



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL DEPARTAMENTO
DE SALUD PÚBLICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA, U.N.A.M.**

**TIPIFICACIÓN CAPSULAR DE *Streptococcus agalactiae* EN
AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y SU ASOCIACIÓN A RESISTENCIA
ANTIMICROBIANA.**

**TESINA QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA
PRESENTA:**

Q.F.B. SANDRA GABRIELA HERNÁNDEZ GUZMÁN

**DIRECTOR DE TESINA:
M. EN C. LUIS MANUEL PEREA MEJÍA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2016



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: DR. JOSÉ MOLINA LÓPEZ

VOCAL: M. EN C. MARÍA DE LOS ÁNGELES GRANADOS SILVESTRE

SECRETARIO: M. EN C. MARÍA GUADALUPE ORTIZ LÓPEZ

PRIMER SUPLENTE: DRA. MÓNICA VIVEROS ROGEL

SEGUNDO SUPLENTE: M. EN C. MARÍA DEL CONSUELO VELÁZQUEZ ACOSTA

**TRABAJO REALIZADO EN LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA,
U.N.A.M.**

**ASESOR DEL TEMA: _____
M. EN C. LUIS MANUEL PEREA MEJÍA**

**SUSTENTANTE: _____
Q.F.B. SANDRA GABRIELA HERNÁNDEZ GUZMÁN**

RESUMEN

Streptococcus agalactiae (estreptococo del grupo B, SGB) es la principal causa de enfermedades severas como meningitis y septicemia en los recién nacidos y en una gran variedad de enfermedades en mujeres embarazadas, no embarazadas y personas de edad avanzada o con enfermedades subyacentes como diabetes, cáncer, cirrosis hepática, tratamiento con corticoesteroides, infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y otros estados de inmunodeficiencia. Los SGB son clasificados de acuerdo con diez tipos capsulares existentes. La cápsula es el principal factor de virulencia, se ha observado que la distribución y la prevalencia de estos grupos capsulares varía en determinadas zonas geográficas. El uso generalizado de antibióticos ha favorecido el incremento de la resistencia antimicrobiana y por lo tanto una reducción en la eficacia de los tratamientos tradicionales, con lo que se vuelve fundamental la vigilancia de la resistencia antimicrobiana. El objetivo del presente trabajo fue determinar la distribución y frecuencia de los tipos capsulares así como la relación con su resistencia antimicrobiana en la población de estudio.

Se determinaron los tipos capsulares de 134 cepas de SGB provenientes de exudados vaginales, urocultivos y de la secreción de una herida quirúrgica posparto recolectados durante el 2010 en el Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 "Luis Castelazo Ayala" del IMSS. La determinación de los tipos capsulares se realizó utilizando la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la amplificación de los ácidos nucleicos de los genes que codifican para los diversos tipos de polisacárido capsular (***cpsIa***, ***cpsIb***, ***cpsII***, ***cpsIII***, ***cpsIV***, ***cpsV***, ***cpsVI***, ***cpsVII*** y ***cpsVIII***). Se encontró que el tipo capsular **V** (41.8%) fue el predominante, seguido del **Ia** y **III** (17.9% y 14.9% respectivamente) y finalmente el **II**, **Ib**, **VI** y **IV** (con el 12.7%, 9.7 %, 2.2% y 0.7% respectivamente).

Además fue caracterizado el perfil de resistencia antimicrobiana para estas mismas cepas a diez antibióticos utilizando la técnica de difusión en agar, Kirby Bauer. Las cepas fueron en su mayoría sensibles a levofloxacina, cloranfenicol, quinupristina-dalfopristina, penicilina,

vancomicina, oxacilina y ceftizoxima. Hay presencia de una resistencia a eritromicina del 11.2%, a clindamicina del 14.8% y a tetraciclina del 76.1%.

Nuestros resultados muestran que la distribución de los tipos capsulares en la población de estudio es la misma que la reportada como global, a pesar de que las frecuencias son diferentes. Las cepas con tipos capsular **III** y **V** son las que tienen mayor resistencia a tetraciclina, eritromicina y clindamicina. Conocer la distribución capsular y los perfiles de resistencia antimicrobiana contribuye al desarrollo de estrategias para la prevención y tratamiento de infecciones por *Streptococcus agalactiae*.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	III
ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE CUADROS	IX
ABREVIATURAS.....	X
INTRODUCCIÓN	12
Características del género <i>Streptococcus</i>	12
Clasificación de los estreptococos	13
<i>Streptococcus agalactiae</i>	16
Características morfológicas y de cultivo	16
Factores de virulencia de <i>Streptococcus agalactiae</i>	16
Identificación de <i>Streptococcus agalactiae</i>	21
Métodos serológicos.....	21
Métodos no serológicos.....	21
Prueba de hidrólisis de hipurato de sodio.	21
Prueba de CAMP	22
Clasificación	23
Clasificación serológica	23
Importancia clínica	25
Infecciones en hombres y mujeres no embarazadas	25
Colonización e infecciones en mujeres embarazadas	26
Infecciones en recién nacidos	26
Epidemiología	28
Vacunación como estrategia de prevención de enfermedades invasivas por SGB.....	30
Diagnóstico	31
Tratamiento	32
Antibióticos.....	34
Generalidades de antibióticos	34
Resistencia a antimicrobianos	36
Resistencia antimicrobiana en <i>Streptococcus agalactiae</i>	37
JUSTIFICACIÓN.....	40
HIPÓTESIS.....	41
OBJETIVOS.....	41
Objetivo general.....	41
Objetivos particulares.....	41
MATERIAL Y MÉTODOS	42
Población	42
Criterios de inclusión	42
Figura 12. Diagrama de flujo general de trabajo.....	43

Identificación de las cepas	44
Prueba de CAMP	44
Determinación del carbohidrato "C" de grupo de Lancefield por coaglutinación en látex.....	45
Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana mediante la técnica de Kirby Bauer	46
Tipificación capsular mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa	48
Extracción de ADN.....	48
Tipificación molecular por PCR	49
RESULTADOS.....	53
Identificación de <i>S. agalactiae</i>	53
Susceptibilidad antimicrobiana	53
Tipificación capsular de <i>S. agalactiae</i>	56
Relación entre la resistencia antimicrobiana y los tipos capsulares de <i>S. agalactiae</i>	61
DISCUSIÓN.....	66
Susceptibilidad antimicrobiana	66
Distribución del tipo capsular.....	69
Relación entre la resistencia antimicrobiana y los tipos capsulares de <i>S. agalactiae</i>	71
CONCLUSIONES.....	75
REFERENCIAS	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura [1].	Estreptococos teñidos mediante tinción de Gram agrupados en cadenas.	12
Figura [2].	Patrones de hemólisis sobre agar sangre suplementado al 5% con sangre de carnero.	14
Figura [3].	Mecanismos de adherencia celular e invasión de SGB.	19
Figura [4].	Mecanismos de evasión del sistema inmune de SGB.	20
Figura [5].	Prueba de la hidrólisis del hipurato de sodio.	22
Figura [6].	Prueba de CAMP.	23
Figura [7].	Esquema recomendado de profilaxis antibiótica intraparto para la prevención de EOD por el SGB.	33
Figura [8].	Esquema de tratamiento y prevención de las infecciones neonatales por SGB.	34
Figura [9].	Mecanismo de acción de los principales antimicrobianos.	35
Figura [10].	Mecanismos de resistencia antimicrobiana.	37
Figura [11].	Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala” del IMSS	42
Figura [12].	Diagrama de flujo general de trabajo.	43
Figura [13].	Imágenes de la prueba de CAMP positiva para EGB.	45
Figura [14].	Reacción de coagulación en látex positiva para SGB.	46
Figura [15].	Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana.	47
Figura [16].	Diagrama de temperaturas utilizadas en la PCR.	50
Figura [17].	Porcentaje de resistencia de acuerdo con el mecanismo de acción de los antibióticos.	53
Figura [18].	Porcentaje de resistencia antimicrobiana de acuerdo con el origen clínico de la muestra.	55
Figura [19].	Electroferograma en gel de agarosa al 1.7% de los amplificadores de PCR <i>cfb</i> , <i>cpsIII</i> y <i>cpsV</i> .	57
Figura [20].	Electroferograma en gel de agarosa al 1.7% de los amplificadores de PCR <i>cpsIa</i> y <i>cpsIb</i> .	57
Figura [21].	Electroferograma en gel de agarosa al 1.7% de los amplificadores de PCR <i>cpsII</i> (A), <i>cpsIV</i> (B) y <i>cpsVI</i> (C).	58
Figura [22].	Distribución general porcentual del tipo capsular de SGB.	59
Figura [23].	Distribución porcentual de los tipos capsulares de acuerdo con su origen clínico.	60
Figura [24].	Distribución de los tipos cps de cepas resistentes a tetraciclina.	64
Figura [25].	Distribución de los tipos cps de cepas resistentes a eritromicina.	65

