Sodio
NH₃	Amoniaco
NT	No tipificables
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAI	Profilaxis Antibiótica Intraparto
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDVAC	Comité asesor de desarrollo de productos para vacunas
PYR	Pirolidolil-aril-amidasa
Rpm	Revoluciones por minuto
<i>ScpB</i>	Gen que codifica para la proteína de superficie ScpB
Spb1	Proteína invasina Spb1
Srr-1	Proteína adhesina Srr-1, de unión a queratina 4 humana
TAE	Amortiguador Tris- Ácido Acético- EDTA
TBE	Amortiguador de Tris- Boratos- EDTA
TH	Todd- Hewitt
UV	Luz Ultravioleta
V	Volt
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
μL	Microlitro
%	Porcentaje

4. INTRODUCCIÓN

4.1 Características del género *Streptococcus*

El nombre del género *Streptococcus* proviene del latín *Strep*=cadena y *coccus*= cocos y comprende a un grupo heterólogo de bacterias grampositivas, que suelen estar agrupadas en cadenas, donde su longitud puede variar desde un solo par hasta de cerca de 30 células (Figura 1.) según la especie y sus condiciones de crecimiento. [1, 2]



Figura 1. Tinción de Gram de estreptococos del grupo B que muestra cocos gram positivos en pares y cadenas.

(Foto tomada por Nayeli Mondragón Contreras).

La mayoría de las especies pertenecientes a este género son anaerobios facultativos y algunos crecen únicamente en una atmósfera enriquecida con dióxido de carbono (crecimiento capnofílico). Sus exigencias nutricionales son complejas y su aislamiento requiere el uso de medios enriquecidos con sangre o suero. [2, 3]

Varios estreptococos tienen importancia médica como parte de la microbiota en animales y humanos; algunos pueden causar un amplio espectro de enfermedades desde subagudas, a agudas o hasta crónicas. Los estreptococos de importancia médica relacionados con enfermedades humanas son: *S. pyogenes*, causante de enfermedades supurativas como

faringitis, impétigo, erisipela, celulitis, fascitis necrosante, bacteremia y choque tóxico y no supurativas como la glomerulonefritis y fiebre reumática; el segundo microorganismo importante es *S. agalactiae*, causa más frecuente de sepsis en neonatos y por último; *S. pneumoniae*, llamado también neumococo, es la causa principal de neumonía y meningitis en personas ≤ 5 y ≥ 60 años de edad. [1, 2]

Los estreptococos comprenden un grupo extenso y heterogéneo de especies donde ningún sistema es suficiente para clasificarlos a todos. No obstante, es imprescindible comprender la clasificación de las principales especies de importancia médica. [4]

4.2 Clasificación de *Streptococcus*

La identificación y clasificación de los estreptococos se realiza mediante 3 sistemas diferentes parcialmente coincidentes: 1) morfología de la colonia y reacciones hemolíticas en agar sangre; 2) especificidad serológica de sustancias específicas o estructuras antigénicas de pared celular y cápsula 3) reacciones bioquímicas. Recientemente se ha utilizado la biología molecular para estudiar a los estreptococos. La combinación de los métodos antes mencionados ha permitido clasificar a los estreptococos con fines clínicos y epidemiológicos y en la medida que ha evolucionado el conocimiento, se han introducido nuevos métodos, lo que ha dado como resultado la descripción de varios sistemas de clasificación. [4]

1) Hemólisis

Una de las características relevantes utilizada para la clasificación de los estreptococos se basa en la reacción de hemólisis observada alrededor de las colonias cuando estos son crecidos en placas de agar sangre (Figura 2). Esta clasificación fue propuesta por Brown en 1919 y establece la denominación “ α -hemólisis” y “ β -hemólisis”. [1]

Por lo tanto se pueden distinguir tres comportamientos hemolíticos:

- *Alfa-hemólisis* (α): Es un tipo de hemólisis incompleta en la cual los glóbulos rojos no son lisados en su totalidad, pero su membrana sufre suficiente daño como para permitir la liberación de hemoglobina. Las colonias α -hemolíticas se observan rodeadas por un halo, cuyo color varía en diferentes tonos de verde, debido a que la hemoglobina liberada del eritrocito es oxidada a compuestos de biliverdina de color verde.

- *Beta-hemólisis* (β): Es un tipo de hemólisis completa, donde las colonias aparecen rodeadas por un halo transparente correspondiente a la zona donde se ha producido una lisis de los eritrocitos.
- *No hemólisis*: La presentan colonias que no producen ningún tipo de hemólisis o alteración sobre los glóbulos rojos. Inicialmente se conocida como gamma-hemólisis (γ). [5]

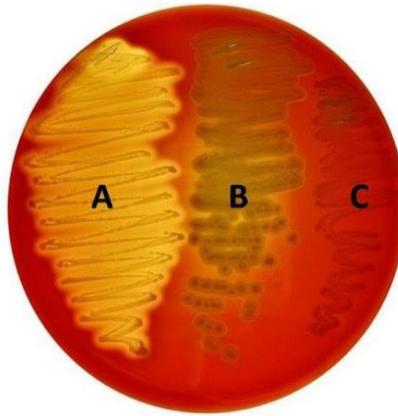


Figura 2. Patrones de hemólisis sobre agar sangre suplementado al 5% con sangre de carnero. A) Crecimiento de *S. pyogenes* que evidencia la hemólisis tipo β . B) Crecimiento de *S. bovis* con hemólisis tipo α . C) Crecimiento de *E. faecalis*, cepa no hemolítica. Pearson Education, I.N.C. 2006

En la tabla 1, se muestran los patrones de hemólisis de los estreptococos que tienen importancia médica en el ser humano. Se utiliza la clasificación de los patrones hemolíticos con los estreptococos y no con otras bacterias que producen enfermedad y que suelen producir diversas hemolisinas. [4]

2) Sustancia específica de grupo (Clasificación de Lancefield)

Rebecca Lancefield desarrollo en 1933 el sistema de clasificación serológica para diferenciar las cepas β - hemolíticas. El sistema Lancefield se restringe en la actualidad a un número reducido de especies de estreptococos (los pertenecientes a los grupos A, B, C, D, F y G) dada su importancia a nivel clínico, con base a las diferencias antigénicas en los polisacáridos C de los hidratos de carbono de la pared celular y donde la especificidad de cada grupo está determinada por un aminoglúcido. (Tabla 2) [3, 4]

Tabla 1. Características de los estreptococos de importancia médica. Tomada de Carrol, K (2017) [4]

Nombre	Sustancia específica de grupo	Hemólisis	Hábitat	Criterios importantes de laboratorio	Enfermedades frecuentes relevantes
<i>Streptococcus pyogenes</i>	A	β	Faringe, piel	Colonias grandes (>0.5 mm), positividad en la prueba con PYR, inhibido por bacitracina	Faringitis, impétigo, fiebre reumática, glomerulonefritis, choque tóxico
<i>Streptococcus agalactiae</i>	B	β	Aparato genital femenino, tubo digestivo bajo	Hidrólisis de hipurato, CAMP positivo	Sepsis neonatal y meningitis, bacteremia en adultos
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> , Subespecies <i>equisimilis</i>	C, G	β (infecciones humanas), α	Faringe	Colonias grandes (> 0.5 mm)	Faringitis, infecciones piógenas similares a estreptococos del grupo A
Grupo de <i>Streptococcus bovis</i>	D	Ninguna	Colon y árbol biliar	Cultivo en presencia de bilis, hidroliza esculina, ningún desarrollo en NaCl al 6.5%, degrada almidón	Endocarditis, se aísla con frecuencia en hemocultivo en pacientes con cáncer de colon, enfermedades biliares
Grupo de <i>Streptococcus anginosus</i> (<i>S.anginosus</i> , <i>S.intermedius</i> , <i>S.constellatus</i> , grupo de <i>S.milleri</i>)	F(A, C, G) y no tipificable	α , β , ninguna	Faringe, colon, aparato genital femenino	Variantes de colonia pequeña (<0.5 mm) de especies hemolíticas β . Los microorganismos del grupo A son resistentes a la bacitracina y son PYR negativos. Tipos de fermentación de carbohidratos	Infecciones piógenas, incluidos abscesos cerebrales
Estreptococos viridans (muchas especies)	Por lo general no tipificable o no tipificado	α , ninguna	Boca, faringe, colon, aparato genital femenino	Resistente a optoquina. Colonias insolubles en bilis, tipo de fermentación de carbohidratos	Caries dental (<i>S.mutans</i>), endocarditis, abscesos (con muchas otras especies bacterianas), algunas especies como <i>Streptococcus mitis</i> , tienen un alto grado de resistencia a la penicilina
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ninguna	α	Nasofaringe	Susceptibilidad a la optoquina. Colonias solubles en bilis, reacción de tumefacción capsular positiva.	Neumonía, meningitis, endocarditis, otitis media y sinusitis

Tabla 2. Aminoglúcido del carbohidrato específico de los principales grupos de Lancefield.

Tomada y modificada de Carrol, K.C (2017) & Curtis, S.N (1964) [4] [6]

Grupo	Aminoglúcido
A	Ramnosa-N-acetilglucosamina
B	Ramnosa-glucosamina
C	Ramnosa-N-acetilgalactosamina
D	Ácido teicoico de glicerol
F	Glucopiranosil-N-acetilgalactosamina
G	Ramnosa-N-acetilgalactosamina y galactosa

La mayoría de los estreptococos α - hemolíticos y no hemolíticos carece de antígenos de pared celular específicos de cada grupo. Estos microorganismos se deben identificar a través de pruebas bioquímicas. [7]

3) Reacciones bioquímicas

Las pruebas bioquímicas comprenden reacciones de fermentación de carbohidratos, pruebas para determinar la producción de enzimas y pruebas de susceptibilidad o resistencia a determinados compuestos químicos. [1]

Las pruebas bioquímicas se utilizan para la identificación de especies de estreptococos después del desarrollo de la colonia y de la observación de sus características hemolíticas (Tabla 1.) y se utilizan para especies que por lo general no reaccionan con las preparaciones de anticuerpo frecuentemente utilizadas para las sustancias específicas de los grupos, de los grupos A, B, C, D, F y G. [4]

Para propósitos epidemiológicos y de investigación, los estreptococos de importancia médica se subclasifican en serotipos a nivel de especie. Algunos cuadros clínicos son asociados con serotipos específicos. El fundamento de la tipificación serológica está basada en variaciones antigénicas que muestran estructuras superficiales importantes para la virulencia de las bacterias, que en el caso *S. pyogenes* está en función de la variación de aminoácidos de la proteína M y para *S.agalactiae* y *S.pneumoniae* depende de la composición de azúcares de la cápsula. [4]

4.3 *Streptococcus agalactiae*

S. agalactiae, Estreptococo del Grupo B (EGB), es una bacteria gram positiva, catalasa negativa, anaerobia facultativa, de forma esférica u ovoide, que tiende a formar cadenas por su forma de división celular. Crece en medios enriquecidos como agar sangre de carnero al 5% y forma colonias que varían de color gris a blanquecino, usualmente brillantes y un poco más grandes que las colonias de otros grupos de estreptococos β -hemolíticos. La β -hemólisis es menos intensa que la producida por las cepas de *S.pyogenes* (estreptococo del grupo A), aunque también existen cepas no hemolíticas. [8]

EGB forma parte de la microbiota vaginal, así como de la porción baja del tubo digestivo en un 5-25% de las mujeres. La infección estreptocócica del grupo B afecta principalmente a recién nacidos durante el primer mes de vida y puede presentarse como septicemia fulminante, meningitis o síndrome de dificultad respiratoria. Las infecciones por *S. agalactiae* están aumentando en personas adultas (ancianos e inmunosuprimidos) y en mujeres no embarazadas ya que presentan diferentes factores predisponentes. [4]

4.4 Identificación de *Streptococcus agalactiae*

Las pruebas para la identificación de *S. agalactiae* son: El desarrollo de colonias mucoides grandes con bordes definidos en medios enriquecidos, acompañadas de una β -hemólisis en agar sangre de carnero que en algunos casos puede ser débil o no producirse; la observación al microscopio de cocos gram positivos agrupados en pares o en cadenas; prueba positiva del factor de CAMP, hidrólisis de hipurato de sodio, la presencia de pigmento carotenoide y/o la detección del carbohidrato específico del grupo de acuerdo a la clasificación de Lancefield y prueba negativa de catalasa, bilis esculina y resistencia a la Bacitracina. [7]

4.4.1 Métodos

4.4.1.1 Determinación del carbohidrato “C” (Sustancia específica de grupo)

Los estreptococos se agrupan serológicamente sobre las diferencias antigénicas expresadas en el “Carbohidrato C” de grupo localizado en la pared celular, descrita por Lancefield. Actualmente de manera comercial se cuenta con reactivos que permiten la serotipificación, mediante una reacción de coagulación en látex. Para esta técnica se utilizan anticuerpos específicos que reaccionan (aglutinan) con el carbohidrato específico de los principales grupos

de estreptococos de interés clínico, como lo son el A, B, C, D, F y G (Figura 3). El carbohidrato del grupo B es el antígeno común en todas las cepas de *S. agalactiae* y está compuesto principalmente de ramnosa-glucosamina. [9]

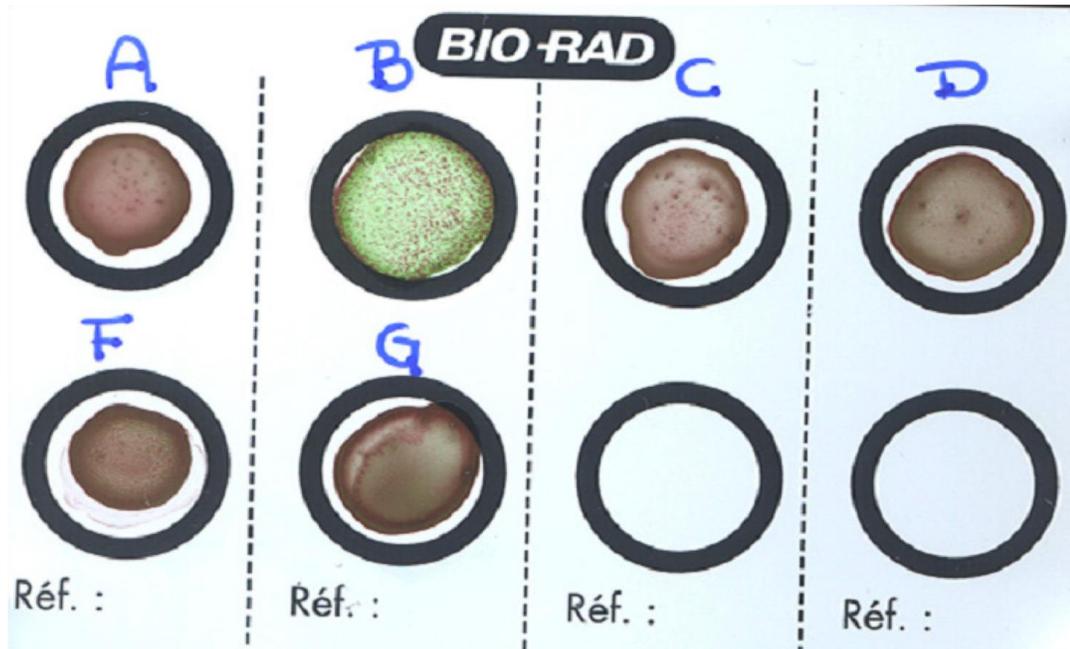


Figura 3. Reacción de coagulación en látex positiva para *S. agalactiae* (Grupo B), con el kit comercial Pastorex® Strep (BIO-RAD®). La reacción positiva se evidencia por la observación de aglutinados rojos sobre un fondo verde. (Foto original tomada por M. en C. Alma Edna Inzunza Montiel, Facultad de Medicina, UNAM)

4.4.1.2 Prueba de hidrólisis de hipurato de sodio

Los estreptococos del grupo B contienen la enzima hipuricasa capaz de hidrolizar el ácido hipúrico. Otros estreptococos β -hemolíticos carecen de esta enzima, siendo por lo tanto una prueba específica para esta especie. [3]

Principio

La enzima hipuricasa, producida por los estreptococos del grupo B, provoca la hidrólisis del hipurato de sodio, con la formación de benzoato de sodio y glicina. [3]

La hidrólisis del ácido hipúrico se puede detectar mediante 2 métodos: (Figura 4)

1. *Detección de benzoato usando cloruro férrico al 7%.*
2. *Detección de glicina usando ninhidrina*

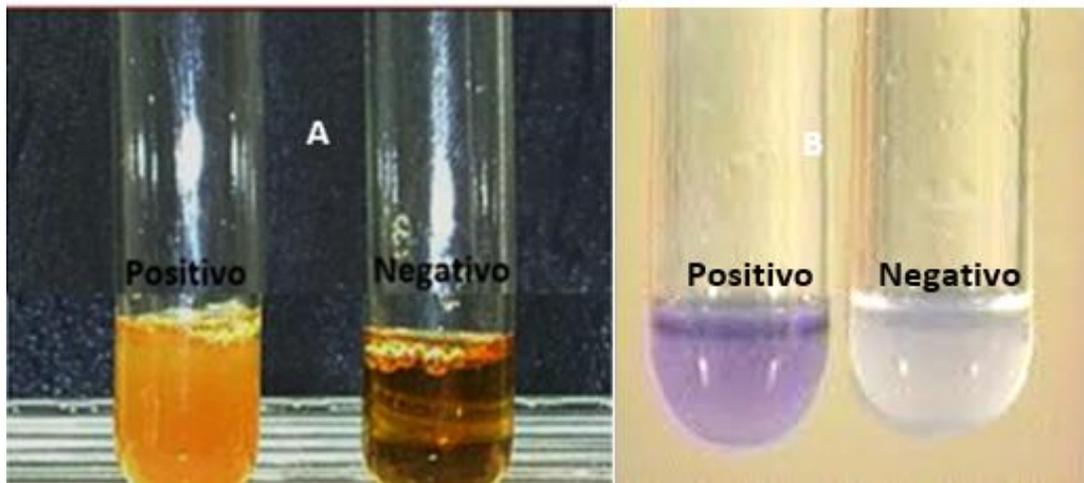


Figura 4. A) Detección de benzoato. Positivo: Si el precipitado persiste más de 10 min, eso significa que se ha formado el benzoato de sodio, indicando hidrólisis y una prueba positiva. Negativo: Si no hay hidrólisis del ácido hipúrico, al añadir el cloruro férrico, se formará un precipitado, pero desaparecerá a los 10 min. **B)** Detección de glicina. [14]. Prueba positiva: Cambio de color a púrpura cuando la glicina originada reacciona con la ninhidrina. Prueba negativa: No hay cambio de color. Tomada de Procop, G. W. (2017) [3]

4.4.1.3 Prueba CAMP

Para la identificación de *S. agalactiae* se ha simplificado con la implementación de la prueba de CAMP que es fácil de realizar. El fenómeno CAMP fue descrito por primera vez en 1944 por Christie, Atkins y Munch-Peterson, cuya contribución se reconoce con las siglas "CAMP". [3]

Principio

Esta prueba se basa en la observación de la actividad hemolítica de *S. agalactiae*, producida por el factor de CAMP, una proteína termoestable y extracelular que sensibiliza a los eritrocitos haciéndolos más susceptibles a la acción de la β -lisina de *S. aureus*. [3]

La prueba es positiva cuando se observa una mayor hemólisis en forma de punta de flecha (Figura 5) en la zona donde se aproximan las líneas de crecimiento bacteriano (*S. aureus* y *S. agalactiae*) que se encuentran en posición perpendicular. [3, 15]

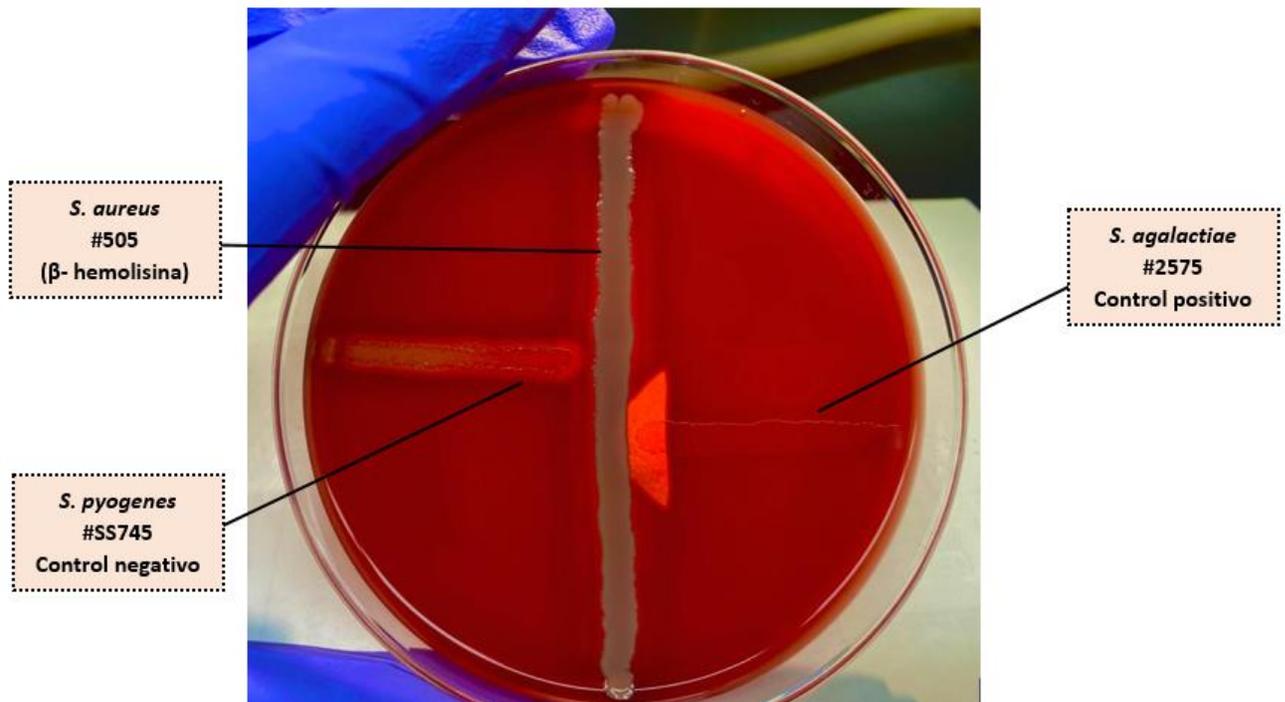


Figura 5. Prueba de CAMP. Incremento de la hemólisis con la forma característica de punta de flecha, en donde se presenta la difusión del factor de CAMP por *S. agalactiae* y la β -lisina de *S. aureus*. (Foto tomada por Nayeli Mondragón Contreras)

4.4.1.4 Identificación en medios especiales

Los CDC y la Sociedad Americana de Microbiología recomiendan que las muestras de exudado vaginal para la búsqueda de *S. agalactiae* se incuben en caldo de enriquecimiento (CE) Todd Hewitt (TH) con gentamicina+ nalidíxico o colistina + nalidíxico y se cultiven posteriormente en agar sangre. [16]

Desde hace algunos años se ha generalizado el uso de Medio Granada (GM) y otros medios cromogénicos, que permiten una fácil identificación de los estreptococos del grupo B y parecen tener una sensibilidad mayor o similar al uso de CE-TH y subcultivo en agar sangre. [17]

4.4.1.5 Medio Granada (GM)

Los estreptococos del grupo B producen un pigmento carotenoide naranja-rojizo en ciertos medios de cultivo. Esta propiedad ha sido explotada para su identificación. De la Rosa y colaboradores propusieron un medio denominado “Medio Granada” que contiene peptona proteosa, almidón soluble, piruvato y agar como medio basal, con metotrexato de sodio como reforzador del pigmento y colistina como agente selectivo. [3, 17]

Cuando se sembraron muestras de exudado vaginal en GM y se incubaron en condiciones anaerobias (colocación de un cubreobjetos sobre la superficie de la placa) durante 18 h, se detectaron 95% de estreptococos del grupo B por el crecimiento de colonias naranjas-rojizas (Figura 6) y un 98% en tubos profundos de agar después de 12 h de incubación, lo que indica que el medio granada es de utilidad para la búsqueda de *S. agalactiae* en muestras de exudado vaginal. [3, 18]

4.4.1.6 ChromID Strepto B (STRB)

El agar ChromID Strepto B, es un medio selectivo y diferencial recientemente desarrollado para la identificación de *S. agalactiae*. STRB contiene un sustrato cromogénico que, en presencia de EGB en crecimiento activo, genera colonias de color rosa a rojo (Figura 6) que se identifican fácilmente durante la inspección de rutina. La ventaja de este medio es la fácil identificación visual del EGB en comparación con el agar sangre, incluso cuando la muestra contiene una baja concentración de este microorganismo o cuando está mezclado con otras bacterias.

Las bacterias que no sean *S. agalactiae* se muestran de colores diferentes como azul, violeta o incoloras. Otro beneficio es que las placas STRB se incuban en aerobiosis, mientras que las placas de agar sangre necesitan de un 5 % de CO₂. [19, 20]

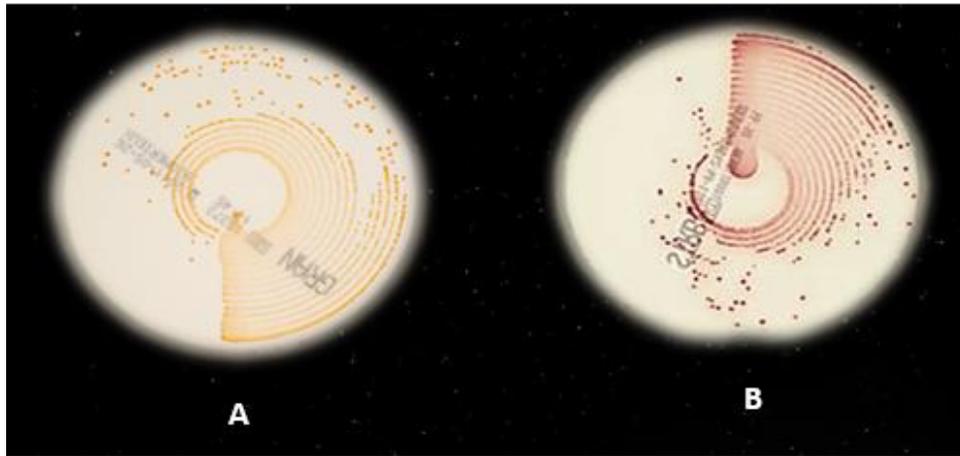


Figura 6. Medios cromogénicos en presencia de *S. agalactiae*. A) Medio Granada (Colonias naranjas). B) ChromID Strepto B (Colonias rojas). Tomada de Biomerieux, *S. agalactiae* [21, 22]

4.4.1.7. Tipificación capsular

S. agalactiae es una bacteria que posee una gran variedad de factores de virulencia que pueden causar enfermedades, entre ellos el polisacárido capsular (Cps). El Cps presenta diferencias químicas y antigénicas que permiten su clasificación en 10 tipos capsulares (**Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX**). [10]

Los polisacáridos específicos de serotipo de EGB se componen de tres o cuatro de los siguientes azúcares: glucosa, galactosa, N- acetilglucosamina, ramnosa y ácido siálico, donde los modelos de silla (Figura 7 y 8) indican la heterogenicidad entre los CPS de *S. agalactiae*.

Actualmente existen diferentes formas de llevar a cabo la tipificación capsular, la tradicional es mediante técnicas serológicas como la aglutinación en látex, que utiliza anticuerpos policlonales específicos para reconocer los tipos capsulares. El kit está disponible comercialmente, se considera confiable y es fácil de realizar, pero algunas cepas no se logran tipificar y se reportan como NT (no tipificables). Esta prueba se realiza mezclando 10µL de suspensión en látex (reactivos Ia, Ib y II-IX; Kit StrepB-látex) y 10µL de cultivo de EGB en caldo TH (Todd-Hewitt)

en una placa de vidrio, donde esta placa se agita para observar la aglutinación, el resultado se debe leer en los primeros 15s, pasado ese tiempo se pueden presentar falsos positivos. [11]

Otra forma de llevar a cabo la tipificación capsular es mediante técnicas moleculares, que resultan atractivas porque son reproducibles, específicas y fáciles de realizar. Actualmente se han realizado ensayos utilizando la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para detectar y tipificar cepas pertenecientes a *S. agalactiae*, amplificando la secuencia nucleotídica de los genes que corresponden a cada uno de los 10 tipos capsulares de esta bacteria. [12]

La tipificación molecular de EGB mediante el uso de la PCR es cada vez más importante en comparación con los métodos clásicos basados en antisueros ya que disminuye los falsos positivos y permite que algunos aislados no tipificables de *S. agalactiae* sean clasificados. [46]

Es importante mencionar que se ha mejorado esta herramienta con la implementación de la PCR dual y múltiple, que permite amplificar más de una secuencia objetivo en un solo tubo. Su uso es práctico porque se pueden obtener resultados más rápidos y confiables. Esta técnica no se hace de rutina en un laboratorio clínico, pero es de importancia para contribuir al conocimiento de la epidemiología, el monitoreo de la distribución de los tipos capsulares y necesaria para el desarrollo de vacunas. [12, 13]

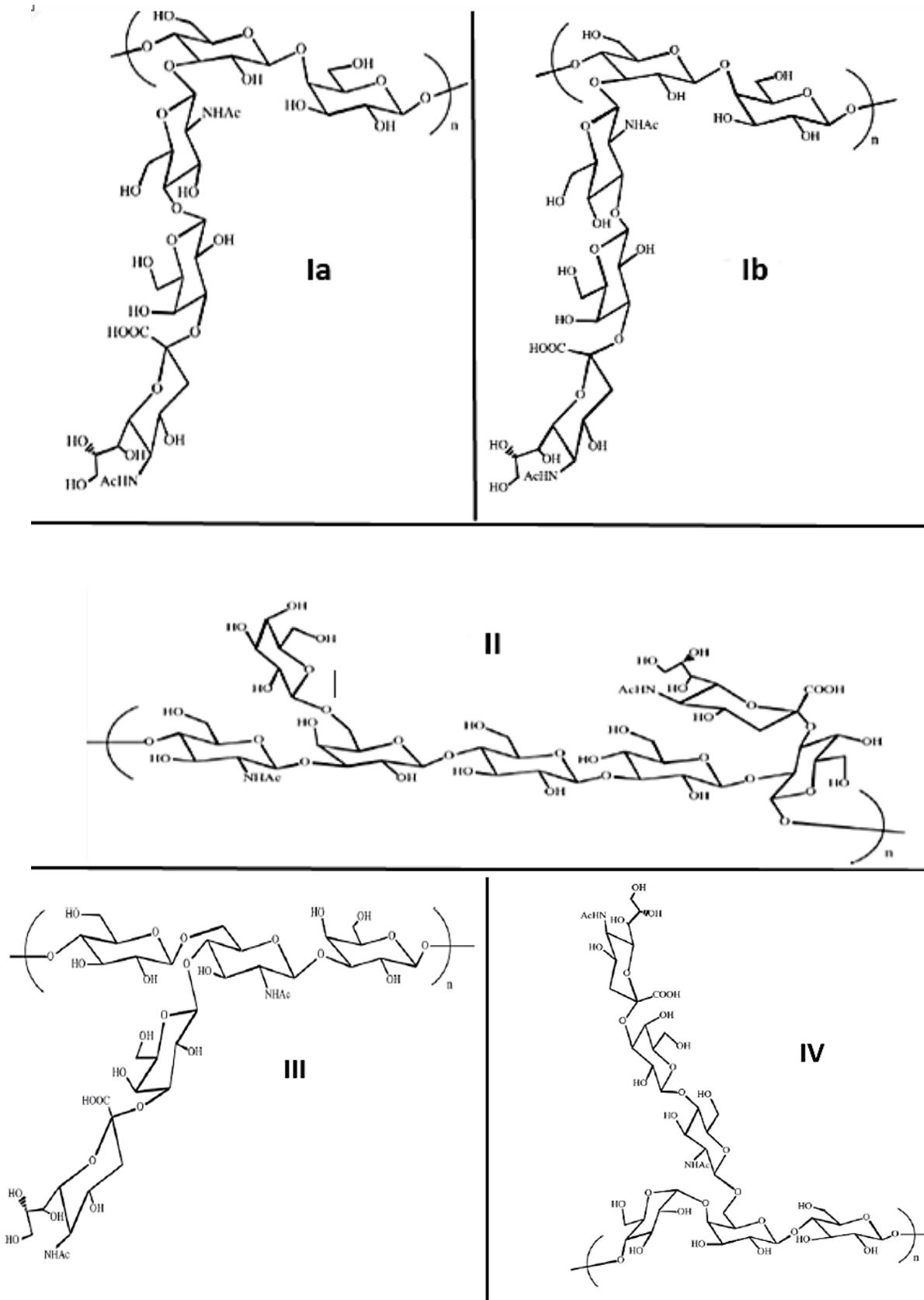


Figura 7. Modelos de silla de los polisacáridos capsulares **Ia**, **Ib**, **II**, **III** y **IV**. Tomada de Paoletti, L (2019). [23]

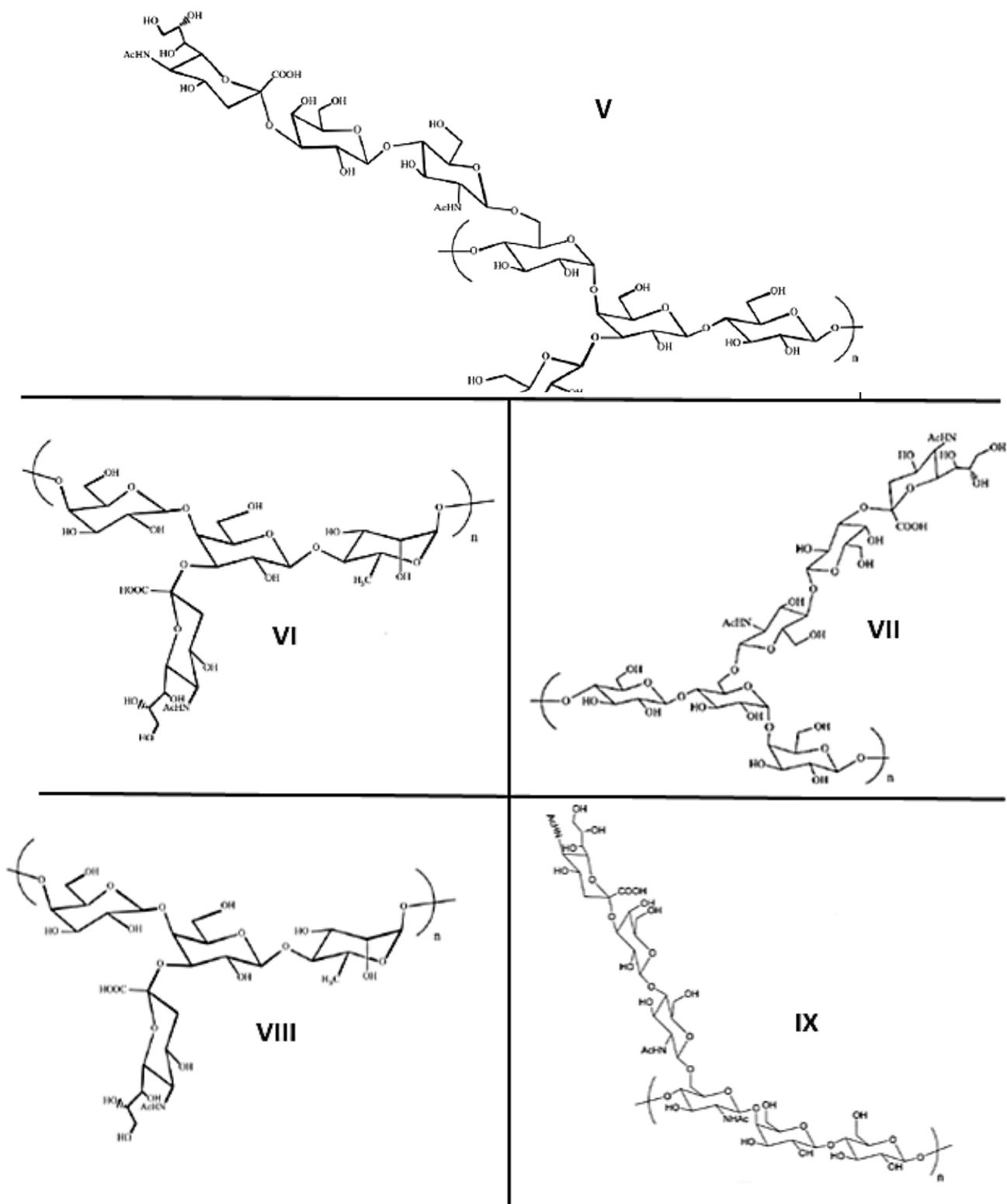


Figura 8. Modelos de silla de los polisacáridos capsulares V, VI, VII, VIII y IX. Tomada de Paoletti, L (2019). [23]

4.5 Factores de virulencia de *Streptococcus agalactiae*

Los estreptococos del grupo B (EGB), son bacterias adaptadas a la colonización asintomática de adultos humanos, pero es un patógeno potencialmente devastador para los recién nacidos susceptibles, debido a que, el recién nacido es deficiente en sus defensas, incluidos los fagocitos, el complemento y los anticuerpos específicos. La capacidad que tienen las cepas de *S. agalactiae* para producir una gran variedad de enfermedades depende de la presencia de los factores de virulencia. [23]

La cápsula de polisacárido es el factor de virulencia más importante en la enfermedad invasiva causada por *S. agalactiae*, lo que le permite a la bacteria evadir los mecanismos de defensa innatos del huésped. Prácticamente todas las cepas de *S. agalactiae* aisladas de humanos tienen cápsula y pueden clasificarse según la serología y estructura. Hasta el momento se han identificado 10 serotipos capsulares de EGB: (**Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX**). [13, 23]

En el pasado los serotipos capsulares **Ia, Ib, II y III** eran igualmente prevalentes en la colonización vaginal y en la sepsis de aparición temprana (es decir, aquella que se desarrolla en neonatos en menos de 7 días. Sin embargo, el serotipo **V** ha surgido recientemente como una causa importante de infección en neonatos. Los aislamientos de los tipos **VI y VIII** se han vuelto prevalentes en las mujeres japonesas y el tipo **IX**, ha sido descrito recientemente en Dinamarca, aunque aún tiene poca prevalencia. [23]

Las interacciones que se llevan a cabo entre la bacteria y el huésped y que conducen a la manifestación de la enfermedad, pueden ser divididas en categorías patogénicas (Tabla 3), la adherencia a las superficies epiteliales, la invasión celular de las barreras epiteliales y endoteliales, la lesión directa de los tejidos del huésped, la evasión de la respuesta inmune y la inducción del síndrome de sepsis. [23]