Figura [26]. Distribución de los tipos cps de cepas resistentes a clindamicina.

65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro [1].	Clasificación de estreptococos.	15
Cuadro [2].	Factores de virulencia de <i>Streptococcus agalactiae</i> asociados con el mecanismo de adherencia.	17
Cuadro [3].	Factores de virulencia de <i>Streptococcus agalactiae</i> asociados con el mecanismo de invasión del tejido.	18
Cuadro [4].	Factores de virulencia de <i>Streptococcus agalactiae</i> asociados con el mecanismo de evasión de la respuesta inmune.	18
Cuadro [5].	Características clínicas de la infección neonatal por SGB.	27
Cuadro [6].	Comparación de la distribución de los tipos capsulares en el mundo.	30
Cuadro [7].	Estatus del desarrollo actual de vacunas candidatas contra SGB.	31
Cuadro [8].	Mecanismo de resistencia antimicrobiana.	36
Cuadro [9].	Resistencia antimicrobiana de SGB en el mundo.	38
Cuadro [10].	Origen clínico de las muestras.	42
Cuadro [11].	Lista de antibióticos utilizados en las pruebas de susceptibilidad y criterios de clasificación de resistencia.	48
Cuadro [12].	Temperaturas de alineamiento para cada gen amplificado.	50
Cuadro [13].	Composición de la mezcla de reacción utilizada en la PCR.	51
Cuadro [14].	Secuencia nucleotídica de los primers utilizados.	51
Cuadro [15].	Tamaño de los productos de PCR amplificados.	52
Cuadro [16].	Frecuencia y porcentaje de resistencia antimicrobiana obtenida para las 134 cepas de <i>S. agalactiae</i> .	54
Cuadro [17].	Frecuencia y porcentaje de resistencia para cada antibiótico de acuerdo con su origen clínico.	55
Cuadro [18].	Frecuencia y distribución general porcentual de los tipos capsulares.	59
Cuadro [19].	Frecuencia y distribución porcentual de los tipos capsulares de acuerdo con su origen clínico.	60
Cuadro [20].	Relación entre la resistencia antimicrobiana y los tipos capsulares de <i>S. agalactiae</i> .	61
Cuadro [21].	Relación general del tipo capsular y el perfil de resistencia antimicrobiana.	62

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
ACP	Antígeno alfa de la proteína C
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPs	Péptidos antimicrobianos
<i>Bac</i>	Gen que codifica para el antígeno beta de la proteína C
<i>bca</i>	Gen que codifica para el antígeno alfa de la proteína C
BibA	Adhesina BibA, de unión a C3bp componente de la vía clásica del complemento
c.b.p.	Cuanto baste para
C3b	Opsonina que forma parte de la cascada del complemento
C5a	Molécula quimioatrayente del complemento
CAMP	Referente a la proteína o factor de CAMP, por las iniciales de los apellidos de sus autores iniciales Christie, Atkins y Munch-Petersen
CDC	Centros para la prevención y control de enfermedades
<i>cfb</i>	Gen del factor de CAMP
CIM	Concentración mínima inhibitoria
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPS	Polisacárido capsular
DHF	Dihidrofolato
dNTPs	Deoxinucleótidostrifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EOD	Enfermedad de comienzo temprano por sus siglas en inglés Early onset disease
<i>erm</i>	Gen de resistencia antimicrobiana a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B, codifica una metilasa responsable de la metilación del ARNr 23s
FbsA	Proteína adhesina FbsA, de unión a fibrinógeno
FbsB	Proteína adhesina FbsB, de unión a fibrinógeno
g	Gramo(s)
GAG	Glucosaminoglicano
GAPDH	Enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
h	hora(s)
<i>hylb</i>	Gen que codifica para la proteína hialuronatoliasa
IAP	Profilaxis antibiótica intraparto
IgA	Inmunoglobulina humana tipo A
IL-8	Interleucina 8
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IV	Vía intravenosa
<i>lin</i>	Gen de resistencia antimicrobiana <i>linB</i> , codifica para enzimas inactivantes de lincosamidas
Lmb	Proteína adhesina Lmb, de unión a laminina
LOD	Enfermedad de comienzo tardío por sus siglas en inglés Late onset disease
LrrG	Proteína adhesina LrrG
LTA	Ácido lipoteicoico
MEC o ECM	Matriz extracelular
<i>mef</i>	Gen de resistencia antimicrobiana a macrólidos, codifica para una bomba de flujo de macrólidos

mg	Miligramo(s)
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mL	Mililitro(s)
MLS _B	Fenotipo con resistencia cruzada a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B.
MLVA	Análisis multilocus de repeticiones en tándem de número variable
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NaCl	Cloruro de sodio
NICE	Instituto Nacional de Excelencia Clínica
PABA	Ácido 4-aminobenzoico
pb	Pares de bases
PBP	Proteína de unión a penicilina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
QRDR	Regiones determinantes de resistencia a quinolonas
<i>rib</i>	Gen que codifica para la proteína Rib
RNA	Ácido ribonucleico
RNV	Recién nacidos vivos
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SA	Semana de amenorrea
<i>scpB</i>	Gen que codifica para la proteína de superficie ScpB
SGA	Estreptococos del grupo A, <i>S. pyogenes</i>
SGB o EGB o GBS	Estreptococo del grupo B, <i>Streptococcus agalactiae</i>
SODA	Enzima super óxido dismutasa
Spb1	Proteína invasina Spb1
Srr-1	Proteína adhesina Srr-1, de unión a keratina 4 humana
SSI	Solución salina isotónica
TBE	Tris, borato, EDTA
<i>tet</i>	Gen de resistencia antimicrobina a tetraciclinas, mediante la protección ribosomal y la expulsión activa del antibiótico
THF	Tetrahidrofolato
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colonias
UNICEF	Fondo para la Infancia de las Naciones Unidas
UV	Ultravioleta
V	Volt
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
µg	Microgramo(s)
µL	Microlitro(s)

INTRODUCCIÓN

Características del género *Streptococcus*

Los estreptococos son bacterias grampositivas capsuladas con morfología de cocos, pertenecientes a la familia *Streptococcaceae* (Figura 1). De manera característica se agrupan en pares o cadenas durante su multiplicación, la longitud de las cadenas puede variar desde un solo par, hasta cadenas continuas de más de 30 células, dependiendo de la especie y de las condiciones de desarrollo [1, 2].