Tabla 3. Mecanismos de virulencia de estreptococo grupo B implicados en la infección neonatal. Tomada y modificada de Paoletti, L (2019) & Maisey, H (2008) y Oviedo, P (2013). [23, 24, 25]

Categorías patogénicas	Mecanismos específicos	Factor de virulencia de SGB
Adherencia a las superficies epiteliales	<ul style="list-style-type: none"> • Unión al epitelio respiratorio • Unión a la fibronectina de la MEC y fijación del complemento • Unión al fibrinógeno • Unión a fibronectina • Unión a la laminina • Unión a keratina 4 	<p>Ácido lipoteicoico Actividad de la C5a peptidasa</p> <p>Proteína FbsA y FbsB C5a peptidasa Proteína Lmb Proteína Srr-1 Pilis</p>
Invasión de barreras epiteliales y endoteliales (Invasinas)	<ul style="list-style-type: none"> • Degradación de componentes de la MEC • Invasión celular en el tipo cps III • Interacción con el glucosaminoglicano de la superficie de células hospederas • Unión y activación del plasminógeno del hospedero 	<p>Hialuronidasa</p> <p>Proteína Spb1 Antígeno alfa de la proteína C</p> <p>Enzimagliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)</p>
Lesión directa a los tejidos del huésped	<ul style="list-style-type: none"> • Lesión de las membranas placentarias • Lesión de las células epiteliales pulmonares • Lesión de células endoteliales pulmonares 	<p>β- Hemolisina Proteasas Colagenasas Factor CAMP Hialuronidasa Ácido lipoteicoico</p>
Evasión de la respuesta inmune	<ul style="list-style-type: none"> • Resistencia a opsonofagocitosis • Inhibición del complemento • Deterioro del reclutamiento de neutrófilos • Unión de anticuerpos no inmunes • Resistencia a la muerte intracelular • Se une a C4bp, promoviendo la resistencia a la muerte fagocítica • Permite a la bacteria resistir la destrucción celular intracelular por las células fagocíticas alveolares (macrófagos y neutrófilos) 	<p>Cápsula de polisacárido C5a peptidasa</p> <p>Antígeno de proteína C de superficie Factor CAMP Hialuronidasa BibA (Adhesina)</p> <p>Proteína de unión a penicilina (PBP)</p>
Inducción del síndrome de sepsis	<ul style="list-style-type: none"> • Liberación de citoquinas (IL-1, TNF-α) • Inducción de óxido nítrico sintasa 	<p>Peptidoglicano de la pared celular β- Hemolisina</p>

4.6 Importancia Clínica

Streptococcus agalactiae es responsable de infección grave en neonatos y niños menores de tres meses. También produce patologías en embarazadas e infección invasiva en adultos con alguna enfermedad de base. En los neonatos es un patógeno asociado a neumonía, sepsis y meningitis con un alto índice de mortalidad, mientras que en las madres es agente etiológico de infecciones intrauterinas, endometritis, fiebre post parto, infecciones urinarias y bacteriemias. [27]

4.6.1 Colonización e infección en mujeres embarazadas

S. agalactiae se encuentra comúnmente colonizando la vagina y la región ano-rectal de mujeres embarazadas, fenómeno que puede ser temporal, persistente o intermitente, que varía según la población, la raza, el área geográfica y la actividad sexual. [27,28]

Durante la gestación, la colonización por *S. agalactiae* puede ocasionar una variedad de procesos infecciosos como bacteriuria asintomática, infección urinaria, neumonía, meningitis, endocarditis, sepsis y diversas complicaciones obstétricas como aborto espontáneo, trabajo de parto prematuro, corioamnionitis, endometritis, muerte fetal, muerte neonatal y materna.[29, 30]

Generalmente, la colonización materna es asintomática y muestra prevalencias variables entre el 5 y el 30% a nivel mundial, lo que representa un factor de riesgo para la infección temprana en 1-2 % de los neonatos, pues se adquiere al momento del nacimiento a través del canal de parto. [31, 32]

En América Latina la colonización en gestantes varía entre el 2 y el 20.4%, como lo muestran estudios realizados en México, Argentina, Colombia y Brasil con una incidencia de infección neonatal grave del 0.3-1%, porcentajes relativamente bajos comparados con los obtenidos a nivel mundial. [37]

4.6.2 Infección en recién nacidos

En el caso de la infección congénita esta se presenta durante el nacimiento, donde la bacteria coloniza al neonato a su paso por el canal de parto, en la mayoría de los casos la madre y el niño no cuentan con anticuerpos contra la bacteria. [1]

Existen diversos factores obstétricos asociados con un mayor riesgo de infección del recién nacido, como prematurez (< 37 semanas), rotura prolongada de las membranas (>18 horas), existencia de fiebre intraparto (> 38°C), haber tenido hijos con infección por *Streptococcus agalactiae* y la presencia de bacteriuria durante el embarazo causada por este microorganismo. [33]

La infección neonatal se manifiesta como sepsis, neumonía o meningitis, donde aproximadamente el 25% se produce en prematuros y se clasifica de acuerdo al tiempo en que se presenta el cuadro clínico, denominándose síndrome de inicio temprano (EOD) desde el nacimiento a los 7 días de vida, síndrome de inicio tardío (LOD) de los 7 días a las 12 semanas y una nueva clasificación como síndrome de inicio tardío- tardío que se presenta después de los 90 días presentándose por una estancia hospitalaria prolongada. [1, 34, 37]

En la tabla 4, se muestran las características de cada una de las enfermedades neonatales mencionadas.

Tabla 4. Características distintivas de las enfermedades causadas por Estreptococo de grupo B en pacientes pediátricos. Tomada y modificada de Flores, K (2022) & Puopolo, K (2019) & Palacios, G (2017) y Bernardino, M (2011). [35, 36, 37, 38]

Característica	Enfermedad de inicio temprano (EOD)	Enfermedad de inicio tardío (LOD)	Enfermedad de inicio tardío- tardío
Edad	0-7 días	7 -89 días	> 90 días
Transmisión	Antes del nacimiento	Después del nacimiento	Después del nacimiento
Vía de adquisición	Materna por EGB en el tracto gastrointestinal y genital	Transmisión horizontal, perinatal, nosocomial o fuentes comunitarias e ingestión de leche materna colonizada por EGB (pocos casos)	Como enfermedad de inicio tardío
Factores asociados	<ul style="list-style-type: none"> • Parto prematuro (< 37 semanas de gestación) • Rotura prolongada de membranas fetales (> 12-18 h) • Fiebre intraparto (>38°C) 	<ul style="list-style-type: none"> • Sexo masculino • Raza negra • Tener un gemelo con LOD • Estancia hospitalaria prolongada 	<ul style="list-style-type: none"> • Ser nacidos de madres infectadas con el virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH)
Pacientes afectados	Prematuros (<37 semanas) con complicaciones obstétricas	Prematuros (< 34 semanas)	(Prematuros < 32 semanas e infectados con VIH)
Presentación clínica	<ul style="list-style-type: none"> • Bacteremia sin foco (40-55%) • Neumonía (30-45%) • Meningitis (6-15%) 	<ul style="list-style-type: none"> • Bacteremia sin foco (55-67%) • Meningitis (26-35%) • Otras *(1-6%) 	Como enfermedad de inicio tardío
Sintomatología	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura > 38°C • Falla respiratoria • Dificultad para alimentarse • Bacteremia sin foco infeccioso aparente y con menos frecuencia meningitis 	<ul style="list-style-type: none"> • Fiebre • Sepsis o bacteremia • Irritabilidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Fiebre • Irritabilidad
Incidencia	0.23/ 1000 recién nacidos vivos	0.31/ 1000 recién nacidos vivos	-
Serotipos más frecuentes	<ul style="list-style-type: none"> • Ia (36%) • III (32%) • V (14%) • II (10%) 	<ul style="list-style-type: none"> • III (70%) • Ia (15%) • V (7%) • Ib (5%) 	<ul style="list-style-type: none"> • III (36%) • Ia (36%) • V (14%)
Posibles complicaciones	<ul style="list-style-type: none"> • Retraso en el desarrollo y crecimiento • Discapacidad intelectual • Pérdida de la visión y audición • Enfermedades pulmonares crónicas • Parálisis cerebral 	<ul style="list-style-type: none"> • Edema cerebral • Lesión del paréquima cerebral • Acumulación de LCR en el espacio subdural. • Secuelas neurológicas en 30 % de sobrevivientes 	-
Letalidad	5-15%	2-6%	<5%

Las recomendaciones para la prevención de la enfermedad por *S. agalactiae* en recién nacidos emitidas por la Academia Americana de Ginecología y Obstetricia han tenido cambios sustanciales desde su primera versión en 1997. Actualmente, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC's), en conjunto con diversas asociaciones médicas de dicho país, en su última revisión del año 2010 recomiendan la búsqueda intencionada de colonización vaginal o rectal por EGB en toda mujer embarazada entre las semanas 35 y 37 de gestación, para evaluar el uso de profilaxis antibiótica intraparto. [34, 37]

Se recomienda administrar profilaxis a todas las mujeres embarazadas con demostración de infección urinaria o bacteriuria por este microorganismo, a aquellas que tuvieron un hijo con infección grave por EGB y a las que tienen un estado de colonización desconocido y parto pretérmino o con rotura de las membranas fetales ≥ 18 horas. Estas recomendaciones, en general, son similares en otros países desarrollados. A pesar de lo anterior, en México no se han adoptado de manera oficial las recomendaciones de prevención antes descritas, ya que no existen criterios establecidos para la búsqueda intencionada de EGB en este país. Esto se debe en parte a los bajos porcentajes de aislamiento de EGB en la mujer embarazada y en el recién nacido. [37]

4.6.3 Infecciones en adultos

Si bien, *S. agalactiae* es relacionado a infecciones durante la gestación y el puerperio, así como en neonatos, en los últimos años se ha observado un incremento en las infecciones en adultos (sin relación con el embarazo) causadas por este microorganismo. [39]

En los adultos, la mayoría de los casos de enfermedad por estreptococo del grupo B se dan entre aquellos que tienen otras afecciones, por ejemplo: la presencia de diabetes, enfermedad cardíaca, insuficiencia cardíaca congestiva, cáncer o antecedentes de cáncer y obesidad. El riesgo de presentar un caso grave aumenta a medida que las personas se hacen mayores. Los adultos de 65 años o más tienen un mayor riesgo en comparación con aquellos que sean menores de 65 años. [40]

En los adultos, los procesos atribuibles a este patógeno incluyen bacteriemia con o sin sepsis, celulitis y otras infecciones de tejidos blandos, neumonía, artritis, endocarditis, infecciones del tracto urinario, meningitis, osteomielitis y piomiositis. [41]

4.6 Epidemiología

Generalmente, la colonización materna por *S. agalactiae* es asintomática y muestra prevalencias variables entre el 5-30% a nivel mundial. Las mujeres gestantes colonizadas pueden transmitir esta bacteria a sus hijos, favoreciendo el desarrollo de la infección neonatal temprana en 1 a 2% de los recién nacidos. [29]

Desde 1960, *Streptococcus agalactiae* se ha destacado como bacteria asociada a meningitis, neumonía y sepsis neonatal. En el informe de 2021, la Organización Mundial de la Salud (OMS), señala que la carga mundial de infecciones por EGB se relacionó con 518 000 nacimientos prematuros, 392 000 infecciones neonatales y 91 000 muertes cada año. [27]

La incidencia mundial estimada de la enfermedad infantil por EGB, es de aproximadamente 0.5/1000 recién nacidos vivos, mientras que en México la incidencia es de 1/1000 recién nacidos vivos, pero en unidades de cuidados intensivos neonatales se incrementa de 15 a 35 casos con una mortalidad de 20-60 %. [42]

Dado que la colonización vaginal por este microorganismo representa un factor de riesgo importante para el desarrollo de infecciones neonatales invasivas, se han investigado las tasas de colonización en diferentes países. La tasa de colonización vaginal y/o rectal entre mujeres embarazadas es bastante similar en todo el mundo, con algunas variaciones, siendo del 10-30% para Estados Unidos, 6.5-36% para Europa, 7.1-16% para Asia, 9.1-25.3% para Medio Oriente y 11.9-31.6% para África. [43]

En general, las tasas de colonización en Latinoamérica varían entre el 2-20.4% como lo muestran estudios realizados en México, Argentina, Colombia y Brasil, con una incidencia de infección neonatal grave del 0.3-1% de los recién nacidos vivos. [37]

Además de la prevalencia de la colonización en mujeres embarazadas y la infección neonatal, la distribución de serotipos capsulares de *S. agalactiae* es importante en términos de asociaciones con la enfermedad invasiva. [44, 45]

Algunos serotipos han sido asociados con clones más virulentos y, por lo tanto, a desarrollar enfermedad invasiva. Esto aplica particularmente para el serotipo III, que se ha asociado como una causa común de la enfermedad de inicio tardío (LOD) y en particular con meningitis, por lo que es importante conocer la prevalencia de los tipos capsulares de esta bacteria en mujeres en edad reproductiva diferentes regiones del mundo y el riesgo que esto implica (Tabla 5). [45]

Tabla 5. Distribución geográfica de los tipos capsulares de *S. agalactiae* asociados a colonización.

Serotipo prevalente	Región
la, Ib, II, III, V	Norteamérica, Estados Unidos, Europa [47, 48, 49, 50]
la	México [48]
IV, Ia	Emiratos Árabes Unidos [51]
V	Egipto[52]
Ia, VI	Malasia [53, 54]
VI, VIII	Japón [55, 56]

Estudios realizados en los 80's, en el Instituto Nacional de Perinatología documentaron la colonización cervicovaginal por EGB en 10.3% de 340 mujeres embarazadas estudiadas. El tipo capsular predominante fue el I con 33 %, con una baja presencia del serotipo III (3%) y una elevada prevalencia de los aislamientos no tipificables (18.2%). Basándose en esto, se atribuyó la baja frecuencia de enfermedad neonatal a la poca prevalencia del serotipo III. [37]

Estudios posteriores documentaron la predominancia del serotipo I (48.6%) en la colonización de mujeres embarazadas con una creciente participación del serotipo III (32.9%), disminuyendo los aislamientos no tipificables. Además se sugirió una mayor participación del serotipo III en la colonización de la mujer mexicana así como en enfermedades graves en neonatos. [37]

Conocer la distribución de serotipos de *S. agalactiae* en diferentes regiones es todo un reto y también representa información importante para las estrategias de vacunación que se intentan diseñar como medida eficaz de prevención de infección por EGB. [43, 57]

4.7.1 Diagnóstico

El diagnóstico microbiológico de la infección por *S. agalactiae* se realiza en el laboratorio mediante cultivo en agar sangre a partir de muestras de líquido cefalorraquídeo, secreciones de vías respiratorias, secreción de heridas, exudado vaginal y perianal. El tracto gastrointestinal es el principal reservorio y la fuente de la colonización vaginal. [34]

Con el propósito de estandarizar los procedimientos que facilitan la identificación de *S. agalactiae* y el manejo de las pacientes colonizadas, grupos como el conformado por los CDC, la Asociación Americana de Pediatría y el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos, han elaborado Guías de Prevención de la enfermedad neonatal por estreptococo beta-hemolítico y han establecido lineamientos acerca de la recolección de muestras y su procesamiento en laboratorio.

Dentro de estas estrategias, se contemplan los siguientes puntos:

- Colectar la muestra de mujeres entre las 35 – 37 semanas de gestación, o por lo menos en las 5 semanas previas a la fecha estimada del parto.
- La muestra se colecta mediante hisopado del tercio inferior de la vagina y del esfínter anal, pudiendo usarse el mismo hisopo para ambos muestreos o hisopos diferentes si así se prefiere. No es necesaria la utilización de espéculo para la recolección de la muestra.
- La muestra debe ser colocada en un medio no nutritivo (medio de Stuart o medio de Amies) para su transporte en caso de ser necesario y debe ser cultivado dentro de las primeras 24 horas de su colección.
- Se recomienda la inoculación de la muestra en un medio enriquecido y selectivo, como el caldo Todd–Hewitt suplementado con gentamicina y ácido nalidixico. Posteriormente el crecimiento bacteriano resultante se sub-cultiva en agar con sangre de carnero al 5 % para aumentar la posibilidad de identificación de colonias de EGB.
- Las colonias sospechosas son sometidas a diferentes pruebas para comprobar la existencia de colonias de EGB; entre ellas tenemos: Tinción de Gram, prueba del factor CAMP, aglutinación con partículas de látex y la bacitracina.
- En aquellas pacientes con historia de anafilaxia a betalactámicos, se recomienda realizar pruebas de susceptibilidad a clindamicina y/o eritromicina. [34]

Con el objetivo de proporcionar herramientas diagnósticas adicionales al cultivo para la detección de *S. agalactiae*, se han desarrollado técnicas rápidas y directas como los inmunoensayos y técnicas de biología molecular que incluyen la amplificación de ácidos nucleicos como son la PCR. [8, 59]

4.7.2 Tratamiento y Prevención

Los estreptococos del grupo B son sensibles a la penicilina, la cual constituye el fármaco de elección. Sin embargo, la concentración mínima inhibitoria (CMI) necesaria para inhibir al microorganismo es aproximadamente 10 veces superior a la que se utiliza para inhibir a *S. pyogenes*. Por otra parte, se ha descrito la capacidad de la penicilina de inhibir, pero no destruir al microorganismo. Por estos motivos, con frecuencia se utiliza la combinación de la penicilina con un aminoglucósido para controlar infecciones graves. La vancomicina es un glicopeptido que representa un tratamiento alternativo en pacientes alérgicos a la penicilina. Se ha observado resistencia a eritromicina y tetraciclina en diferente grado. [7]

El primer paso en la prevención de la enfermedad neonatal por *S. agalactiae* consiste en apegarse a las guías que establecen el tamizaje de las mujeres gestantes entre las semanas 35 y 37 del embarazo. A partir del resultado que se obtenga en dicho estudio, se recomienda administrar la profilaxis antibiótica intraparto (PAI).