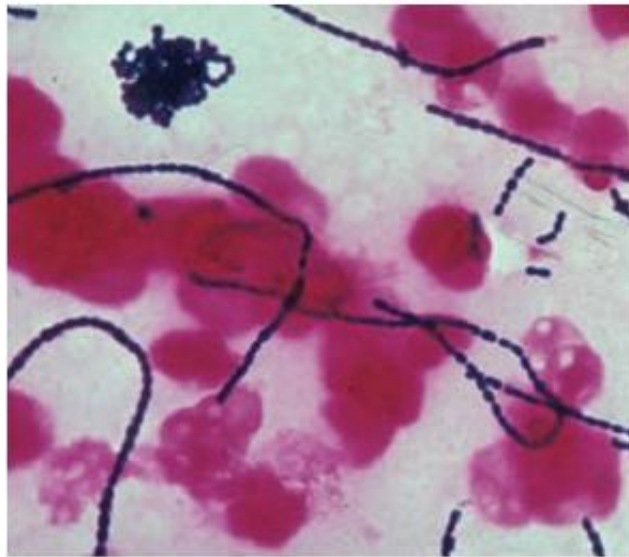


Figura 1. Estreptococos desarrollados en hemocultivo que muestran cocos gram positivos en cadenas. [1]

La mayoría de las especies son anaerobios facultativos, algunos crecen únicamente en una atmósfera enriquecida con dióxido de carbono (crecimiento capnófilico). Sus exigencias nutricionales son complejas y su aislamiento requiere del uso de medios enriquecidos con sangre de carnero o suero para satisfacer sus necesidades de crecimiento y sirven además como indicador de los patrones de hemólisis. Son capaces de fermentar carbohidratos, proceso que produce ácido láctico (homofermentadores), además de ser catalasa y oxidasa negativos [2, 3].

Los estreptococos tienen una amplia distribución en la naturaleza. Algunos son miembros de la microbiota normal de los seres humanos, otros están relacionados con enfermedades

humanas importantes atribuibles en parte a la infección por estreptococos, y en parte a la sensibilización a ellos [1]. El género incluye tres de los patógenos más importantes de los seres humanos. El estreptococo del grupo A (*S. pyogenes*) principal agente etiológico de la faringitis estreptocócica, que puede conducir a escarlatina, fiebre reumática y cardiopatía reumática; el estreptococo del grupo B (*S. agalactiae*) que es la causa más común de septicemia en los recién nacidos y el neumococo (*S. pneumoniae*) que es uno de los principales agentes causantes de neumonía y meningitis en ancianos y niños [2].

Clasificación de los estreptococos

Como sucede con otros grupos de microorganismos, la clasificación y la taxonomía de los estreptococos y las bacterias similares a *Streptococcus* han cambiado radicalmente con las descripciones de varios géneros nuevos de cocos catalasa negativos [4]. Los estreptococos son un grupo extenso y heterogéneo de bacterias y ningún sistema es suficiente para clasificarlos. No obstante, es imprescindible comprender la clasificación para entender su importancia médica. La clasificación de las especies que componen este género es complicada debido a que se utilizan tres sistemas diferentes parcialmente coincidentes que basan su clasificación en: patrones hemolíticos, propiedades serológicas (de acuerdo a los grupos de Lancefield) y propiedades bioquímicas (fisiológicas) [3].

La clasificación de acuerdo con los patrones hemolíticos en agar sangre de carnero (Figura 2), se debe a que muchos estreptococos pueden hemolizar a los eritrocitos *in vitro* en grados variables. La destrucción completa de los eritrocitos con el aclaramiento del agar sangre alrededor del crecimiento bacteriano se denomina hemólisis β . La lisis incompleta de los eritrocitos con reducción de hemoglobina y la formación de pigmento verde se llama hemólisis α . Otros estreptococos son no hemolíticos [1].

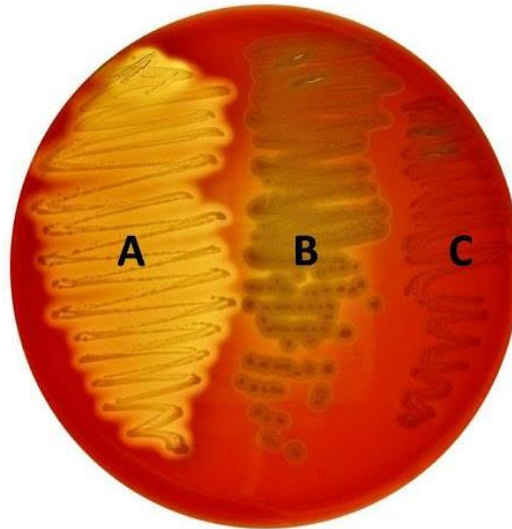


Figura 2. Patrones de hemólisis sobre agar sangre suplementado al 5% con sangre de carnero. A) Crecimiento de *S. pyogenes* que evidencia la hemólisis tipo β . B) Crecimiento de *S. bovis* con hemólisis tipo α . C) Crecimiento de *E. faecalis*, cepa no hemolítica. Pearson Education, I.N.C. 2006

Los estreptococos también son clasificados por serología con base a los antígenos de la superficie celular, hidratos de carbono que constituyen los grupos de Lancefield A a H y K a U [1]. Rebecca Lancefield desarrolló en 1933 el sistema de clasificación serológica para diferenciar a las cepas β -hemolíticas. Los antígenos detectados en el sistema de grupos de Lancefield son polisacáridos de la pared celular (como en los estreptococos humanos de los grupos A, B, C, F y G) o son ácidos lipoteicóicos de la pared celular (estreptococos del grupo D y especies de *Enterococcus*) [4]. La especificidad serológica del hidrato de carbono de cada grupo está determinada por un aminoglucósido. En el caso de estreptococos del grupo A, es ramnosa-N-acetilglucosamina; el grupo B, es ramnosa-glucosamina; para grupo C, es ramnosa-N-acetilgalactosamina; para el grupo D, es el ácido teicoico de glicerol que contiene d-alanina y glucosa; y para el grupo F, es una glucopiranosil-N-acetilgalactosamina [1].

A lo largo de los años se ha vuelto evidente que la posesión de uno de los antígenos de Lancefield define un factor de virulencia del género estreptococo, sin importar los patrones

hemolíticos. Éstos se denominan estreptococos piógenos y en el área médica se les conoce más por la letra asignada por Lancefield que por los nombres de las especies (Cuadro 1) [2].

Cuadro 1. Clasificación de estreptococos [2].