La definición de profilaxis intraparto es la indicación o administración de penicilina (penicilina G, ampicilina o cefazolina) al menos 4 horas antes del parto. La elección de antibiótico puede variar dependiendo de si la paciente presenta alergia moderada o severa a las penicilinas, en cuyo caso se podrá optar por la administración de clindamicina o vancomicina. (Figura 9)

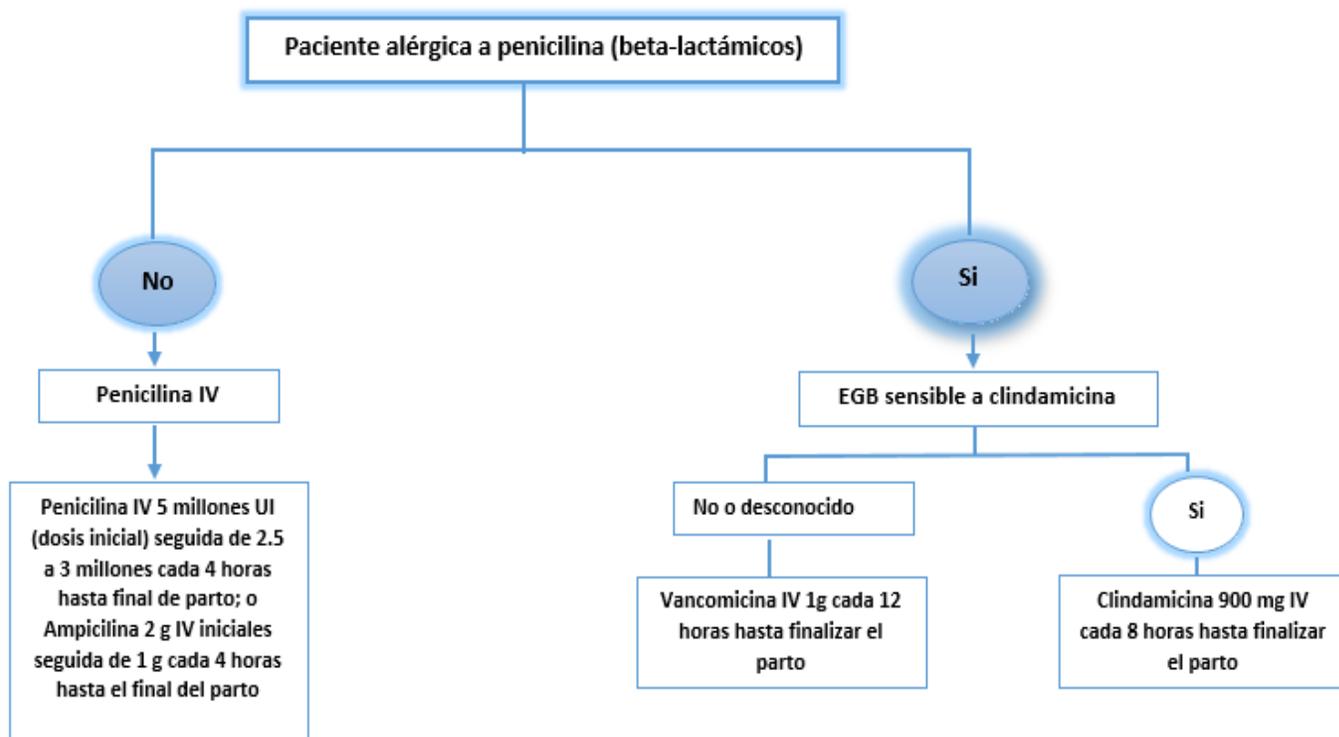


Figura 9. Régimen de antibióticos recomendados para la profilaxis intraparto de *Streptococcus agalactiae* adaptado a las guías de CDC 2010. IV: Vía intravenosa. Tomada de Chichilla, N (2016). [61]

La profilaxis intraparto está indicada en mujeres en cualquier momento del embarazo que hayan cursado con bacteriuria causada por EGB y también en mujeres que presenten algún factor de riesgo: Un cuadro febril durante el parto $>38^{\circ}\text{C}$, ruptura de membranas por 18 o más horas y parto pretérmino (<37 semanas de gestación o una prueba de amplificación de ácidos nucleicos positiva durante el parto).

En la literatura existen recomendaciones que sugieren que cuando exista un nacimiento, en el cual la madre no se haya realizado el tamizaje, es importante mantener al neonato en observación por al menos 2 días (48h), con el objeto de tratarlo a tiempo ante cualquier indicio de infección o enfermedad por EGB. [60]

4.7.3 Vacunación

La estrategia de profilaxis antibiótica intraparto (PAI) ha reducido la incidencia de EOD, donde se aplicaron, pero no han tenido impacto en la infección de inicio tardío (LOD) y solo un impacto limitado sobre la enfermedad en mujeres embarazadas. [62]

En el año 2015, la Organización Mundial de la Salud (OMS) identificó a EGB como prioridad en el desarrollo de una vacuna para inmunización materna, debido a que la mayor parte de los afectados por esta enfermedad se encuentran en países de escasos recursos. [60, 63]

El comité consultivo sobre el desarrollo de productos para vacunas (PDVAC, por sus siglas en inglés) tiene la misión de acelerar el desarrollo de vacunas y tecnologías asociadas que son requeridas con urgencia para varios agentes patógenos priorizados entre ellos a *Streptococcus agalactiae* (EGB). [64]

Por lo que está claro que la administración de una vacuna adecuada durante el embarazo podría brindar una mejor solución en todos los entornos. Una de las principales vacunas candidatas actuales es la vacuna conjugada polisacárido-proteína, pero también se están desarrollando vacunas basadas en proteínas y una ha comenzado a probarse en ensayos clínicos. [62]

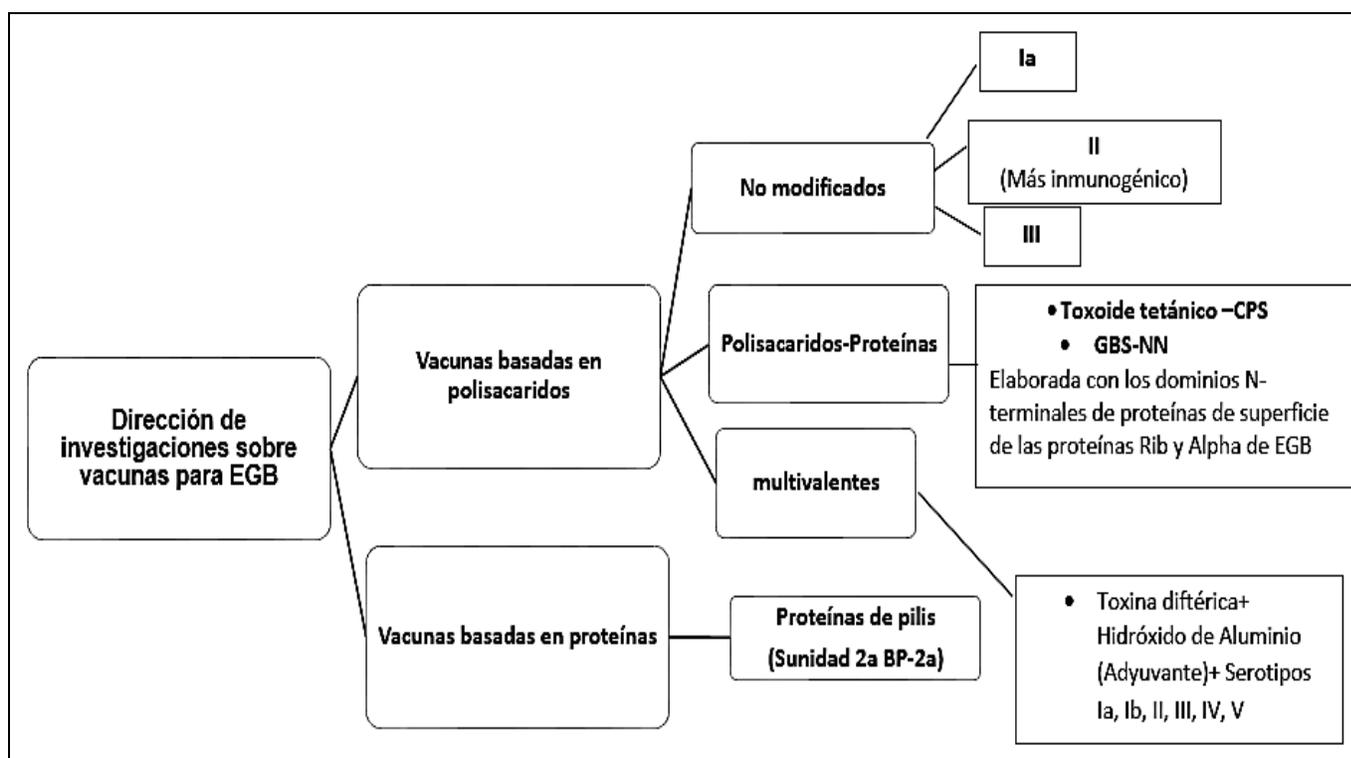


Figura 10. Vacunas en investigación para EGB. Tomada y modificada de Puertas, A (2017) & Chinchilla, A (2021) y Heath, P (2016). [57, 60, 62]

Una vacuna materna universal contra EGB podría proteger contra la EOD y LOD sin depender del uso generalizado de antibióticos y limitar la presencia de factores de riesgo clínicos. Aunque actualmente no se dispone de ella, están en desarrollo algunas vacunas candidatas para brindar protección contra estreptococo del grupo B. [36]

En la tabla 6 se muestran las vacunas en las cuales actualmente se están trabajando así como su fase de investigación.

Tabla 6. Estado de desarrollo de vacunas candidatas actuales contra EGB. Tomada de Heath, P (2016) [62]

Desarrollador	Nombre/ identificador del candidato	preclínico	Fase I	Fase II	Punto de contacto
NIH	Conjugados de toxoide tetánico-CPS; monovalente (múltiples estudios), bivalente (un estudio); conjugado CRMN197-CPS: monovalente (un estudio)	X	X	X	Ensayo en mujeres embarazadas
Novartis/GSK	Conjugados CRM197-CPS: monovalente (múltiples), trivalente (varios)	X	X	X	Ensayo en mujeres embarazadas
Minervax	Dominios N-terminales de las proteínas de superficie Rib y AlphaC	X	X		
Novartis/GSK	Proteínas de pilus	X			
Varios grupos	Otra (s) proteínas (s) y/o conjugados proteína-CPS	X			

5. HIPÓTESIS

Los tipos capsulares **la** y **V** de *S. agalactiae* tienen mayor prevalencia en aislamientos vaginales del Hospital general “Dr. Gonzalo Castañeda Escobar” del ISSSTE.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de los tipos capsulares de *Streptococcus agalactiae* provenientes de aislamientos vaginales de un periodo de 5 años.

6.1 Objetivos particulares

- Recuperar 372 cepas de *S. agalactiae* aisladas de cultivos vaginales del Hospital general “Dr. Gonzalo Castañeda Escobar” de un periodo de 5 años (2007-2011)
- Realizar la confirmación de cepas como *S. agalactiae* mediante la prueba de CAMP.
- Realizar la tipificación capsular mediante la técnica de PCR.
- Establecer la frecuencia de cada uno de los tipos capsulares de *S. agalactiae* en aislamientos vaginales.
- Determinar la distribución de los tipos capsulares de *S. agalactiae* por grupos de edad.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Obtención y manejo de las cepas estudiadas

Se utilizaron 372 cepas de *S. agalactiae* obtenidas de aislamientos vaginales provenientes del Hospital general “Dr. Gonzalo Castañeda Escobar” del ISSSTE (Figura 11), en el periodo de 2007-2011 conservados a 72°C en el Laboratorio de Biología Molecular del departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM.



Figura 11. Hospital general “Dr. Gonzalo Castañeda Escobar” del ISSSTE

7.2 Identificación de las cepas estudiadas

Las cepas fueron conservadas en caldo BHI con 15% de glicerol a -72°C , después fueron sembradas en agar sangre de carnero con estría cruzada e incubadas a $24\text{hr } /37^{\circ}\text{C}$ en una atmosfera al 5% de CO_2 donde se observó la homogeneidad de la morfología colonial para verificar la pureza y viabilidad.

Las cepas fueron caracterizadas en el laboratorio con los siguientes criterios: observación de colonias, el patrón de hemólisis en agar sangre, prueba de CAMP y la determinación del carbohidrato "C" de la pared celular específico del grupo B de estreptococos mediante la conglutinación en látex (Kit comercial Pastorex® BIO-RAD®), para proceder con el aislamiento de DNA y realizar la tipificación molecular.

7.3 Prueba de CAMP

La prueba se realizó en agar sangre de carnero al 5%. Se sembró una línea en el centro de una cepa pura de *Staphylococcus aureus* y perpendicular (sin tocar) con una separación de 3-4mm se siembra una línea de un control positivo, negativo y muestra en estudio. Las placas se incubaron $24\text{h } /37^{\circ}\text{C}$ a una atmosfera del 5% de CO_2 . La prueba es positiva si observamos una hemólisis sinérgica, donde las bacterias se encuentran cercanas entre sí, con la característica punta de flecha, reconociéndose como Estreptococos del Grupo B (EGB) a la cepa por identificar.

Tabla 7. Controles utilizados para Prueba CAMP

Controles para Prueba CAMP	
<i>S. aureus</i> (β -hemolisina)	#505 cepa control interna del Laboratorio de Biología Molecular, Departamento Salud Pública, Facultad de Medicina
<i>S. agalactiae</i> (Control positivo)	#2575 cepa interna del Laboratorio Biología Molecular, Departamento Salud Pública, Facultad de Medicina
<i>S. pyogenes</i> (Control negativo)	#SS745 de los CDC

7.4 Extracción de DNA

Para el aislamiento de DNA se empleó el kit comercial DNeasy Tissue (QIAGEN®).

La ventaja de este kit es la obtención de productos de DNA con un alto rendimiento, pureza y estabilidad, lo que nos permite tener DNAs almacenados por muchos años en buenas condiciones.

La metodología descrita por QIAGEN se describe brevemente:

1. La extracción de DNA se realizó a partir cultivo bacteriano en caldo BHI (Difco®) + Neopeptona (Difco®) 1% de 24h de las cepas identificadas como EGB.
2. Se transfirió 1 mL del cultivo bacteriano en un tubo eppendorf y centrifugar a 7500 rpm durante 8 min para obtener un paquete bacteriano.
3. Se preparó buffer de lisis enzimática agregando lisozima (Amresco) a una concentración 20mg/mL.
4. Se adicionaron 180 µL de buffer de lisis al tubo eppendorf con el paquete bacteriano. Agitar y homogenizar.
5. Se incubó a 37°C por 30 min y se agitó para homogenizar.
6. Se adicionó al tubo 25 µL de proteinasa K y 200 µL de buffer AL y se agitó para homogenizar
7. Se incubó a 70°C por 30 min y se agitó para homogenizar
8. Se adicionaron 200µL de Etanol absoluto frío agitando vigorosamente en vórtex.
9. Se transfirió el contenido del tubo eppendorf a una columna de extracción, colocada sobre un tubo de colecta y centrifugar a 8000 rpm durante 1 min. Se eliminó el líquido presente en el tubo de colecta.
10. Se adicionó a la columna de extracción 500µL de buffer AW1 y se procedió a centrifugar a 8000 rpm durante 1 min. Se eliminó el líquido presente en el tubo de colecta.
11. Se adicionó a la columna de extracción 500 µL de buffer AW2 y se centrifugó a 13000 rpm durante 3 min. Se eliminó el líquido presente en el tubo de colecta.
12. Se transfirió la columna de extracción a un tubo nuevo eppendorf de 1.5 ml y se agregó a la columna 200µL de buffer de elución. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 min. Se procedió a centrifugar a 8000 rpm durante 1 min para obtener el DNA y conservar a -20°C.

Se verificó la pureza del DNA extraído realizando una electroforesis colocando 4 uL de DNA en gel de agarosa (Invitrogen®) al 1% con Bromuro de Etidio (Search Organic®) a una concentración final de 0.2 ug/mL de agarosa. Se utilizó buffer de corrida TBE buffer 0.5X (Tris-Boratos-EDTA) y cámara de electroforesis MiniSub-Cell (Bio-Rad®).

El gel de agarosa se observó en un transiluminador de luz UV (Lab-Tech®) para ver bandas de DNA.

7.5 Tipificación molecular por PCR

Con el DNA extraído de las cepas se procedió a realizar la amplificación del gen asociado a cada uno de los tipos capsulares de *S. agalactiae* mediante la técnica de PCR, con el uso de un termociclador (Corbett RESEARCH®).

Con base a los reportes de la literatura, la estrategia a seguir en el laboratorio fue buscar los tipos capsulares de mayor a menor frecuencia, realizando los siguientes PCR.

- Se llevó a cabo la PCR múltiple, amplificando el gen *cfb* (que codifica para el factor de CAMP) y de los genes que codifican para los tipos capsulares (*cps III* y *cps V*).
- Las muestras de DNA que resultaron negativas para los *cps III* y *cps V*, se procedió a hacer una PCR dual de los genes *cpsIa* y *cpsIb*.
- Por último se realizó una PCR individual de los tipos capsulares *cps II*, *cps IV*, *cps VI*, *cps VII*, *cps VIII* y *cps IX* para los DNAs de las cepas que no se identificaron en los PCRs anteriores.

La reacción en cadena de la polimerasa múltiple y dual se estandarizó con las siguientes condiciones: Fase inicial 94°C/ 5 min; Fase de reacción 94°C/ 1 min, 60°C/ 1 min, 72°C/ 1:20 min (30 ciclos); Fase final 72°C/ 5 min y de igual manera la PCR individual para los tipos capsulares **IV, VI, VII, VIII, IX**. (Figura 12)

Para la PCR individual del tipo capsular **II**, las condiciones fueron las siguientes: Fase inicial 94°C/ 5 min; Fase de reacción 94°C/ 1 min, 52°C/ 1 min, 72°C/ 1:20 min (30 ciclos); Fase final 72°C/ 5 min. (Figura 12)

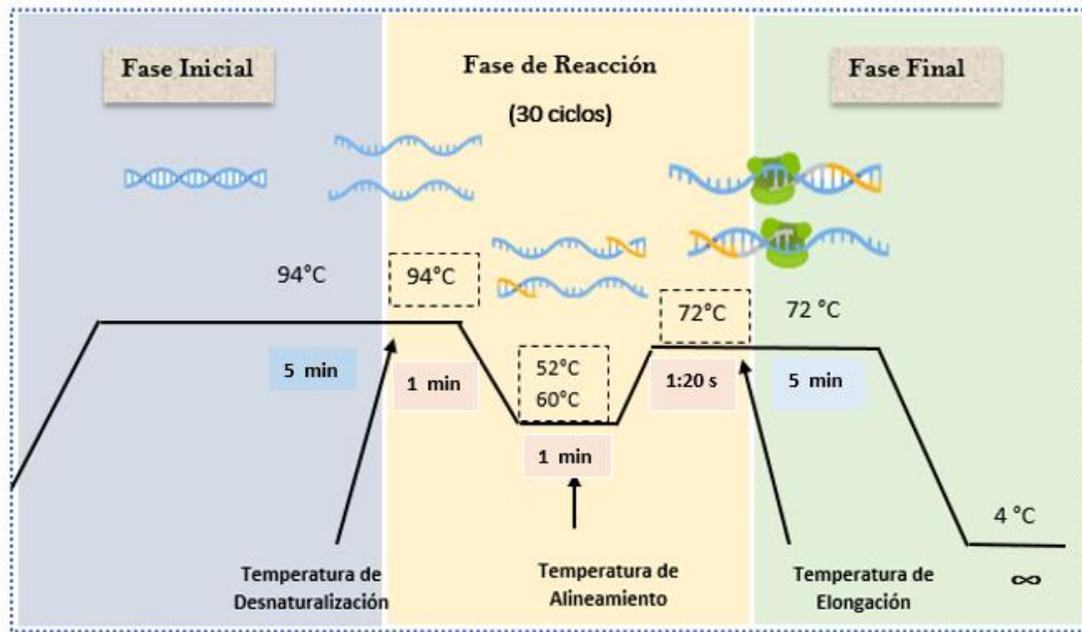


Figura 12. Diagrama de temperaturas utilizadas en la PCR.

Las temperaturas de alineamiento para las diferentes PCR fueron las siguientes:

Tabla 8. Temperaturas de alineamiento para cada gen amplificado.

Tipo de PCR	Gen	Temperatura de alineamiento
Múltiple	<i>cfb, cps III, cps V</i>	60°C
Dual	<i>cps Ia, cps Ib</i>	60°C
Individual	<i>cps II</i>	52°C
	<i>cps IV, cps VI, cps VII, cps VIII, cps IX</i>	60°C

En las siguientes tablas se describen los reactivos y volúmenes utilizados para los amplificadores.