Grupo/Especie	Término común	Hemólisis	Grupo de Lancefield	Proteína de superficie	Cápsula	Factores de virulencia	Enfermedad
Piógenos							
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Estreptococo grupo A (SGA)	β	A	Proteína M	Ácido hialurónico	Proteína M, ácido lipoteicoico, exotoxinas estreptocócicas pirógenas, estreptolisina O, estreptocinasa	Faringitis estreptocócica, impétigo, infecciones piógenas, choque tóxico, fiebre reumática, glomerulonefritis.
<i>S. agalactiae</i>	Estreptococo grupo B (SGB)	β, -	B	-	Ácido siálico	Cápsula	Septicemia neonatal, meningitis, infecciones piógenas
<i>S. equi</i>		β	C	-	-	-	Infecciones piógenas
<i>S. bovis</i>		- , α	D	-	-	-	Infecciones piógenas
Otras especies		β, α, -	E-W	-	-	-	Infecciones piógenas
Neumococos							
<i>S. pneumoniae</i>	Neumococo	α	-	Proteína fijadora de colina	Polisacárido	Cápsula, neumolisina, neuraminidasa	Pulmonía, meningitis, otitis media, infecciones piógenas
Viridans y no hemolíticos							
<i>S. sanguis</i>		α	-	-	-	-	Baja virulencia, endocarditis
<i>S. salivarius</i>		α	-	-	-	-	Baja virulencia, endocarditis
<i>S. mutans</i>		α	-	-	-	-	Caries dental

Los sistemas comerciales para la determinación de grupo serológico de estreptococos utilizan técnicas de extracción enzimática y aglutinación o coaglutinación de partículas en látex para detectar antígenos de Lancefield [4].

Finalmente, las pruebas bioquímicas comprenden reacciones de fermentación de carbohidratos, pruebas para determinar la existencia de enzimas y pruebas de susceptibilidad o resistencia a determinados compuestos químicos. Estas pruebas se utilizan muy a menudo para clasificar estreptococos después del desarrollo de la colonia y de observar las características hemolíticas, así como en la identificación de especies que por lo general no reaccionan en la prueba serológica de Lancefield [1].

Para fines prácticos, el tipo de hemólisis y ciertas reacciones bioquímicas siguen siendo válidos para el reconocimiento inicial y presunta clasificación de los estreptococos. De este modo, la β-hemólisis indica que la cepa tiene uno de los antígenos de los grupos de Lancefield, sin embargo algunas de las cepas o grupos positivos para estos antígenos quizá

sean α -hemolíticos o incluso no hemolíticos. En consecuencia fue propuesta la siguiente clasificación: estreptococos piógenos (grupos de Lancefield); neumococos (*S. pneumoniae*) y estreptococos del grupo viridans y otros estreptococos (Cuadro 1) [2].

Streptococcus agalactiae

Características morfológicas y de cultivo

Streptococcus agalactiae son cocos grampositivos (con un diámetro de 0,6 a 1,2 μ m), se agrupan en cadenas cortas en muestras clínicas y cadenas más largas en cultivo. Son anaerobios facultativos y crecen bien en medios enriquecidos con nutrientes como agar sangre de carnero formando colonias planas de bordes definidos, mucoides y de aspecto cremoso. El 98% de ellos en agar sangre presenta una zona de β -hemólisis estrecha y cerca del 2% son no hemolíticos [3]. Representan al grupo B de la clasificación de Lancefield (SGB). Pueden actuar en el humano como parte de la microbiota o como patógeno. Se encuentran fundamentalmente colonizando el aparato urogenital femenino y la zona inferior del intestino, ocasionalmente también puede encontrarse en la orofaringe [5, 6].

Factores de virulencia de *Streptococcus agalactiae*

SGB comúnmente colonizan adultos sanos, aunque en ciertas condiciones tienen la habilidad de invadir tejidos del hospedero, evadir la respuesta inmune y causar serias enfermedades invasivas como meningitis, septicemia, bacteriemia, neumonía, infecciones óseas, articulares y cutáneas. La capacidad de las cepas de *S. agalactiae* para producir enfermedades depende de la presencia de una amplia variedad de factores de virulencia que contribuyen a la colonización e incidencia de la enfermedad en el huésped. El desarrollo de la enfermedad refleja una colonización exitosa del epitelio vaginal, penetración a la placenta o barreras epiteliales y evasión del sistema inmune permitiendo la supervivencia de la bacteria en la sangre [7, 8].

S. agalactiae tiene varios factores de virulencia entre los cuales se incluyen al antígeno polisacárido capsular (cps), los antígenos alfa y beta de la proteína C, proteínas de superficie como Rib, hialuronidasa y la C5 peptidasa que están codificadas por los genes *bca*, *bac*, *rib*, *hylb*, *scpB*, respectivamente [9, 10].

Diferentes mecanismos de virulencia utilizan los SGB para colonizar el hospedero y causar enfermedades invasivas, entre ellos se encuentran:

- *Adherencia a superficies epiteliales del hospedero (Adhesinas)*. SGB se unen a las células epiteliales de la mucosa vaginal en condiciones de pH bajo, a través de las interacciones de baja afinidad del ácido lipoteicoico de la pared celular con la célula del hospedero y a través de interacciones de mayor afinidad mediadas por proteínas hidrofóbicas de superficie. Dichas interacciones requieren la adhesión de la bacteria a moléculas de la matriz extracelular (MEC) de las células del hospedero tales como fibronectina, fibrinógeno, laminina, unidas a su vez con integrinas (Cuadro 2 y Figura 3).

Cuadro 2. Factores de virulencia de *Streptococcus agalactiae* asociados con el mecanismo de adherencia [7].

Factor de virulencia	Mecanismo de adherencia
Proteína de superficie ScpB	Fija complemento y se une a la fibronectina de la MEC del hospedero.
Proteína Lmb	Unión a laminina.
Proteína FbsA y FbsB	Unión a fibrinógeno.
Proteína Srr-1	Unión a keratina 4.
Proteína LrrG	Adhesina asociada a cepas invasivas unidas al epitelio celular.
Ácido lipoteicoico (LTA)	Asociación de baja afinidad con la célula hospedera.
Pili	Facilita la adhesión y la colonización.

Invasión a través de las barreras epiteliales (Invasinas). Secreción de toxinas o el empleo de factores de virulencia de superficie celular, conocidas como invasinas, para promover la entrada y sobrevivencia dentro de la célula hospedera. Varios de estos factores promueven la invasión mediante el uso de moléculas de la matriz extracelular (MEC) y/o las vías de señales de transducción celulares (Cuadro 3 y Figura 3).

Cuadro 3. Factores de virulencia de *Streptococcus agalactiae* asociados con el mecanismo de invasión del tejido [7].

Factor de virulencia	Mecanismo de invasión
Proteína hialuronidasa	Degrada componentes de la MEC.
Cambios en el citoesqueleto del hospedero	Endocitosis de la bacteria conlleva a vacuolas intracelulares. Rho, familia de GTPasas son manipuladas por la bacteria patógena en la superficie celular para desencadenar la regulación río abajo de la polimerización de actina y rearrreglos del citoesqueleto.
Proteína Spb1	Asociada con la invasión celular en el tipo cps III SGB.
Antígeno alfa de la proteína C	Promueve la internalización de la bacteria al interactuar con el glicosaminoglicano de la superficie de las células hospederas.
β -hemolisina/citolisina	Toxina formadora de poros. Promueve la invasión del epitelio celular y la liberación de IL-8 principal quimioatrayente de neutrófilos.
Enzimagliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	Unión y activación del plasminógeno del hospedero promoviendo la invasión y la propagación sistémica al obtener la capacidad de degradar proteínas de la matriz huésped, tales como la fibronectina.

- *Evasión de la respuesta inmune.* La capacidad de SGB para producir infecciones invasivas refleja presencia de muchos factores de virulencia que permiten a las bacterias resistir a la opsonización, fagocitosis o a la neutralización de la actividad bactericida de los neutrófilos y macrófagos (Cuadro 4 y Figura 4).