Tabla 9. Composición de la mezcla para PCR múltiple de los genes *cfb*, *cpsIII* y *cpsV*, con volumen final de 30µL

Reactivo	Volumen (µL)
Buffer para PCR (Marca)	3.0
MgCl ₂	2.0
Desoxinucleotidos Trifosfato (dNTPs) (Sigma®) 1.25mM de cada dNTP	5.0
CFB-F 10µM	0.5
CFB-R 10µM	0.5
III-HF 10µM	0.5
III-HR 10µM	0.5
V-HF 10µM	0.5
V-HR 10µM	0.5
Taq DNA polimerasa 5 U/µL (Marca)	0.1
Agua Ultrapura	15.9
DNA de la muestra	1.0

Tabla 10. Composición de la mezcla para PCR dual de los genes *cps/a* y *cps/b* con un volumen final de 15µL

Reactivo	Volumen (µL)
Buffer para PCR (Vivantis®)	1.5
MgCl ₂	1.0
dNTPs (Sigma®) 1.25mM de cada dNTP	2.5
Ia-F 10µM	0.4
Ia-R 10µM	0.4
Ib-HF 10µM	0.4
Ib-HR 10µM	0.4
Taq DNA polimerasa 5 U/µL (Vivantis®)	0.08
Agua Ultrapura	7.32
DNA de la muestra	1.0

Tabla 11. Composición de la mezcla para PCR individual de los genes *cpsII*, *cpsIV*, *cpsVI* con un volumen final de 15 µL

Reactivo	Volumen (µL)
Buffer para PCR (Vivantis®)	1.5
MgCl ₂	1.0
dNTPs (Sigma®) Solución 1.25mM de cada dNTP	2.5
II-F 10µM	0.4
II-R 10µM	0.4
Taq DNA polimerasa 5 UI/µL (Vivantis®)	0.08
Agua Ultrapura	8.12
DNA de la muestra	1.0

Se realizó una electroforesis para observar los productos de PCR en un gel de agarosa al 1.7% en buffer TBE al 0.5x con Bromuro de Etidio (Search Organic®) a una concentración final de 0.2 ug/mL y se utilizó un marcador de 50pb (Thermo-Scientific®). La electroforesis se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 90V por 40 min, después el gel fue observado en un transiluminador de luz UV (Lab-Tech®).

Tabla 12. Secuencia nucleotídica de los primers utilizados. [55]

Gen	Primer	Secuencia (5' a 3')
<i>cfb</i>	CFB-HF	ATGATGTATCTATCTGGA ACTCTAGTG
	CFB-HR	CGCAATGAAGTCTTTAATTTTC
<i>cpsIa</i>	Ia-HF	ATACAGTTGTCGTAAGAAGAAAAC
	Ia-HR	TGTTTAGCTTTCCTACCAATATTAG
<i>cpsIb</i>	Ib-HF	TTTAGAAGTCCAGAATTT CATAGAGTC
	Ib-HR	TTTAGAAGTCCAGAATTT CATAGAGTC
<i>cpsII</i>	II-KF	CTCCAGATGGTCTTTGTGAC
	II-KR	CTCCAGATGGTCTTTGTGAC
<i>cpsIII</i>	III-HF	CCACATATGAGAATAAGACTTGC
	III-HR	CCTAGTGATAGTACTTTGGTTTCTG
<i>cpsIV</i>	IV-HF	TGTAATCATCTACACCCC
	IV-HR	ATAGCCTTTTGACAGGTAGGTT
<i>cpsV</i>	V-HF	CTTTTTTATAGGTT CGATACCATC
	V-HR	GATGTTCTTTTAACAGGTAGATTACAC
<i>cpsVI</i>	VI-HF	TGTTTTTCTTACAAAGTGGAGTC
	VI-HR	TGTTTTTCTTACAAAGTGGAGTC
<i>cpsVII</i>	VII-MF	GTGCAATTAGAGGACAAAATTTA
	VII-MR	GTGCAATTAGAGGACAAAATTTA
<i>cpsVIII</i>	VIII-JF	ATCTCATGGCATGTCTGG
	VIII-JR	CATTCGAATAAAC AATCTTATTGC
<i>cpsIX</i>	IX-IF	CTGTAATTGGAGGAATGTGGATCG
	IX-IR	AATCATCTTCATAATTTATCTCCATT

El tamaño de los productos de PCR amplificados se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 13. Tamaño de los productos de PCR amplificados.

Gen	Tamaño del producto de PCR (pb)
<i>cfb</i>	260
<i>cpsIa</i>	340
<i>cpsIb</i>	250
<i>cpsII</i>	300
<i>cpsIII</i>	340
<i>cpsIV</i>	303
<i>cpsV</i>	300
<i>cpsVI</i>	290

8. RESULTADOS

8.1 Identificación de las cepas de *S. agalactiae*

Las 372 cepas estudiadas provenientes de aislamientos vaginales correspondieron a *S. agalactiae*, todas mostraron características morfológicas de colonias lisas y redondas en agar sangre, con un halo de β - hemólisis y prueba de CAMP positiva.

8.2 Extracción de ADN

La pureza y rendimiento del DNA pertenecientes a las 372 cepas se evaluaron mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. (Figura 13)

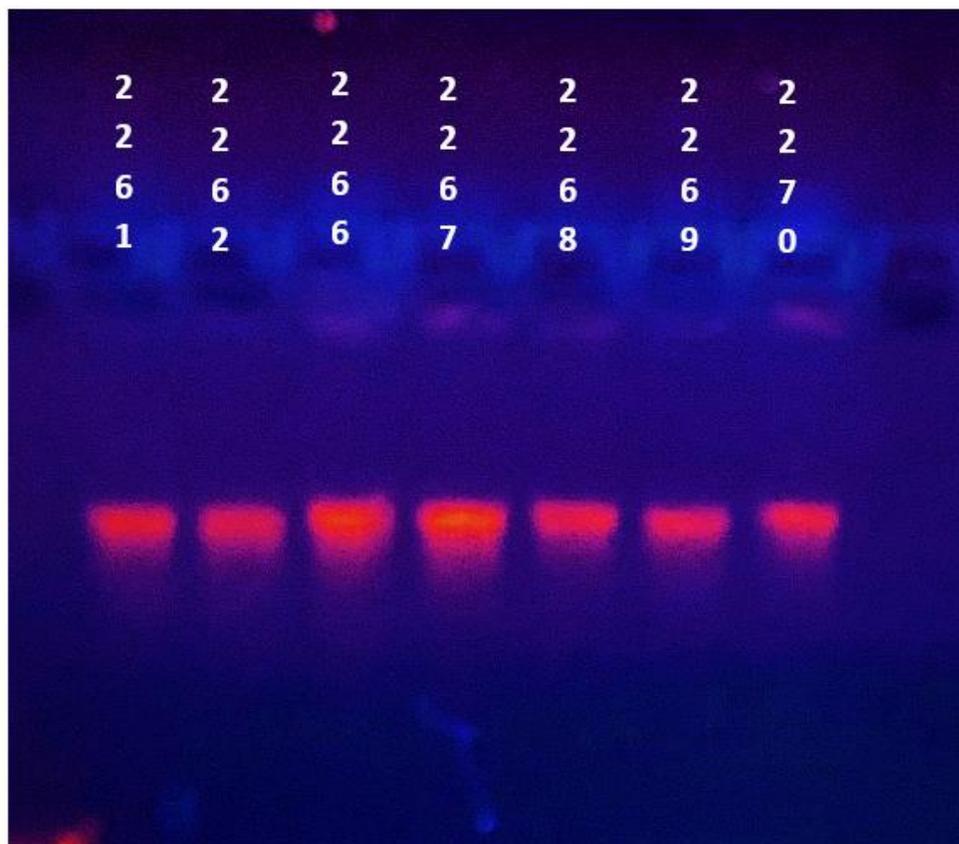


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, 3 uL de DNA extraído con kit comercial DNeasy Tissue (QIAGEN®).

8.3 Tipificación capsular de *S. agalactiae*

La tipificación capsular se llevó a cabo en tres etapas: Primero se realizó una PCR múltiple para la amplificación de los genes *cfb*, *cps III* y *cps V*. Las cepas no tipificadas en esta fase fueron probadas en una segunda PCR dual en la que se amplificaron los genes *cps Ia* y *cps Ib*. Y finalmente las cepas no tipificadas en la segunda PCR, se sometieron a PCRs individuales para cada gen (*cps II*, *cps IV*, *cps VI*, *cps VII*, *cps VIII* y *cps IX*)

En la figura 14 se observa la amplificación realizada mediante la PCR múltiple. Las cepas 1017 y 2092 fueron utilizadas como control positivo para los genes *cps III* y *cps V* respectivamente, las cuales previamente fueron tipificadas en el laboratorio. Las 372 cepas destinadas para este estudio amplificaron la banda de 260pb del gen *cfb*, confirmando su identificación como EGB (gen codifica para el factor de CAMP), específico para *S. agalactiae*. En la amplificación del gen *cps III* se observó un producto de tamaño aproximado de 340pb y para el gen *cps V* de 300pb.

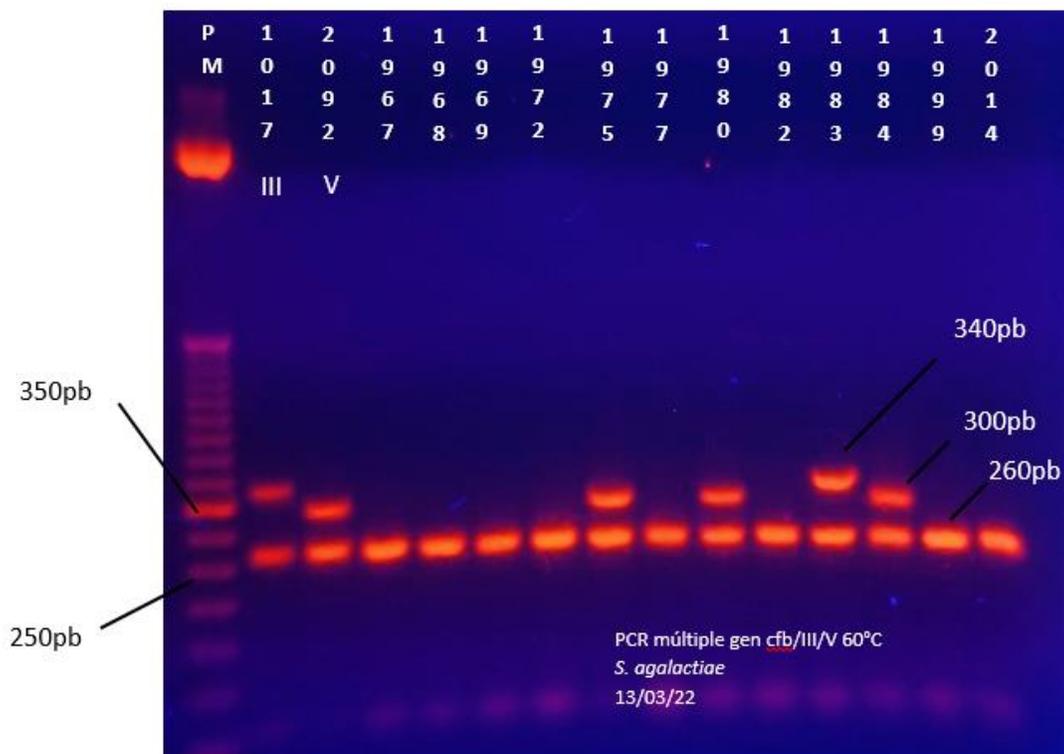


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1.7% de los amplificados de PCR, *cps III* y *cps V* (PCR múltiple). PM: Marcador de peso molecular de 50pb (Invitrogen®)

En la figura 15, se muestra la PCR dual donde se observaron dos productos de PCR de aproximadamente 340pb y 250pb correspondientes a los productos de los genes *cps Ia* y *cps Ib*. Las cepas utilizadas como controles positivos para la amplificación fueron las ubicadas con la clave 2243 y 2220 *cps Ia* y *cps Ib* respectivamente.

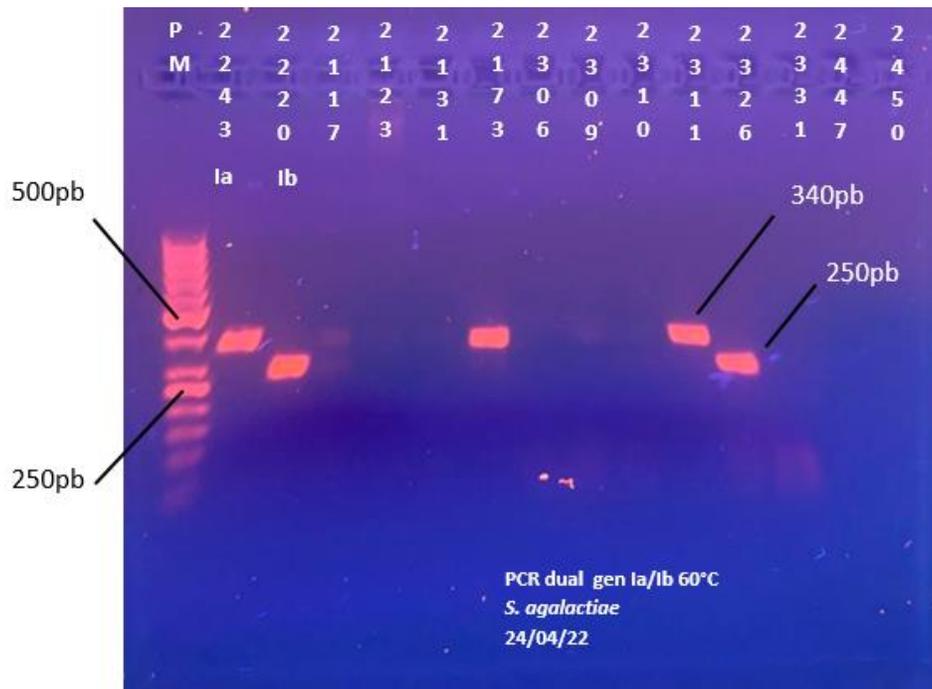


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1.7% de los amplificados de PCR *cps Ia* y *cps Ib* (PCR dual). PM: Marcador de peso molecular de 50 pb. (Thermo-Scientific®)

En la PCR individual se realizó la amplificación para los genes *cps II*, *cps IV* y *cps VI*, cuyos tamaños aproximados son 300pb, 303pb y 290pb respectivamente. Las cepas utilizadas como controles positivos, fueron previamente tipificadas en el laboratorio, ubicadas con las claves 2297 (*cps II*), 2201 (*cps IV*) y 2105 (*cps VI*). (Figura 16, 17 y 18 respectivamente)

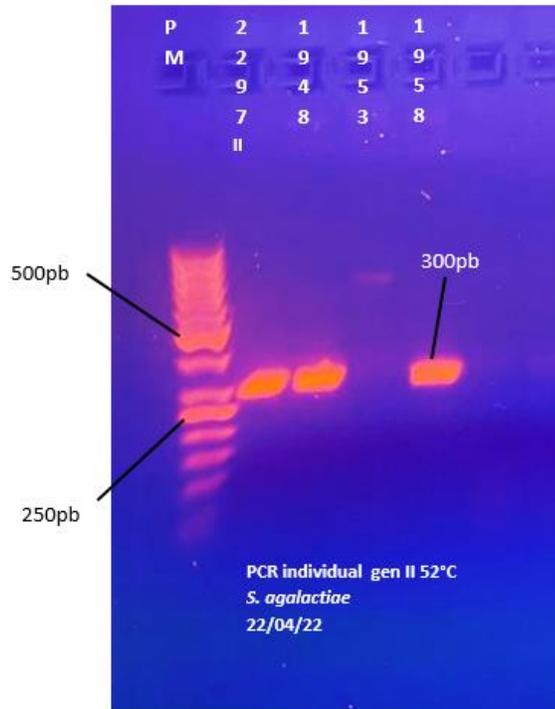


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1.7% de los amplificados de PCR *cps II* (PCR individual). PM: Marcador de peso molecular de 50 pb. (Thermo- Scientific®).

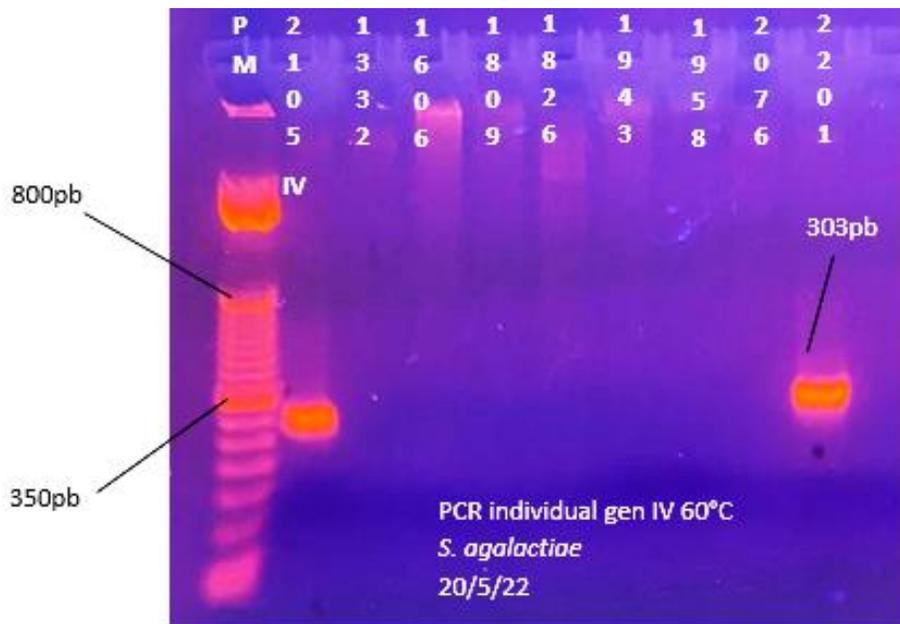


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.7% de los amplificados de PCR *cps IV* (PCR individual). PM: Marcador de peso molecular de 50 pb. (Invitrogen®)

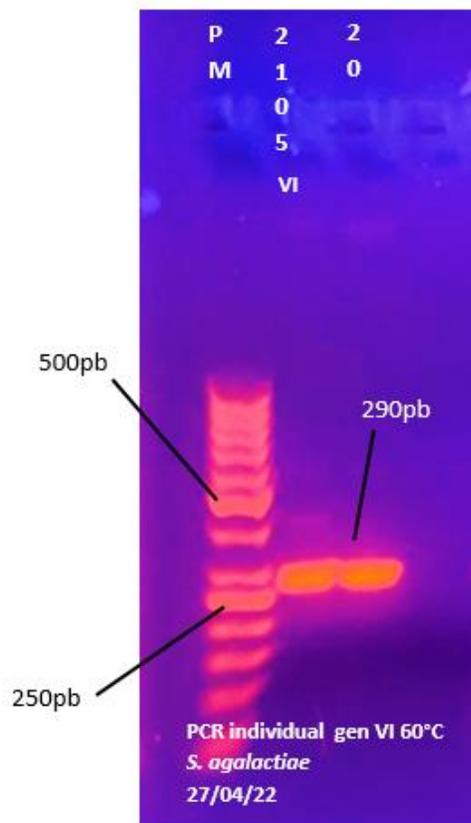


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.7% de los productos de PCR de *cps VI* (PCR individual). PM: Marcador de peso molecular de 50 pb. (Thermo-Scientific®)

La distribución de las 372 cepas provenientes de aislamientos vaginales (2007-2011) se muestra en la figura 19, se observa que el año 2009 tiene un mayor porcentaje (35%) de las cepas totales, seguido de 2010 (27.4%), 2008 (14.2%), 2011 (13.5%) y 2007 (9.9%).

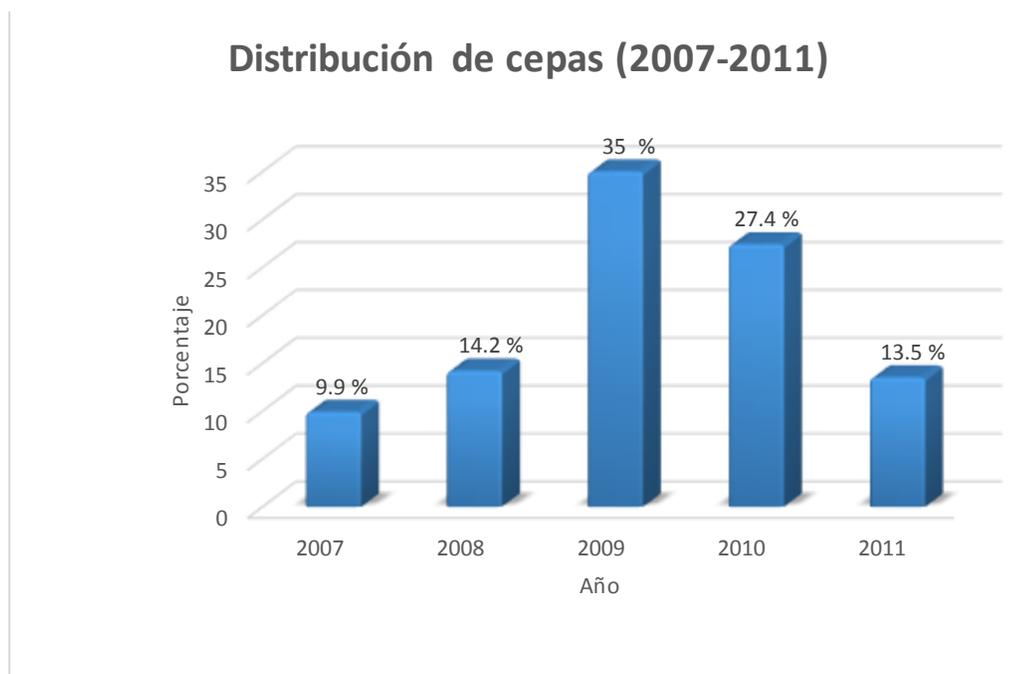


Figura 19. Distribución de las 372 cepas pertenecientes a aislamientos vaginales en un periodo de 5 años (2007-2011)

La distribución de los tipos capsulares de las 372 cepas tipificadas se muestra en la tabla 14 y Figura 20, donde se obtuvo que los tipos capsulares con mayor prevalencia son el **Ia** (33%) y **V** (33%), seguido de **III** (13.7%), **Ib** (11.3%), **II** (7.8%), **IV** (0.8%) y **VI** (0.4%). No se encontraron cepas de tipo **VII**, **VIII** y **IX**.

Tabla 14. Distribución de los tipos capsulares (2007-2011)

Año	Tipos capsulares							Total
	Ia	Ib	II	III	IV	V	VI	
2007	16	6	1	4	0	9	1	37
2008	22	2	4	7	0	18	0	53
2009	41	14	11	18	1	45	0	130
2010	29	13	10	12	2	36	0	102
2011	15	7	3	10	0	15	0	50
Total	123	42	29	51	3	123	1	372

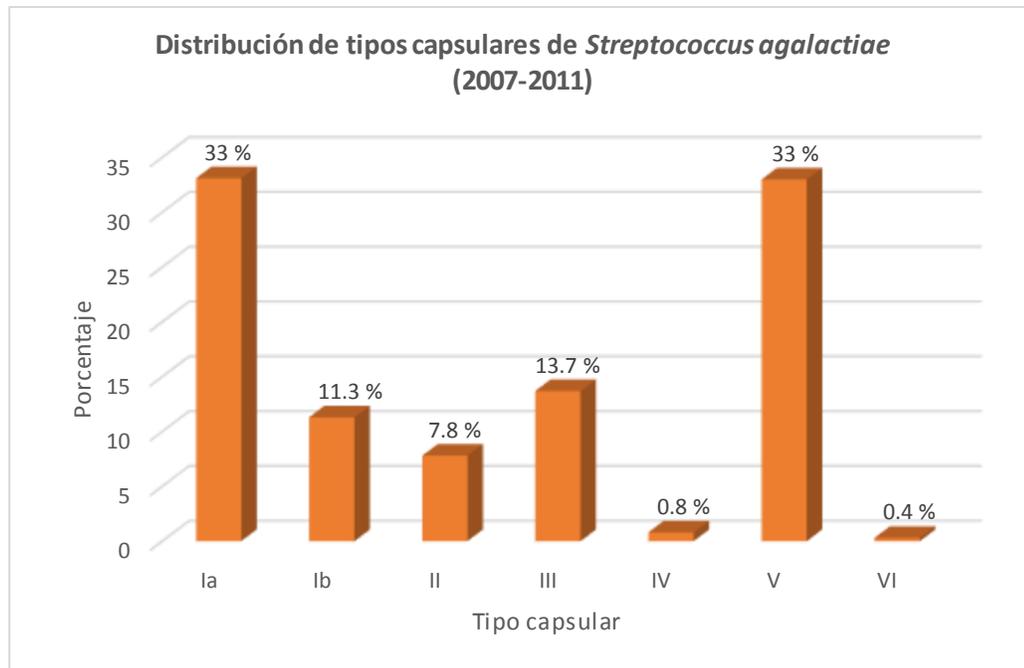


Figura 20. Distribución de los tipos capsulares de *Streptococcus agalactiae* (2007-2011)

La distribución de las cepas pertenecientes al año 2007 se muestra en la figura 21, donde se observa que el tipo capsular predominante es el **Ia** (43.3%), seguido de **V** (24.3%), **Ib** (16.2%), **III** (10.8%), **II** (2.7%) y **VI** (2.7%), no se obtuvo el tipo capsular **IV** (0%).

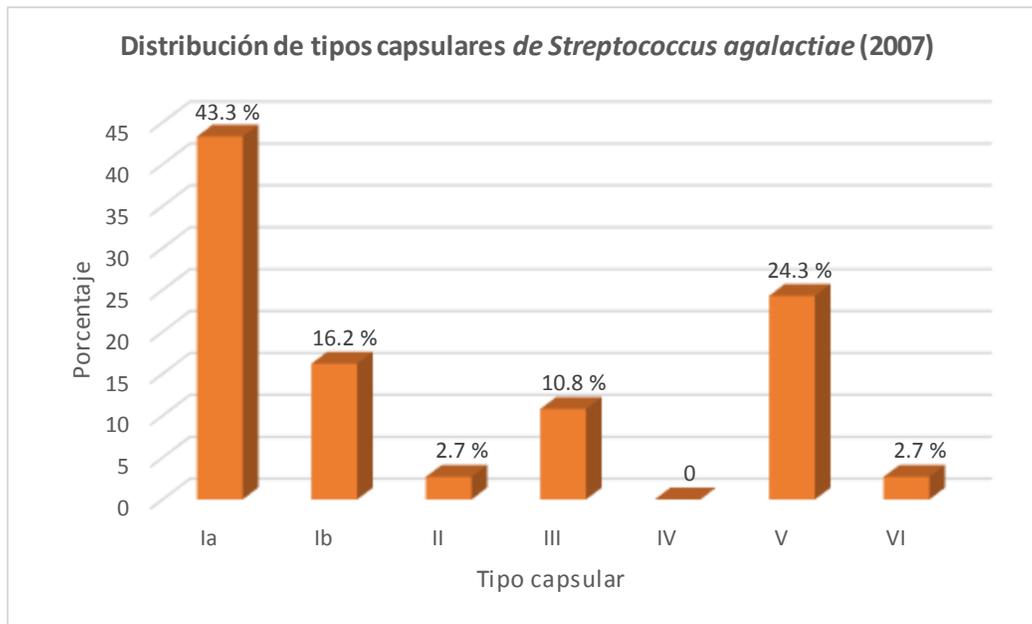


Figura 21. Distribución de los tipos capsulares de *Streptococcus agalactiae* en el año 2007

La distribución de las cepas pertenecientes al año 2008 se muestra en la figura 22, se observa que el tipo capsular predominante es el **Ia** (41.5%), seguido de **V** (34%), **III** (13.2%), **II** (7.5%) y **Ib** (3.8%), no se obtuvieron los tipos capsulares **IV** y **VI** (0%).

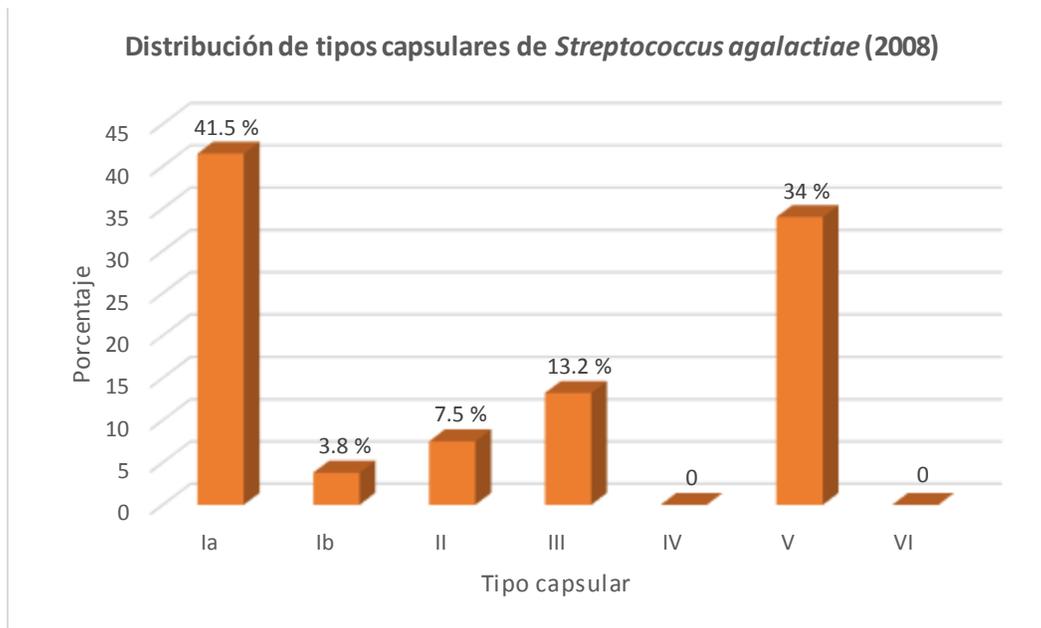


Figura 22. Distribución de los tipos capsulares de *Streptococcus agalactiae* en el año 2008

La distribución de las cepas pertenecientes al año 2009 se muestra en la figura 23, se observa que el tipo capsular predominante es el **V** (34.6%), seguido de **Ia** (31.5%), **III** (13.8%), **Ib** (10.8%), **II** (8.5%) y **IV** (0.8%), no se obtuvo el tipo capsular **VI** (0%).

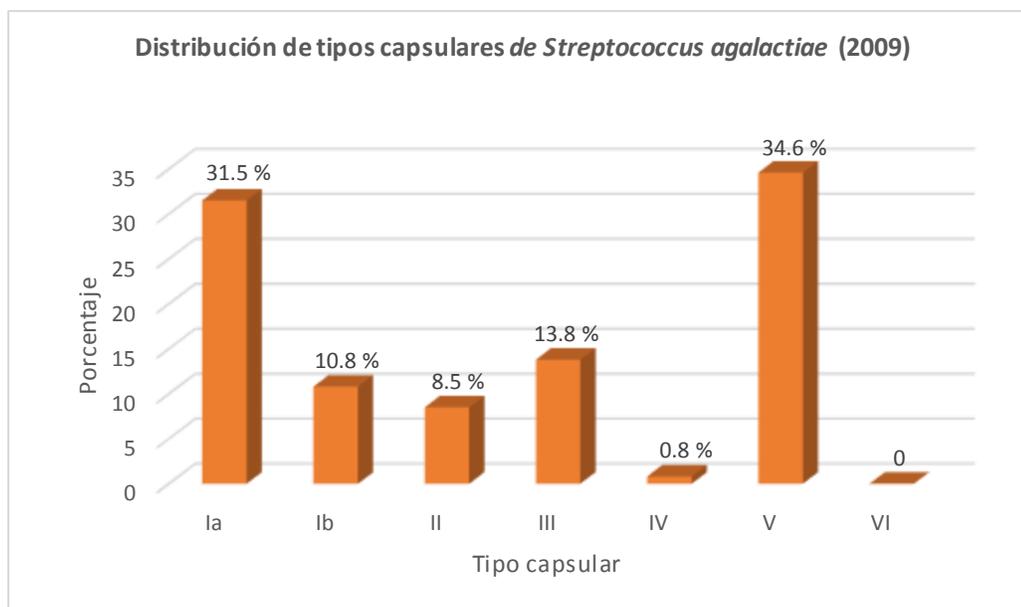


Figura 23. Distribución de los tipos capsulares de *Streptococcus agalactiae* en el año 2009.

La distribución de las cepas pertenecientes al año 2010 se muestra en la figura 24, se observa que el tipo capsular predominante es el **V** (35.3%), seguido de **Ia** (28.4%), **Ib** (12.7%), **III** (11.8%), **II** (9.8%) y **IV** (2%), no se obtuvo el tipo capsular **VI** (0%).

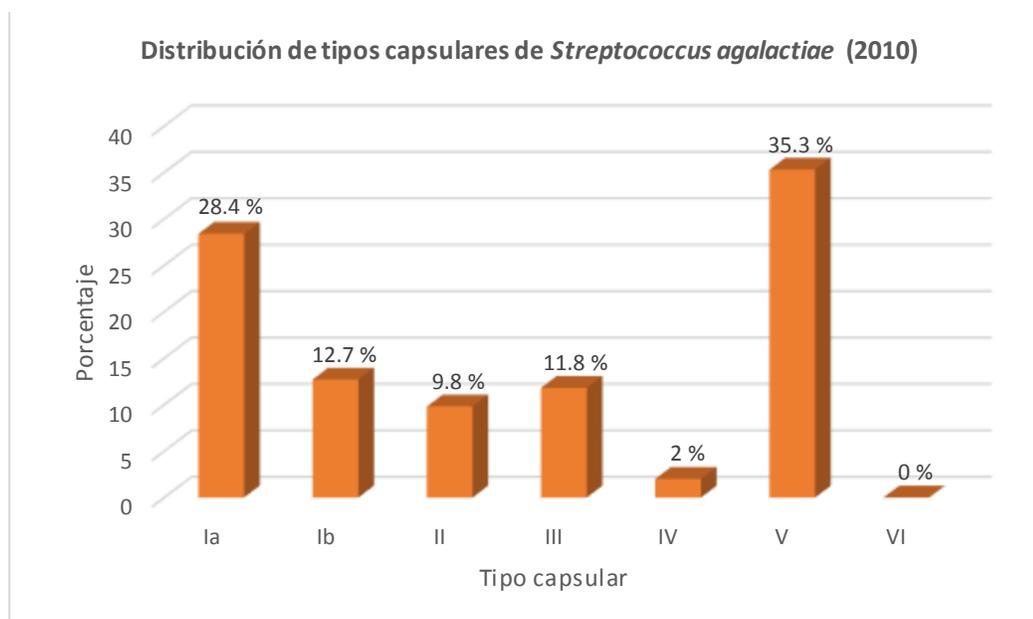


Figura 24. Distribución de los tipos capsulares de *Streptococcus agalactiae* en el año 2010

La distribución de las cepas pertenecientes al año 2011 se muestra en la figura 25, donde se observa que los tipos capsulares predominantes son el **Ia** (30%) y **V** (30%), seguido de **III** (20%), **Ib** (14%), **II** (6%), no se obtuvieron los tipos **IV** y **VI** (0%).

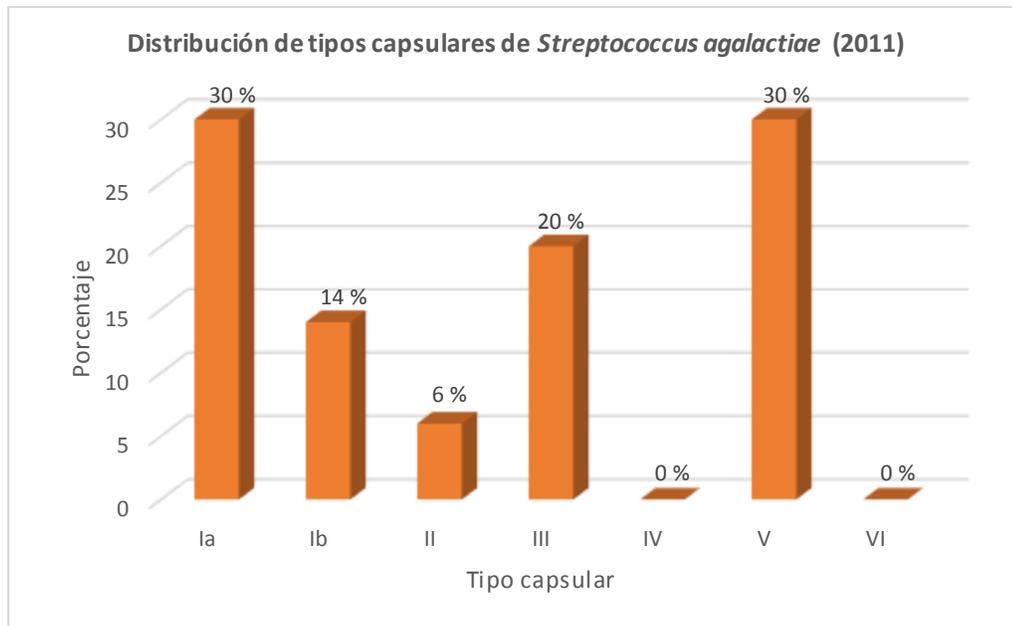


Figura 25. Distribución de los tipos capsulares de *Streptococcus agalactiae* en el año 2011.