Cuadro 4. Factores de virulencia de *Streptococcus agalactiae* asociados con el mecanismo de evasión de la respuesta inmune [7].

Factor de virulencia	Mecanismo de evasión de la respuesta inmune
Unión del SGB al Factor H (Regulador del complemento)	El factor H puede enlazar a C3b a una célula y facilita la degradación enzimática de C3b por el factor I, bloqueando la formación de C3bBb en la vía alterna.
Proteína β	Previene la opsonofagocitosis mediante su unión al factor H.
Polisacárido capsular (cps)	Evasión de la fagocitosis por el ácido siálico en la cápsula.
BibA (Adhesina)	Se une a C3bp, un componente de la vía clásica del complemento, promoviendo resistencia a la muerte fagocítica.
Antígeno β de la proteína C	Se une a IgA humana inhibiendo probablemente la interacción con el complemento.
Proteasa CspA	Tras la producción de productos por escisión de la fibrina, la bacteria es recubierta con dichos productos interfiriendo con la eliminación opsonofagocítica medida por complemento.
Glutación (scavenger) y SODA (super óxido dismutasa) propias	Neutralizar las especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la estallido respiratorio en los fagosomas.
Pigmento carotenoide (scavenger)	Relacionado con el operon <i>cyI</i> (que codifica la citotoxina β -hemolisina/citolisina). Neutraliza peróxido de hidrógeno,

	superóxido, ion hipoclorito y el singulete de oxígeno en la explosión respiratoria dentro del fagosoma.
Incorporación de residuos de D-alanina cargados positivamente a los ácidos teicoicos de la pared celular	El mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos (AMPs) involucra la atracción electrostática por la carga negativa de la superficie de la bacteria, al ser modificada su electronegatividad en consecuencia cambia la afinidad por los AMPs, provocando resistencia a los AMPs producidos por células del sistema inmune.
Inducción de apoptosis a fagocitos	Inducción de apoptosis independiente de caspasas (calpains). Está involucrada la β -hemolisina/citolisina aunque su rol aún no se comprende completamente.
C5a peptidasa	Hidrólisis de C5a, molécula quimioatrayente del complemento. También la C5a peptidasa se une a fibronectina, es decir también sirve como adhesina para la bacteria.
Proteína de unión a penicilina (PBP)	Permite al SGB resistir a la destrucción intracelular por las células fagocíticas alveolares (macrófagos y neutrófilos).

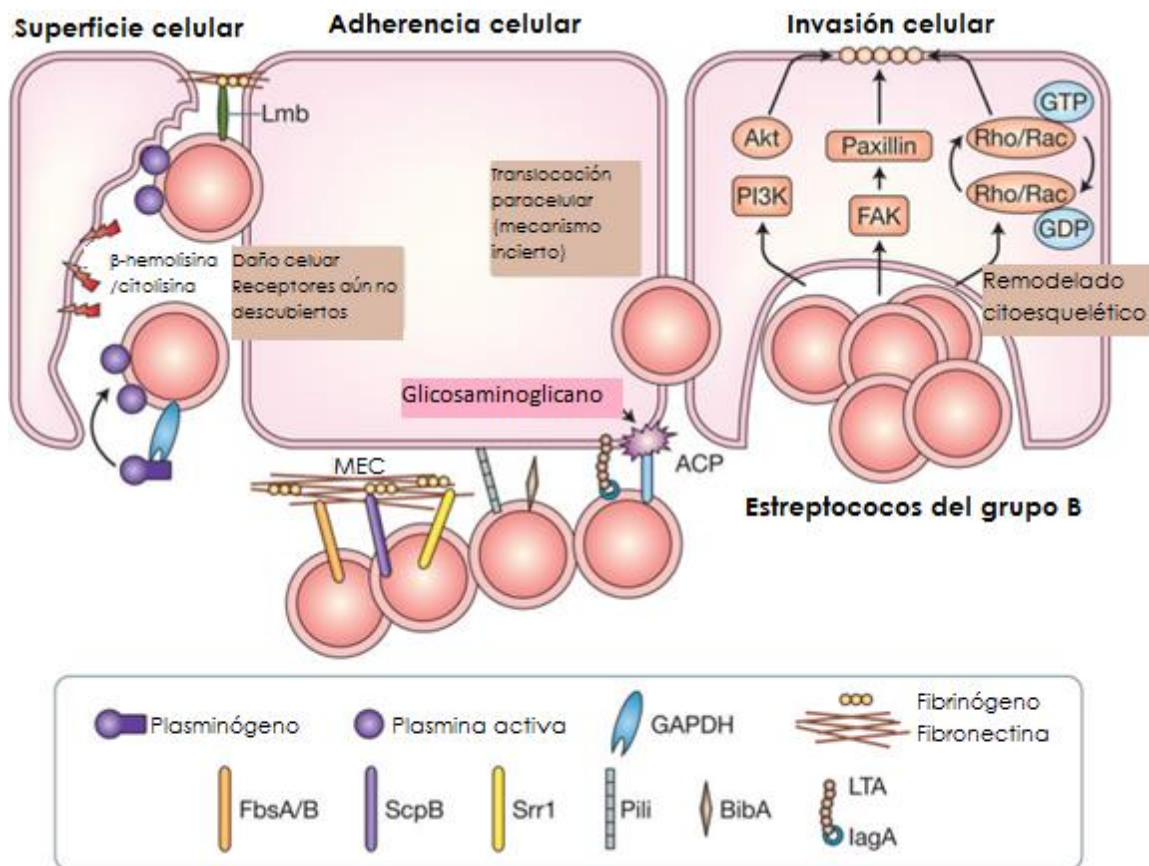


Figura 3. Mecanismos de adherencia celular e invasión de SGB [7]. Proteínas de la superficie celular del SGB como FbsA/B, ScpB, Srr1, pili, BibA LTA y ACP median la unión a las células hospederas y a los componentes de la matriz extracelular, como fibrinógeno y fibronectina. La secreción de β -hemolisina/citolisina promueve la invasión, por la ruptura de las barreras del hospedero exteriorizando receptores en la base de la membrana, como la laminina. El SGB también utiliza la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) para activar el plasminógeno en el hospedero y degradar la ECM. La

invasión intracelular por SGB se ve aumentada por rearrreglos citoesqueléticos dependientes de la bacteria desencadenados por las vía de señalización PI3K/AKT y FAK así como de la familia de GTPasas Rho. De forma alternativa el SGB puede utilizar un mecanismo aún desconocido para atravesar las barreras epiteliales mediante una ruta paracelular. ACP: antígeno α de la proteína C; BibA: adhesina bacteriana inmunogénica; ECM: matriz extracelular; FAK: cinasa de adhesión focal; FbsA/B: Proteínas de unión a fibrinógeno A y B; GDP: guanosina difosfato; GTP: guanosina trifosfato; Lmb: proteína de unión a laminina; LTA: ácido lipoteicoico; PI3K: fosfatidilinositol 3 cinasa; ScpB: C5a peptidasa; Srr1: proteína de unión a keratina.

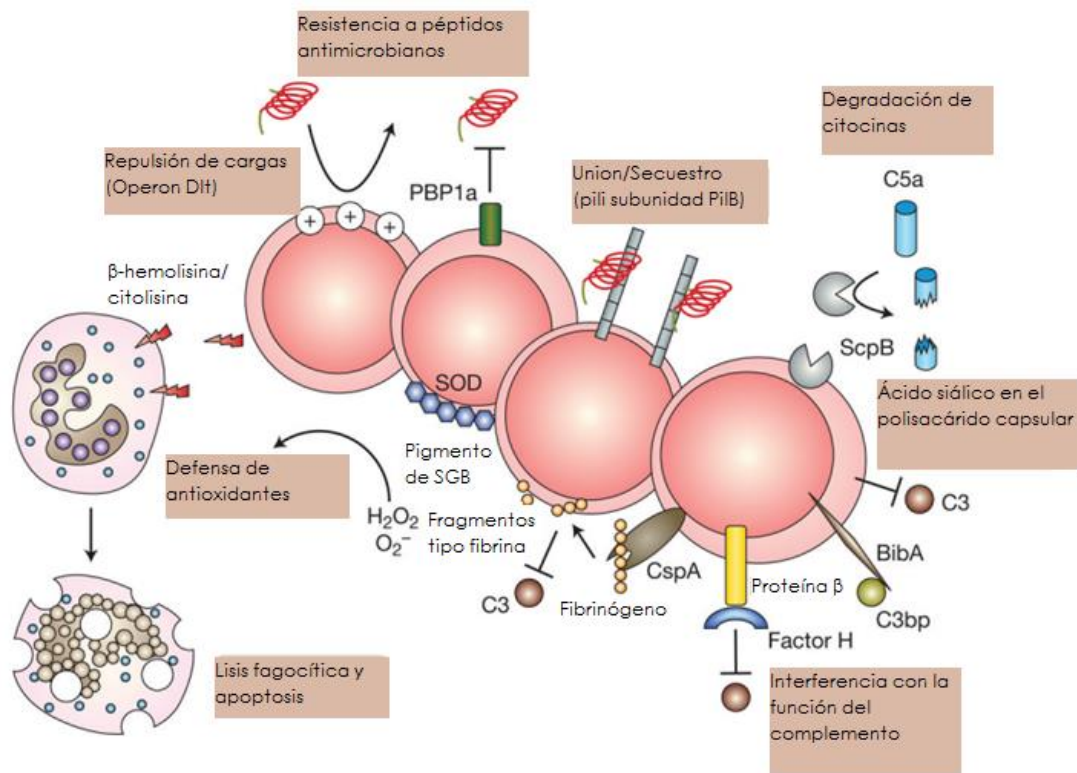


Figura 4. Mecanismos de evasión del sistema inmune de SGB [7]. Los SGB expresan en su superficie o secretan factores para evadir la respuesta inmune y promover su supervivencia. El operon Dlt es responsable del aumento en la incorporación de residuos de D-alanina en los ácidos teicoicos de la pared celular, reduciendo la electronegatividad y afinidad a péptidos antimicrobianos catiónicos. PBP1a y la subunidad piliB del pili también contribuyen a la resistencia antimicrobiana. ScpB, la cápsula de ácido siálico, BibA, la proteína β y CspA inhiben la fagocitosis al interferir con las fracciones C5a, C3 y C3bp del complemento. Las propiedades de la superóxido dismutasa (SOD) de los pigmentos carotenoides protegen al SGB de las especies reactivas de oxígeno. De forma alternativa la β -hemolisina/citolisina apoya la supervivencia del SGB mediante el daño a los fagocitos y su subsecuente apoptosis. BibA: adhesina bacteriana inmunogénica; CspA: proteasa A de la superficie celular; PBP1a: proteína de unión a penicilina 1a; ScpB; C5a peptidasa.

Identificación de *Streptococcus agalactiae*

Las pruebas presuntivas para la identificación del género *Streptococcus* son: la observación de cocos gram positivos agrupados en cadenas o pares y la morfología colonial que se caracteriza por colonias planas de bordes definidos, mucoides y una zona estrecha de β -hemólisis en medio agar sangre de carnero. Seguida de la prueba de CAMP y la detección del carbohidrato específico del grupo de acuerdo con la clasificación de Lancefield.

Métodos serológicos

La identificación de la variación antigénica del carbohidrato "C" ubicado en la pared celular se realiza mediante técnicas serológicas siendo la aglutinación en látex la más comúnmente utilizada por su elevada sensibilidad [4]. En esta técnica se utilizan anticuerpos específicos que detectan (aglutinan) el carbohidrato estreptocócico específico de grupo, la ramnosa-N-acetilglucosamina para SGA, ramnosa-glucosamina para SGB, ramnosa-N-acetilgalactosamina para el grupo C, el ácido teicoico de glicerol que contiene d-alanina y glucosa para el grupo D y la glucopiranosil-N-acetilgalactosamina para el grupo F.

Métodos no serológicos

Existen métodos no serológicos de identificación presuntiva para los SGB, entre ellos se encuentra la prueba de hidrólisis de hipurato de sodio positiva, la producción de pigmentos anaranjados durante el crecimiento anaeróbico en ciertos medios y la prueba de CAMP positiva. A continuación se describen algunos de los métodos mencionados:

Prueba de hidrólisis de hipurato de sodio.

Esta prueba se utiliza para diferenciar a los SGB de estreptococos β -hemolíticos del grupo A y de especies de *Enterococcus* β -hemolíticos [11]. Los SGB son los únicos microorganismos del género que producen la enzima hipuricasa. Esta enzima actúa sobre el hipurato sódico produciendo benzoato y glicina, los cuales pueden identificarse con cloruro férrico y ninhidrina, respectivamente. En el caso del benzoato su presencia se demuestra mediante

la formación de un precipitado de color “café con leche”, que permanece estable durante más de diez minutos. Por su parte, la existencia de glicina se pone de manifiesto al aparecer una coloración púrpura o morada en el medio de la reacción (Figura 5) [12].

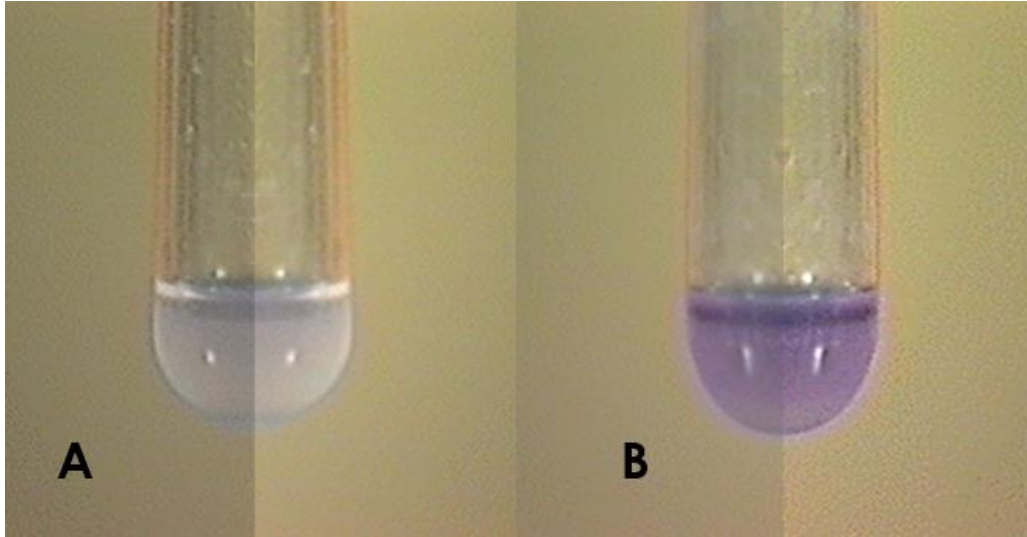


Figura 5. Prueba de la hidrólisis del hipurato de sodio, se observa la reacción del producto glicina [13]. A) Al no hidrolizarse el hipurato a glicina, la adición de ninhidrina no origina el cambio de color. B) Si existe hidrólisis de hipurato, la glicina originada reacciona con la ninhidrina y se produce un color púrpura.