La distribución de los tipos capsulares de *S. agalactiae* en cepas pertenecientes a nuestra población de estudio, cuyo dato de edad de las pacientes estaba reportada, se encontró que en el grupo de 15-30 años el tipo **Ia** representó el 40% de los aislamientos mientras que el tipo **V** no fue identificado, en pacientes de 31-45 años los tipos más frecuentes son el **Ia** y **V** (37.5% y 32%) respectivamente, en el grupo de 46-60 años predominan los tipos **V**, **Ia** y **III** (31.5%, 30.1%, 15.3%) respectivamente y finalmente en mujeres >60 años el tipo **V** es el más frecuente con el 43.8% y **Ia** solo 25%. El tipo **III** mantuvo una frecuencia semejante en los 4 grupos de edad. (Figura 26)

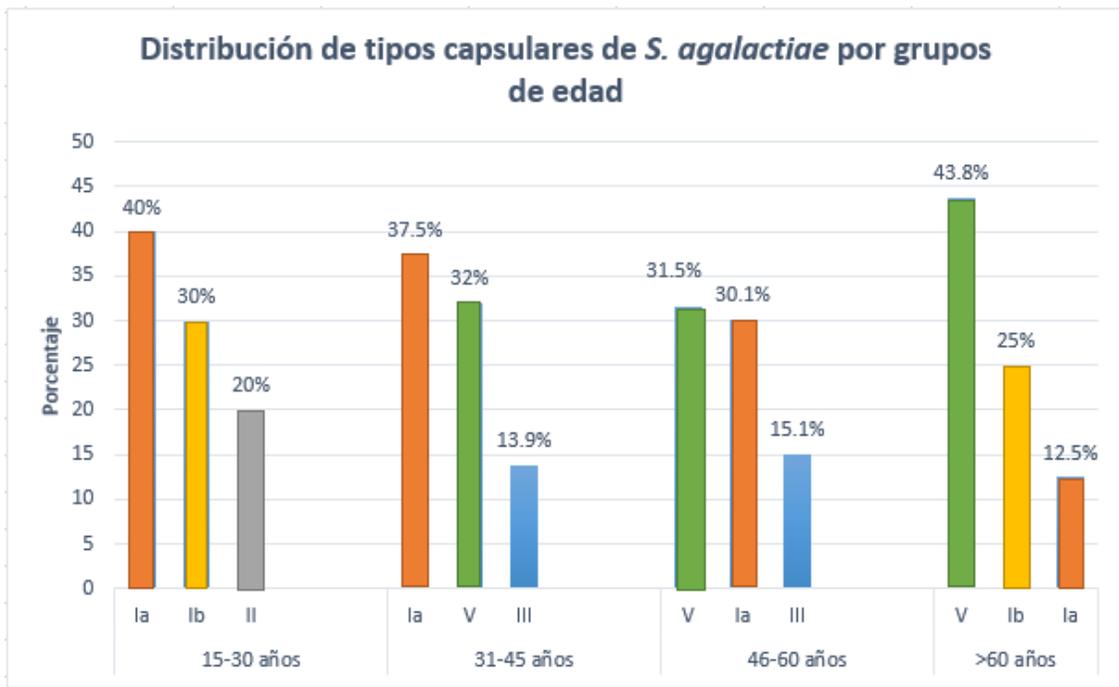


Figura 26. Distribución de tipos capsulares de *S. agalactiae* por grupos de edad.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La distribución del tipo capsular de las 372 cepas provenientes de aislamientos vaginales tipificadas mediante PCR, mostraron que los tipos capsulares predominantes en nuestra población de estudio fueron el **Ia** (33%) y **V** (33%), seguido de **III** (13.7%), **Ib** (11.3%), **II** (7.8%), **IV** (0.8%) y **VI** (0.4%) (Figura 20 y tabla 13). En un estudio realizado en el año 2000 en mujeres embarazadas provenientes de los Altos, Chiapas [28] se obtuvo que el tipo capsular con mayor prevalencia fue el **I** (67.9%), seguido del tipo **II** (19.2%) y **III** (12.8%). Otro estudio realizado en 2004 en la Ciudad de México [66], indicó que el tipo capsular más frecuente fue el **I** (58.8%), seguido de **II** (29.4%), **III** (5.9%) y cepas no tipificables (5.9%). En 2017 se realizó un estudio en el centro del país [38] obteniendo que el tipo capsular predominante fue el **I** (48.6%), con una creciente participación del tipo **III** (32.9%).

Según lo reportado en los estudios anteriores el tipo capsular **I (Ia+ Ib)**, tiene una mayor prevalencia, seguido del capsular **II** y **III**, lo cual comparado con nuestros resultados es similar siendo que el tipo capsular **Ia** es el que presenta un mayor porcentaje, pero el tipo **II**, ha tenido una disminución del 20% con respecto a años anteriores, adquiriendo una mayor relevancia el **V** y **III**, además de reportar la presencia de cepas con los tipos capsulares **IV** y **VI**.

A nivel mundial según un estudio publicado en 2017 [45], indicó que los tipos capsulares **Ia**, **Ib**, **II**, **III**, **IV** y **V** representan el 98% de los aislamientos de EGB colonizadores, donde el tipo **III** es predominante con el 25%, pero es menos frecuente en América Central, América del Sur y Asia, lo que es similar con nuestros resultados ya que este capsular tiene un menor porcentaje comparado con otros tipos capsulares. En una revisión global reciente de aislamientos invasivos se demostró que el serotipo **III** es el más frecuentemente identificado en todas las regiones que disponen de datos (48.9%), seguido por los serotipos **Ia** (22.9%), **V** (9.1%), **Ib** (7%) y **II** (6.2%).

Esta información es relevante ya que el tipo capsular **III** ha sido asociado con la enfermedad invasiva en recién nacidos y una menor presencia del mismo en nuestro estudio indica una menor incidencia de este padecimiento. Por otra parte en países como Estados Unidos y regiones de África Occidental los tipos **Ia** y **V** respectivamente son los que tienen una mayor predominancia, lo cual resulta ser semejante con nuestros datos.

La infección neonatal por *S. agalactiae* se ha dividido en síndrome de inicio temprano (EOD) y síndrome de inicio tardío (LOD), las cuales también representan un aspecto importante para la investigación de nuevas vacunas ya que se han relacionado con algunos tipos capsulares [21]. Para el caso de EOD **la** es predominante con un 36%, seguido de **III** (32%) y para LOD el tipo **III** es el más frecuente con un 70%, seguido de **la** (15%) y según nuestro estudio **la** es el tipo capsular predominante por lo que puede representar un riesgo para la manifestación de EOD.

La importancia de la vigilancia de la distribución de los tipos capsulares de *S. agalactiae* radica en la búsqueda e implementación de una vacuna que brinde protección a nivel mundial y con los riesgos mínimos para las pacientes afectadas, pero actualmente eso ha significado un reto ya que la mayoría de las vacunas en desarrollo se basan en la utilización de los tipos capsulares frecuentes (**la-V**), dejando de lado otros tipos como **VI**, **VII** y **VIII** que son más frecuentes en regiones como Asia. Sin embargo en México podría aplicarse porque según estudios realizados en nuestro país junto con nuestros datos indican que los tipos **la-V** son predominantes.

En la tabla 15, se muestra la variación que han presentado los tipos capsulares en el periodo (2007-2011), obteniendo que el tipo capsular **la** ha venido disminuyendo en cuanto a predominancia, pero sigue siendo el más frecuente, seguido del tipo **V** que aumento en el año 2008 y se ha mantenido constante (32-35%), el tipo **IV** apareció en el 2009 y 2010 (0.8-2%) pero con poca prevalencia y por último el tipo capsular **VI** que se presentó en 2007 (2.7%) pero ya no volvió a aparecer.

Tabla 15. Variación porcentual de los tipos capsulares de *S. agalactiae* (2007-2011)

	la	V	III	Ib	II	IV	VI
2007	43.3	24.3	10.8	16.2	2.7	0	2.7
2008	41.5	34	13.2	3.8	7.5	0	0
2009	31.5	34.6	13.8	10.8	8.5	0.8	0
2010	28.4	35.3	11.8	12.7	9.8	2	0
2011	30	30	20	14	6	0	0

En un estudio semejante realizado en el año 2010 [67] en el Hospital de Gineco Obstetricia No.4 “Luis Castelazo Ayala” con 102 cepas tipificadas provenientes de aislamientos vaginales, se reportó la distribución capsular de *S. agalactiae*, los tipos capsulares con mayor prevalencia fueron **V** y **la** con el 42.4% y 18.9% respectivamente, seguido del tipo **Ib** y **II** con 12.3% y **III**, **VI**,

VI con el 11.3%, 1.9% y 0.9% respectivamente. Mientras que en nuestro estudio con 106 cepas pertenecientes al 2010 del Hospital General “Dr. Gonzalo Castañeda Escobar” del ISSSTE, se encontró que los tipos capsulares predominantes fueron el **V** y **la** con el 35.3% Y 28.4% respectivamente, seguido de **lb**, **III**, **II**, **IV** con el 12.7%, 11.8%, 9.8% y 2% respectivamente. No se reportó el tipo capsular **VI**.

Por lo que haciendo una comparación de estos datos (Figura 27) se puede observar que la distribución de los tipos capsulares es muy semejante en cuanto a que los tipos **V** y **la** son los más frecuentes, seguidos de los tipos **lb**, **II**, **III** y **IV** que se mantuvieron con porcentajes parecidos. Sin embargo, en las cepas tipificadas del Hospital General “Dr. Gonzalo Castañeda Escobar” no se reportó el tipo **VI**.

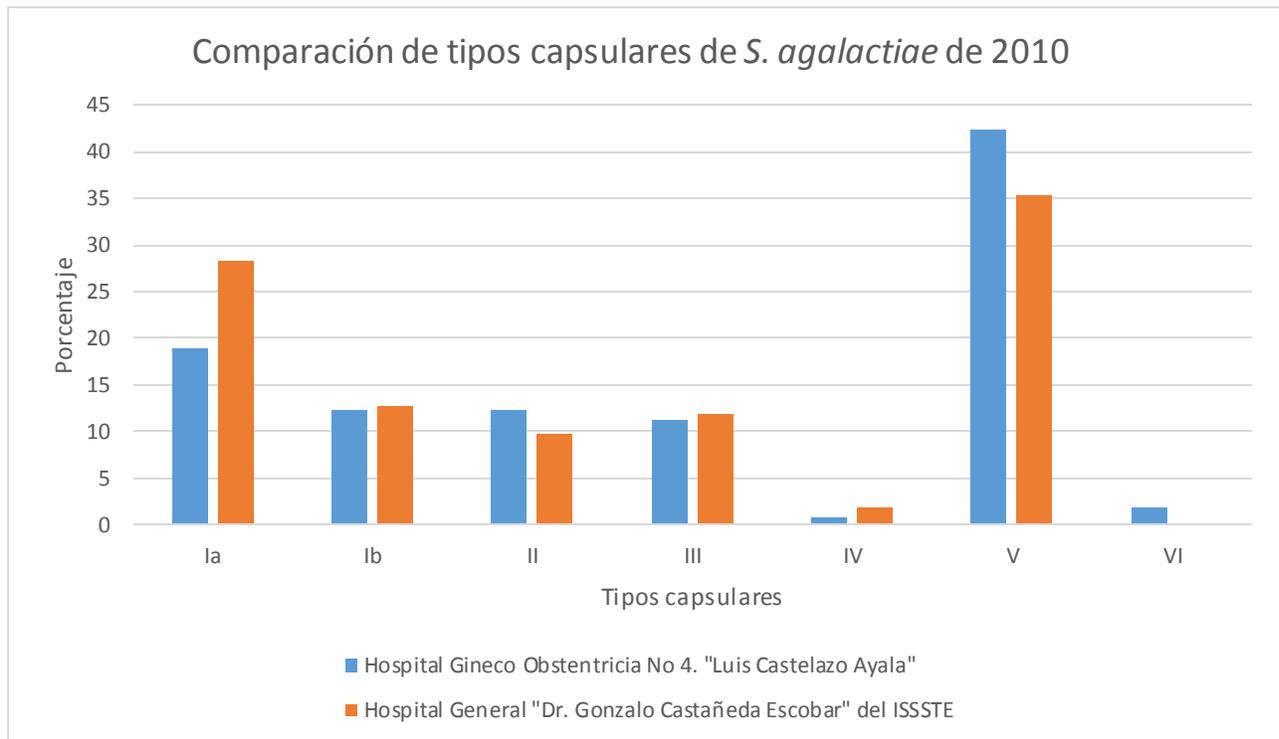


Figura 27. Comparación de los tipos capsulares de cepas de *S. agalactiae* provenientes de aislamientos vaginales del año 2010 del Hospital de Gineco Obstetricia No.4 “Luis Castelazo Ayala” y Hospital General “Dr. Gonzalo Castañeda Escobar” del ISSSTE.

En un estudio publicado en el año 2010 en un centro de atención médico (Madigan) ubicado en Washington, Estados Unidos [48] se encontró que en mujeres de 18-40 años de edad, los tipos capsulares de *S. agalactiae* predominantes fueron el **Ia**, **III** y **V** con un 28.5%, 27.1% y 16.9% respectivamente, mientras que en estudio más reciente realizado en Sao Paulo, Brasil [68] se reportó que en mujeres de 17-50 años, los tipos capsulares más frecuentes fueron el **Ia** y **V** con un 35.1% y 34.1% respectivamente, lo que es similar en comparación con nuestros resultados (Figura 27), teniendo que los tipos **Ia**, **V** y **III** son predominantes en los grupos de 15-60 años con un 34.2%, 29.7% y 13.6% respectivamente, lo que es importante ya que en los últimos años el tipo capsular **V**, ha ido en aumento, con respecto a otros tipos capsulares en América del Norte y América Latina.

En un estudio realizado en el año 2000 en México [66] se encontró que en aislamientos pertenecientes a gestantes de 18-43 años de edad, los tipos capsulares más frecuentes fueron **I (Ia/Ib)**, seguido de **II** y **III** con 58.8%, 29.4% y 5.9%, mientras que el tipo **V** no fue identificado, lo que indica que el tipo capsular **Ia** ha mantenido una frecuencia semejante comparado con nuestros resultados, mientras que el serotipo **II**, ha ido disminuyendo en comparación con los tipos **V** y **III** que aumentaron su frecuencia respecto a ese estudio.

Son necesarios más estudios en mujeres embarazadas tomando en cuenta la edad para tener un mayor conocimiento sobre que grupos son más susceptibles a ciertos tipos capsulares de *S. agalactiae* con el fin de mejorar las estrategias de prevención.

10. CONCLUSIONES

- Los tres tipos capsulares más frecuentes en nuestra población de estudio fueron el **Ia** (33%), **V** (33%) y **III** (13.7%).
- En nuestro estudio no se encontraron los tipos capsulares **VII**, **VIII** y **IX**
- El tipo capsular **V** aumentó en comparación con el tipo capsular **III**, mientras que el tipo capsular **II** disminuyó su frecuencia en comparación con estudios realizados en diferentes regiones del país.
- El tipo capsular **Ia** representa un riesgo por su elevada frecuencia para la manifestación de síndrome de inicio temprano en nuestra población.
- La distribución capsular en un estudio similar realizado fue semejante a la reportada en nuestro estudio.
- El tipo capsular **Ia** tiene una mayor frecuencia en mujeres entre 15-45 años, mientras que el tipo capsular **V** en mayores de 46 años.
- La distribución capsular de *Streptococcus agalactiae* en México ha cambiado a lo largo del tiempo, por lo que es necesario realizar más estudios para establecer datos que ayuden al desarrollo de vacunas como medida de prevención.

11. REFERENCIAS

- [1] Molina, J., López, R., & Sánchez, J. T. (2019). **Microbiología y Parasitología Médicas de Tay** (5ª ed.). Méndez Editores, S.A. de C.V.
- [2] Ryan, K. J., Ray, C. G., Ahmad, N., Drew, W. L., & Plorde, J. J. (2018). **Sherris. Microbiología médica** (7ª ed.). Mc Graw Hill.
- [3] Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., Janda, W. M., Koneman, E. W., & Schreckenber, D. C. (2017). **Koneman. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas en color** (7ª ed.). LWW
- [4] Carrol, K. C., Morse, S. A., Mietzner, T., & Miller, S. (2016). **Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología Médica** (27ª ed.). McGraw- Hill Education.
- [5] Vanegas, M. C. (2015). **Guías para el laboratorio de bacteriología** (1ª ed.). Universidad de los Andes.
https://www.google.com.mx/books/edition/Gu%C3%ADas_para_el_laboratorio_de_bacteriolo/DPJ8EA_AAQBAJ?hl=es&gbpv=1
- [6] Curtis, S. N., & Krause, R. M. (1964). **Immunochemical studies on the specific carbohydrate of group G streptococci.** *J Exp Med*, 119(6), 997-1004. 10.1084/jem.119.6.997
- [7] Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. A. (2014). **Microbiología médica** (7ª ed.). Elsevier Saunders.
- [8] López, J. A., & Campuzano, G. (2013). **Streptococcus agalactiae en gestantes. Diagnóstico y profilaxis.** *Medicina&Laboratorio*, 19(7-8), 311-336.
<https://medicinaylaboratorio.com/index.php/myl/article/view/233>
- [9] Perea, L. M. (2015). Género *Streptococcus*. En Molina, J., & Manjarrez, M. E. (Eds.), **Microbiología. Bacteriología y Virología**. (2ª ed., pp. 173- 185). Méndez editores
- [10] Yao, K., Poulsen, K., Maione, D., Rinaudo, C. D., Baldassarri, L., Telford, J. L., Skov, U. B., & Kilian, M. (2013). **Capsular gene typing of Streptococcus agalactiae compared to serotyping by latex agglutination.** *J Clin Microbiol*, 51(2). 503-507. <https://doi.org/10.1128/jcm.02417-12>
- [11] Brigtsen, A. K., Dedi, L., Melby, K. K., Holberg, M., Radtke, A., Valso, R., Lima, L., Flem, A., Fugelseth, D., & Whitelaw, A. (2015). **Comparison of PCR and serotyping of group B Streptococcus in pregnant women: The Oslo GBS-study.** *J Microbiol Methods*, 108(2015). 31-35.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.11.001>
- [12] Kong, F., Gowan, S., Martín, D., James, G., & Gilbert, G. (2002). **Serotype identification of group B streptococci by PCR and sequencing.** *J Clin Microbiol*, 40(1). 216- 226.
<https://doi.org/10.1128/jcm.40.1.216-226.2002>
- [13] Imperi, M., Pataracchia, M., Alfaron, G., Baldassarri, L., Orefici, G., & Creti, R. (2010). **A multiplex PCR assay for the capsular type (Ia-IX) of Streptococcus agalactiae.** *J Microbiol Methods*, 80(2). 212-214. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.11.010>

[14] Universidad de Salamanca. **Pruebas de identificación**. Departamento de microbiología y genética. Recuperado el 18 de octubre de 2022, de <http://edicion-micro.usal.es/web/identificacion/AyudaPruebas.html>

[15] García, R., & Cordoba, R (1988). **Manual ilustrado para laboratorio de bacteriología y micología veterinaria** (1ra ed.). Red Interamericana de laboratorios de salud animal. <https://books.google.com.mx/books?id=RbEqAAAAYAAJ&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>

[16] Alós, J. I., Andreu, A., Arribas, L., Cabero, L. de Cueto López, M., López, J., Melchor, J. C., Puertas, A., de la Rosa, M., Salcedo, S., Sánchez, M., Sánchez, M. J., & Torrejon, R. (2013). **Prevención de la infección perinatal por estreptococo del grupo B. Recomendaciones españolas. Actualización 2012. Documento de consenso SEIMC/SEGO/SEN/ SEQ/SEMFYC**. *Enferm Infecc Microbiol Clín*, 31(3), 159–172. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.03.013>

[17] Rosa, M., Rodríguez, J., Cueto- López, M., Sampedro, A., Gaye, E. B., Haro, J. M., & Andreu, A. (1999). **Use of granada medium to detect group B streptococcal colonization in pregnant women**. *J Clin Microbiol*, 37(8), 2674-2677. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.8.2674-2677.1999>

[18] Montes, M., & García, J. M. (2007). **Género *Streptococcus*: una revisión práctica para el laboratorio de microbiología**. *Enferm Infecc Microbiol*, 25(3), 14-20. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-genero-streptococcus-una-revision-practica-13111833>

[19] Craven, R. R., Weber, C. J., Jennemann, R. A., & Dunne, M. (2010). **Evaluation of chromogenic agar for detection of group B streptococcus in pregnant women**. *J Clin Microbiol*, 48(9), 3370-3371. <https://doi.org/10.1128/jcm.00221-10>

[20] Toyohisa, M., Dongyun, F., Kamio, Y., Kanno, I., Somaya, T., Imai, K., Inoue, M., Fujiwara, M., & Miyauchi, A. (2014). **Evaluation of chromID strepto B as a screening media for *Streptococcus agalactiae***. *BCM Infect Dis*, 14(46), 1-4. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-46>

[21] *S. agalactiae*, agar Granada, Biomerieux. Recuperado el 5 de febrero de 2023, de <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/55-granada-agar>

[22] *S. agalactiae*, ChromID Strepto B (STRB), Biomerieux. Recuperado el 5 de febrero de 2023, de <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/55-granada-agar>

[23] Paoletti, L. C & Kasper, D. L. (2019). **Surface Structures of Group B *Streptococcus* Important in human immunity**. En Fischetti, V. A., Novick, R. P., Ferretti, J. J., Portnoy, D. A & Rood, J. I (Eds.), **Gram- Positive Pathogens** (3ª ed., pp. 204-227). ASM Press.