Prueba de CAMP

El factor de CAMP (por las iniciales de los apellidos de sus autores iniciales Christie, Atkins y Munch-Petersen), es una proteína termoestable que actúa de forma sinérgica con la β -lisina de *S. aureus* (β -hemolisina) sobre eritrocitos ovinos en agar sangre. Se produce un fenómeno lítico sinérgico en el área donde hay difusión del factor de CAMP y de la β -lisina, es decir, alrededor del crecimiento bacteriano donde convergen los dos microorganismos.

El factor de CAMP, es un péptido muy difusible producido en el 98-100% de las cepas de *S. agalactiae*. El fenómeno lítico se denomina prueba o reacción de CAMP (Figura 6), donde el agente sinérgico y el factor de CAMP, sensibiliza a los eritrocitos que son destruidos por completo (por la acción de la β -lisina de *S. aureus*) [11, 12, 14].

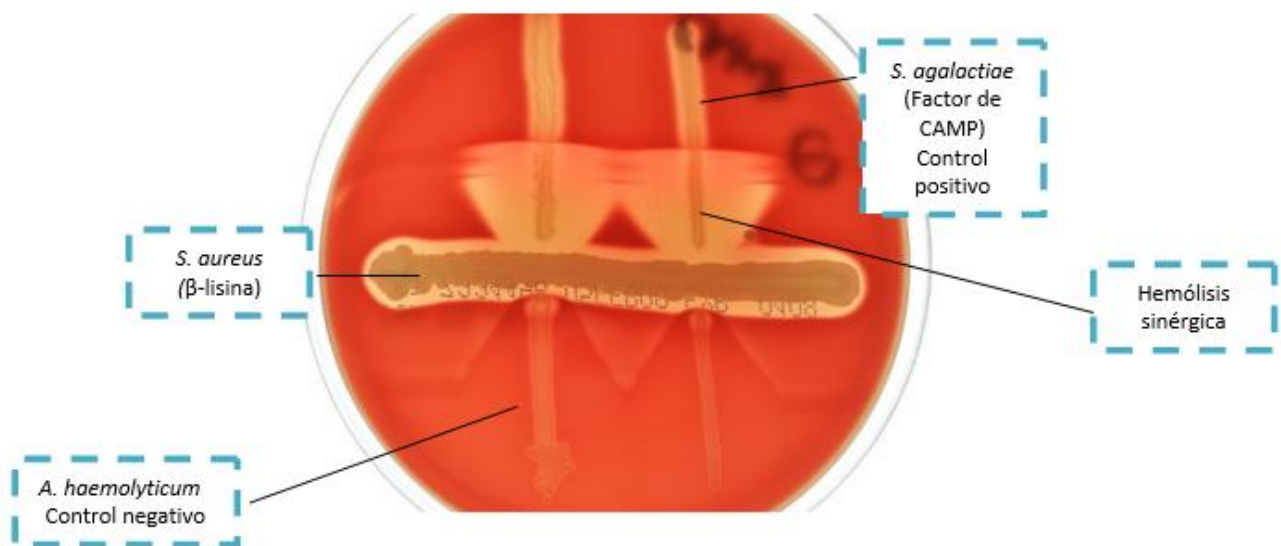


Figura 6. Prueba de CAMP [15] Hemólisis sinérgica con la forma característica de punta de flecha en el área donde hay difusión del factor de CAMP y de la β-lisina, es decir, alrededor del crecimiento bacteriano donde converge *S. aureus* y *S. agalactiae*.

Clasificación

S. agalactiae puede clasificarse de acuerdo con tres criterios, variación antigénica del carbohidrato C de Lancefield que como ya se mencionó la especie corresponde al grupo B, al antígeno de la proteína de superficie C (α o β) y el tipo de polisacárido capsular (tipos **Ia**, **Ib**, **II**, **III**, **IV**, **V**, **VI**, **VII**, **VIII** y **IX**).

La especificidad del tipo está dada tanto por el polisacárido capsular como por los antígenos proteicos. El antígeno del grupo B de la clasificación de Lancefield, está compuesto por un polímero de ramnosa-glucosamina fijado a la capa de peptidoglucano de la pared celular. La mayoría de los SGB son capsulados y pertenecen a uno de los nueve tipos capsulares conocidos. El antígeno proteico de la proteína C existe en dos formas: alfa o beta ($c\alpha$ o $c\beta$); este antígeno se encuentra en todas las cepas con tipo cps **Ib** (las cepas **Ia** carecen del antígeno), en el 60% de las cepas tipo **II** y pocas veces se encuentra en las cepas tipo **III** [4].

Clasificación serológica

La mayor parte de los SGB son encapsulados, el polisacárido capsular (CPS) es el principal factor de virulencia en enfermedades invasivas por *S. agalactiae* debido a que le permite a

la bacteria evadir los mecanismos de defensa inmunitaria innata [16]. A nivel molecular los residuos de ácido siálico del CPS aceleran la disociación de la C3 convertasa inhibiendo la cascada del complemento, provocando una disminución en la opsonización y por ende en la fagocitosis bacteriana. Además los residuos de ácido siálico pueden actuar como ligandos para las lectinas de unión a ácido siálico, reforzando la inhibición de la fagocitosis y/o el estallido oxidativo de neutrófilos y monocitos, favoreciendo la supervivencia bacteriana [5].

Actualmente se han identificado y caracterizado nueve tipos diferentes de CPS ***Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII y VIII***. La mayoría de los SGB aislados pueden ser tipificados dentro de estos nueve grupos, sin embargo del 4-7% no son tipificables. Esto puede deberse a una mutación en los genes que codifican para la cápsula, variación de fase donde la bacteria no se encuentra capsulada o simplemente no se ha caracterizado el tipo de CPS. Recientemente se propuso un nuevo tipo de CPS, ***IX*** [16, 17].

Existen varios métodos disponibles para tipificar SGB, entre ellos se encuentran la prueba de la precipitina en capilar, la aglutinación en látex, co-aglutinación, doble inmunodifusión y ensayos inmunoenzimáticos. El método más utilizado para tipificar es la aglutinación en látex basado en la reacción antígeno-anticuerpo de anticuerpos policlonales específicos contra los diez tipos de polisacáridos capsulares [18]. Los métodos serológicos tienen sus limitaciones y pueden fallar por la ausencia o baja expresión del CPS en diversas condiciones experimentales, por lo que las técnicas moleculares como la PCR resultan atractivas al solucionar estos inconvenientes proporcionando alta especificidad y reproducibilidad. La tipificación molecular de los genes que codifican el CPS, cuyo blanco genético es el operon *cps* es uno de los métodos de tipificación más utilizados actualmente [19]. Recientemente varios reportes describen el uso del análisis multilocus de repeticiones en tándem de número variable (VNTR, MLVA) para discriminar entre cepas de *S. agalactiae* [8].