[24] Maisey, H.C., Doran, K.S., & Nizet, V. (2008). **Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence**. *Expert Rev Med*, 10(e7), 1-18. <https://doi.org/10.1017/S1462399408000811>

[25] Oviedo, P., Pegels, E., Laczeski, M., Quiroga, M., & Vergara, M. (2013). **Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. First study in a province of Argentina**. *Braz J Microbiol*, 44(1), 253- 258. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000030>

[26] Caraffini, A., Nóbile, C., Figueroa, M., & Costamagna, R. (2007). **Streptococcus agalactiae** como responsable de patologías distintas a las materno neonatales. *Bioquim Patol Clin*, 71(1), 31-35. <https://www.redalyc.org/pdf/651/65111118005.pdf>

[27] Silva, N. Andrade, L. M., Mestrovic, T., Obiero, C. W., Shan, S., & Castro, T. (2022). **The urgent need to recognize and properly address prenatal- onset group B Streptococcus disease.** *Int J Infect Dis*, 124(2022), 168-170. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.10.016>

[28] Ocampo, M., Sánchez, H. J., Nazar, A., Castro, A. E., & Cordero B. (2000). **Factores asociados a la colonización por Streptococcus del grupo B en mujeres embarazadas de los Altos, Chiapas.** *Salud Publ Mex*, 42(5), 413-421. <https://www.saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/6259>

[29] Sad, J., Capellino, F., De Giusto, R., Travella, C., Gómez, F., Kreiker, G., Prats, H., Zarate, A., Vilaro, M., Hernández, D., & Ruiz, G. (2005). **Colonización por estreptococo beta hemolítico del grupo B durante el embarazo y prevención de la enfermedad neonatal.** *Medicina (B. Aires)*, 65(3), 201-206. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S002576802005000300003&lng=es&nrm=iso
o

[30] Palacios, G., Rivera, L. G., Vázquez, M., Caballero, A., Mellado, M. C., Flores, A. S., González, J. A., Herrera, C. G., Osuna, L. E., Hernández, J. A., Vázquez, R., Barron, C., Valladares, R., Treviño, J. D., Alonso, C. A., Ramírez, L., Cerda, R. M., Ortíz, R., Rivera, M. A., Solórzano, F., Castro, J., & Rodríguez, C. (2022). **Genomic analysis of virulence factors and antimicrobial resistance of group B Streptococcus isolated from pregnant women in northeastern Mexico.** *PIOS ONE*, 17(3), 1-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264273>

[31] Campo, C. h., Martínez, M. F., Otero, J. C., & Rincon, G. (2019). **Prevalencia de colonización vaginorrectal por Streptococcus agalactiae y su perfil de sensibilidad en mujeres embarazadas atendidas en un hospital de tercer nivel.** *Biomédica*, 39(4), 689-698. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4514>

[32] Edmond, K. M., Kortsaliouvdak, C., Scott, S., Schrag, S. J., Zaidi, A. K., Cousens, S., & Heath, P. T. (2012). **Group B. streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta- analysis.** *Lancet*, 379(9815), 502-503. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61651-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61651-6)

[33] Tamariz, J. H., Obregón, M., Jara, J. C., Díaz, J., Jefferson, L., & Guerra, H. (2004). **Colonización vaginal y anorrectal por Streptococcus agalactiae en gestantes de los hospitales nacionales Cayetano Heredia y Arzobispo Loayza.** *Rev Med Hered*, 15(3), 144-150. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2004000300005

[34] Verani, J. R., McGee, L., & Schrag, S. J. (2010). **Prevention of perinatal Group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC, 2010.** *MMWR Recomm Rep*, 59(RR10), 1-32. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21088663/>

[35] Flores, K. L., & Gonzales, A. C. (2022). **Infecciones por Estreptococos beta hemolítico del grupo B en recién nacidos** [Tesis de licenciatura. Universidad Nacional de Chimbarazo]. <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/8687>

[36] Puopolo, K. M., Lynfield, R., & Cummings, J. J. (2019). **Management of infants at risk for group B streptococcal disease.** *Pediatrics*, 144(2), 1-17. <https://doi.org/10.1542/peds.2019-1881>

- [37] Palacios, G. C., Hernández, T.I., Rivera, L. G., Briones, E., Caballero, A., Vázquez, J. M., Amador, G. I., García, R., Solórzano, F., & Rodríguez, C. (2017). **Infección perinatal por estreptococo del Grupo B: panorama global, en América Latina y en México.** *Gac Med Mex*, 153(3), 361-370. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=74777>
- [38] Bernardino, M., Ortiz, R., Álvarez, R., Cabanillas, L., García, P., & Ramos, J. T. (2011). **Sepsis neonatal tardía por estreptococo del Grupo B. Transmisión a través de lactancia materna.** *Rev Enferm Infec Pediatr*, 25(97), 17-21. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=43141>
- [39] Ramos, J. M., Blázquez, R. M., Ramírez, C., & Moreno, S. (2001). **Man with fever, pain and functional limitation of the right shoulder.** *Enferm Infec Microbiol Clin*, 39(3), 206-208. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11446911>
- [40] Centro para el control y prevención de enfermedades. [En línea]. **Información acerca del estreptococo del grupo B.** [Fecha de consulta 9 de Noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/groupbstrep/about/increased-risk>
- [41] Blázquez, J. L., Martínón, G., & Pérez, A. (2004). **Meningitis por *Streptococcus agalactiae* en el anciano.** *Rev Esp Geriatr Gerontol*, 39(3), 206-208. [https://doi.org/10.1016/S0211-139X\(04\)74956-2](https://doi.org/10.1016/S0211-139X(04)74956-2)
- [42] Delgado, K. J., González, R., Castro, I., Bennett, G., & De la Cruz, C. (2020). **Tamizaje del estreptococo del grupo B durante el embarazo. Conducta actual en un centro de tercer nivel.** *Ginecol Obstet Mex*, 88 (2), 127-129. <https://doi.org/10.24245/gom.v88i2.3716>
- [43] Shabayek, S., & Spellergerg, B. (2018). **Group B streptococcal colonization, molecular characteristics and epidemiology.** *Front Microbiol*, 9(437), 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00437>
- [44] Lemire, P., Houde, M., Lecours, M., Fittipaldi, N., & Segura, M. (2012). **Rol of capsular polysaccharide in group B *Streptococcus* interactions with dendritic cells.** *Microbes infect*, 14(12), 1064–1076. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.05.015>
- [45] Russell, N. J., Seale, A. C., O' Driscoll, M., O' Sullivan, C., Bianchi, F., Gonzalez, J., Lawn, J. E., Baker, C. J., Bartlett, L., Cutland, C., Gravett, M. G., Heath, P. T., Lee Doare, K., Madhi, S. A., Rubens C.E., Scharg, S., Sobanjo, A. Vekemans, J., & Saha, S. K. (2017). **Maternal colonization with group B *Streptococcus* and serotype distribution worldwide: Systematic review and Meta- analyses.** *Clin Infect Dis*, 65(Suppl2), 100-111. <https://doi.org/10.1093/cid/cix658>
- [46] Slotved, H. C., Kong, F., Lambertsen, L., Sauer, S., & Gilbert, G. L. (2007). **Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype.** *J Clin Microbiol*, 45(9), 2929–2936. <https://doi.org/10.1128/jcm.00117-07>
- [47] Johri, A. K., Paoletti, L. C., Glaser, P., Dua, M., Sharma, P. K., Grandi, G., & Rappuoli, R. (2006). **Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development.** *Nat Rev. Microbiol*, 4(12), 932–942. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1552>
- [48] Ippolito, D. L., James, W. A., Tinnemore, D., Huang, R. R., Dehart, M. J., Williams, J., Wingerd, M. A., & Demonds, S. T. (2010). **Group B streptococcus serotype prevalence in reproductive- age women at a tertiary care military medical center relative to global serotype distribution.** *BMC infect. Dis*, 10(336), 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-336>

- [49] Lamagni, T. L., Keshishian, C., Efstratiou, A., Guy, R., Henderson, K. L., Broughton, K., & Sheridan, E. (2013). **Emerging trends in the epidemiology of invasive group B streptococcal disease in England and Wales, 1991-2010.** *Clin Infect Dis*, 57(5), 682–688. <https://doi.org/10.1093/cid/cit337>
- [50] Melin, P., & Efstratiou, A. (2013). **Group B streptococcal epidemiology and vaccine needs in developed countries.** *Vaccine*, 31(Suppl 4), 31-42. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.012>
- [51] Amin, A., Abdulrazzaq, Y. M., & Uduman, S. (2002). **Group B streptococcal serotype distribution of isolates from colonized pregnant women at the time of delivery in United Arab Emirates.** *J infect*, 45(1), 42–46. <https://doi.org/10.1053/jinf.2001.0990>
- [52] Shabayek, S., Abdalla, S., & Abouzeid, M, H. (2014). **Serotype and surface protein gene distribution of colonizing group B *Streptococcus* in women in Egypt.** *Epidemiol Infect*, 142(1), 208–210. <https://doi.org/10.1017/S0950268813000848>
- [53] Karunakaran, R., Sajjad, N., Hafeez, A & Puthuchery, S. (2009). **Group B *Streptococcus* infection: epidemiology, serotypes, and antimicrobial susceptibility of selected isolates in the population beyond infancy (excluding females with genital tract- and pregnancy-related isolates at the University Malaya Medical Centre, Kuala Lumpur.** *Jpn J infect Dis*, 62(3). 192–194. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19468178/>
- [54] Dhanoa, A., Karunakaran, R., & Puthuchery, S. D. (2010). **Serotype distribution and antibiotic susceptibility of group B streptococci in pregnant women.** *Epidemiol Infect*, 138(7), 979–981. <https://doi.org/10.1017/S0950268809991105>
- [55] Lachenauer, C. S., Kasper, D. L., Shimada, J., Ichiman, Y., Ohtsuka, H., Kaku, M., Paoletti, L. C., Ferrieri, P., & Madoff, L. C. (1999). **Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women.** *J infect Dis*, 179(4), 1030–1033. <https://doi.org/10.1086/314666>
- [56] Matsubara, K., Katayama, K., Baba, K., Nigami, H., Harigaya, H., & Sugiyama, M. (2002). **Seroepidemiologic studies of serotype VIII group B *Streptococcus* in Japan.** *J infect Dis*, 186(6). 855–858. <https://doi.org/10.1086/342411>
- [57] Puertas, A., Lara, A., Liebana, C., Rodriguez, J., Cobo, F., Sampedro, A., Gutiérrez, J., Manzanares, S., Cueto, M., Rosa, M., & Navarro, J. M. (2017). ***Streptococcus agalactiae*: prevención y desarrollo de vacunas.** *Rev Esp Quimioter*, 30(5), 312-318. <https://seq.es/wpcontent/uploads/2017/10/puertas25sep2017.pdf>
- [59] Pertuz, Y. B., & González, G. E. (2020). **Eficacia de una prueba molecular en el diagnóstico de *Streptococcus agalactiae* en pacientes gestantes de la ciudad de Santa Marta (Colombia).** *Rev Salud Uninorte*, 36(2), 425-435. <https://doi.org/10.14482/sun.36.2.618.2>
- [60] Chinchilla, A. L., Orozco, A., Calvo, K., & Ibarra, R. A. (2021). **Aspectos relevantes de la infección por *Streptococcus agalactiae*.** *Rev Ciencia y Salud*, 5(3), 95-107. <https://doi.org/10.34192/cienciaysalud.v5i3.242>
- [61] Chichilla, N. M. (2016). ***Streptococcus agalactiae*, detección y manejo intraparto.** *Rev Med Cos Cent*, 73(618), 161-164. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenl.cgi?IDARTICULO=66684>

- [62] Heath, P. T. (2016). **Status of vaccines research and development of vaccines for GBS.** *Vaccine*, 34 (26), 2876-2879. <https://doi.org/10.1016/j.vacuna.2015.12.072>
- [63] Villena, R., & Bastias, M. (2020). **Priorización de nuevas vacunas e innovación al servicio de estrategias de vacunación.** *Rev Méd Clín Las Condes*, 31(3), 343-351. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2020.03.006>
- [64] World Health Organization. [En línea]. **Product development for vaccines advisory committee.** [Fecha de consulta 12 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/immunization/research/committees/pdvac/en/>
- [65] Hanh, B. A., de Grer, B., Kassel, M. N., Bijlsma, M. W., Leewen, E., Wouters, M. G., Ende, A., de Beek, D., Wallinga, J., Hanhe, S. J., & Hoek, A. J.(2021). **Cost-effectiveness of maternal immunization against neonatal invasive Group B. *Streptococcus* in Netherlands.** *Vaccine*, 39(21), 2876-2885. <https://doi.org/10.1016/j.vacuna.2021.04.001>
- [66] Villaseñor, A., Morales, P., Palacios, G., & Solórzano, F. (2004). **Prevalencia de *Streptococcus agalactiae* del serotipo III en embarazadas.** *Ginecol Obstet Mex*, 72(3). 103-108. <https://ginecologiayobstetricia.org.mx/articulo/prevalencia-de-streptococcus-agalactiae-del-serotipo-iii-en-embarazadas>
- [67] Hernandez, S. (2016). **Tipificación capsular de *Streptococcus agalactiae* en aislamientos clínicos y su asociación a resistencia antimicrobiana.** [Tesina de obtención del grado de especialidad en bioquímica clínica, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2016/diciembre/0754005/Index.html>
- [68] de Avila, R., Campos, A. C., Ura, E. J., Trevizani, T., López, C., & Yin, L. (2021). **Capsular genotype distribution of group B *Streptococcus* colonization at-risk pregnant women in Sao Paulo, Brazil.** *Braz J Infect Dis*, 25(3), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2021.101586>

ANEXO I. Resultado de la tipificación de las cepas analizadas.

Clave	Tipo capsular	Clave	Tipo capsular	Clave	Tipo capsular	Clave	Tipo capsular
1286	V	1480	la	1662	la	1747	la
1287	VI	1481	V	1664	V	1748	V
1288	la	1482	la	1665	V	1749	lb
1290	la	1484	V	1666	V	1750	III
1321	la	1485	V	1667	V	1751	la
1322	la	1486	III	1668	V	1752	V
1323	V	1487	II	1669	V	1753	II
1325	la	1488	la	1670	la	1754	la
1326	V	1489	V	1671	III	1755	III
1327	III	1491	lb	1672	V	1756	la
1329	la	1566	la	1673	la	1771	la
1331	V	1598	V	1674	V	1772	II
1332	V	1599	la	1690	V	1774	III
1346	la	1600	V	1691	lb	1775	II
1347	III	1601	la	1692	la	1778	la
1348	V	1602	la	1693	V	1781	V
1349	la	1603	la	1695	lb	1784	V
1350	V	1604	V	1696	III	1785	V
1351	V	1607	V	1698	V	1787	V
1352	la	1608	la	1700	lb	1790	III
1353	II	1609	la	1701	III	1791	la
1354	lb	1610	III	1708	V	1792	II
1356	III	1611	V	1709	la	1794	V
1357	la	1612	la	1710	II	1800	III
1361	la	1613	III	1711	II	1801	III
1362	lb	1614	V	1713	III	1804	la
1363	la	1617	V	1714	la	1807	la
1364	lb	1620	la	1715	la	1834	V
1409	lb	1621	III	1716	V	1835	V
1410	la	1623	la	1717	V	1837	V
1411	V	1624	II	1718	V	1838	la
1412	lb	1625	la	1719	la	1839	la
1413	la	1627	lb	1720	la	1840	la
1414	III	1644	V	1722	la	1841	lb
1415	la	1645	II	1723	lb	1842	V
1417	lb	1647	II	1724	V	1843	la
1420	la	1649	la	1725	lb	1844 ^a	V
1461	V	1650	la	1738	la	1844 ^b	la
1462	III	1651	V	1739	lb	1845	II
1464	la	1654	V	1740	la	1846	III
1465	la	1655	III	1741	la	1855	V
1466	V	1656	V	1742	V	1856	lb
1467	III	1657	la	1743	II	1857	la
1470	la	1658	V	1744	V	1858	V
1475	la	1660	lb	1745	la	1859	V
1478	la	1661	la	1746	V	1860	III

Controles positivos	Clave
la	2243
lb	2220
II	2297
III	1017
IV	2201
V	2092
VI	2105

Clave	Tipo capsular						
1862	III	1955	V	2121	Ib	2248	Ia
1863	V	1956	V	2123	II	2249	III
1864	III	1957	V	2124	V	2250	Ia
1865	Ia	1958	II	2127	III	2251	Ia
1866	Ia	1959	V	2131	II	2252	Ia
1883	V	1960	Ia	2169	Ia	2253	III
1884	Ia	1961	V	2170	Ib	2254	Ia
1886	II	1962	V	2171	V	2255	V
1887	V	1964	III	2172	Ia	2256	V
1888	Ia	1972	Ia	2173	Ia	2257	Ib
1894	V	1973	Ib	2174	V	2258	V
1896	Ib	1974	Ia	2175	Ia	2259	V
1897	IV	1978	Ia	2176	II	2261	Ia
1898	III	1979	III	2177	Ia	2262	Ib
1899	V	1980	V	2178	Ia	2267	V
1900	Ia	1981	V	2179	V	2268	Ia
1901	Ia	1982	Ib	2180	Ib	2269	V
1902	Ia	1983	III	2181	Ia	2270	Ia
1904	III	1984	V	2214	V	2271	V
1911	Ib	2000	Ia	2215	V	2272	V
1912	III	2001	Ib	2216	V	2273	V
1916	II	2002	Ia	2217	V	2355	III
1917	Ia	2003	Ia	2218	V	2357	V
1919	Ia	2004	III	2219	II	2358	Ib
1931	V	2005	V	2220	Ib	2359	V
1932	V	2006	Ia	2221	Ia	2360	Ia
1933	III	2007	V	2222	V	2361	Ia
1934	Ib	2008	V	2223	V	2362	V
1935	V	2009	Ia	2224	IV	2363	Ib
1936	V	2010	V	2225	Ib	2400	III
1937	Ib	2011	Ib	2226	V	2401	V
1938	Ia	2012	III	2227	Ia	2402	III
1939	II	2053	Ia	2228	II	2403	V
1940	V	2054	Ia	2229	V	2404	III
1941	Ia	2055	III	2230	V	2405	III
1942	V	2056	IV	2231	V	2406	III
1943	Ia	2057	Ib	2232	Ia	2407	Ib
1944	III	2058	Ia	2233	V	2408	Ib
1945	V	2059	III	2234	V	2409	III
1946	V	2062	Ia	2235	Ia	2412	Ia
1948	II	2064	Ib	2239	Ia	2446	III
1949	V	2065	III	2240	Ib	2447	II
1950	Ia	2066	Ib	2241	V	2448	Ib
1951	V	2117	II	2242	II	2450	II
1952	V	2118	III	2244	Ia	2452	II
1953	Ia	2119	Ia	2245	Ia	2453	Ia
1954	III	2120	II	2247	V	2454	Ia