El CPS de los SGB está constituido de unidades repetidas de 5-7 monosacáridos (glucosa, galactosa, n-acetilglucosamina y un residuo terminal de ácido siálico en la ramificación de

cada unidad de repetición) dependiendo del tipo [20]. Los genes requeridos para la síntesis del CPS se encuentran en el locus simple *cps* (**operón *cps***), quien contiene una región variable que permite determinar el tipo *cps* (***cpsG-cpsK***) [21]. Las enzimas requeridas para el transporte y el ensamblaje del CPS están codificadas en dicho operón, que consiste en 16 a 18 genes que se transcriben en un transcrito simple. El operón está dividido en tres regiones principales: la parte inicial que contiene genes (***cpsA-D***) no relacionados con la biosíntesis de las unidades repetidas del CPS, la parte central (***cpsE-L***) que determina el tipo capsular y comprende genes que codifican glucosiltransferasas y una polimerasa, y la parte final (***neuA-neuD***) que codifica para enzimas que sintetizan ácido siálico [20].

Importancia clínica

SGB son la principal causa de enfermedades severas como meningitis y septicemia en recién nacidos y una gran variedad de enfermedades en mujeres embarazadas, no embarazadas y personas con enfermedades subyacentes [1, 8].

Infecciones en hombres y mujeres no embarazadas

Puede existir colonización asintomática de la vía respiratoria alta y el aparato urogenital en hombres y mujeres no embarazadas. Los hombres, y las mujeres no gestantes infectados por SGB son individuos de mayor edad que padecen de otras entidades debilitadoras predisponentes como diabetes mellitus, cáncer, cirrosis hepática, tratamiento con corticoesteroides, infección por VIH y otros estados de inmunodeficiencia, elevando así la tasa de mortalidad en esta población. Las formas de infección más frecuentes son la bacteriemia, la neumonía, las infecciones óseas y articulares, las infecciones cutáneas, de tejidos blandos y endocarditis (poco común) [3].

Los tipos *cps Ia, II, III* y *V* son los que predominantemente colonizan y provocan la infección en estos pacientes [21, 22].

Colonización e infecciones en mujeres embarazadas

Las mujeres embarazadas con colonización genital por SGB tienen el riesgo de enfermedad postparto (fiebre puerperal). Del 10-30% de las mujeres embarazadas tienen una colonización transitoria durante el embarazo que puede derivar en infecciones del aparato genitourinario, placenta, amnionitis, endometritis posparto, corioamnionitis, bacteremia, neumonía, sepsis puerperal e infecciones en heridas durante o inmediatamente al término de la etapa gestante [3, 22]. Una infección por SGB en mujeres embarazadas puede provocar ruptura prematura de membranas, un parto prolongado y abortos espontáneos. En casos donde la madre no tiene anticuerpos específicos frente al tipo de SGB y sus concentraciones de complemento son bajas podría desarrollarse una bacteremia urinaria con septicemia y neumonía. Los tipos CPS que causan la enfermedad materna son similares a los que causan la enfermedad de inicio temprano en recién nacidos.

De acuerdo con una revisión de la bibliografía realizada en el 2007, la prevalencia global de colonización por SGB en mujeres embarazadas en México es de 9.5% [23].

Infecciones en recién nacidos

En el caso de los neonatos, puede existir una transmisión vertical de la madre al recién nacido durante el parto. En países desarrollados se estima que del 20-30% de las mujeres embarazadas se encuentran colonizadas con SGB, aproximadamente el 50 % de sus bebés son colonizados y un 1% de éstos desarrolla la enfermedad invasiva. La infección por SGB en neonatos puede evolucionar hasta neumonía, meningitis, infecciones en la piel, bacteremia, septicemia fulminante, meningitis o síndrome de dificultad respiratoria. Dos síndromes clínicos distintos son identificados en los infantes de acuerdo con la edad en la cual los presentan: la Enfermedad de inicio temprano (EOD, por sus siglas en inglés Early-Onset Disease) y la Enfermedad de comienzo tardío (LOD, por sus siglas en inglés Late-Onset Disease) que difieren en su presentación clínica, mortalidad, morbilidad, características epidemiológicas y patogénesis. A continuación se muestra en el Cuadro 5 las características de cada una de las enfermedades [22, 24].

Cuadro 5. Características clínicas de la infección neonatal por SGB [3, 4, 22, 24, 25, 26].

Característica	Inicio temprano (EOD)	Inicio tardío (LOD)
Edad	0-7 días	Una semana a tres meses (7-90 días)
Forma de adquisición	Transmisión vertical durante el parto o es adquirida en el útero.	Perinatal, nosocomial o de fuentes en la comunidad, transmisión horizontal.
Incidencia	0.53/1000 RNV [27]	0.5 a 1,8 / 1000 RNV
Complicaciones maternas	Frecuentes	Raras
Incidencia de prematuridad	Frecuente (30%)	Rara
Tipos frecuentes	<i>Ia, II, III y V</i>	<i>III</i> (50%)
Tasa de mortalidad	5-20%	2-6%
Daño	Neumonía, sepsis	Más de 50% presenta meningitis. bacteremia, celulitis y osteoartritis, son poco comunes pero pueden suceder.
Factores de riesgo para adquirirla	<ul style="list-style-type: none"> Bacteruria por SGB en cualquier momento del embarazo Fiebre materna intraparto Ruptura prematura de membranas o ruptura de membranas (18 o más h antes del parto) Parto prematuro antes de las 37 semanas de gestación Tener un hermano anterior con la enfermedad invasiva 	<ul style="list-style-type: none"> Sexo masculino Raza negra Colonización materna

En la actualidad se recurre a la profilaxis antibiótica intraparto (IAP) como método de prevención de infección neonatal. Existen dos diseños de guías para aplicar la IAP. Una de ellas se apega a los criterios establecidos por el CDC (Centro de prevención y control de enfermedades de Atlanta) basados en realizar un cultivo vaginal y/o rectal en todas las embarazadas de 35-37 semanas de gestación en busca de SGB con la subsecuente aplicación de IAP en las mujeres gestantes que resulten positivas [28].

La otra guía establecida en Inglaterra por el Instituto Nacional de Excelencia Clínica (NICE) recomienda IAP a mujeres con factores de riesgo de portar el SGB sin la necesidad del rastreo universal por cultivo [24]. Como resultado de los esfuerzos de prevención, la incidencia de EOD ha disminuido drásticamente de 1.7 casos por cada 1000 recién nacidos vivos (RNV) en los 90's hasta 0.34-0.37/1000 RNV en el 2010 [28]. En el 2007 en México, se

realizó un estudio para evaluar qué tan apegado a las guías es el tratamiento de las embarazadas en el país, se concluyó que sólo el 29.2% de los casos se atendió de forma correcta de acuerdo con los criterios del CDC, mientras que un 70.7% fue incorrecto [29].

Epidemiología

De acuerdo con la OMS casi 5 millones de neonatos mueren al año en el mundo. Las tres principales causas son: asfixia, prematuridad e infecciones por diversos agentes etiológicos (30% muertes neonatales) [30]. Del 2011 al 2015 en México la tasa de mortalidad neonatal ha sido de 7/1000 RNV de acuerdo con el banco mundial de datos de la UNICEF [27, 31].

Los SGB colonizan la zona inferior del intestino y el aparato genitourinario. Entre un 10-30% de las embarazadas presentan un estado transitorio de portadoras, colonizadas sintomática o asintóticamente en la vagina, recto, cérvix y faringe, aunque la incidencia depende del tiempo de la gestación en que se toma la muestra y de las técnicas de cultivo utilizadas. La colonización materna reportada en México por SGB es del 9.5%, siendo el 50% de los productos de estos embarazos los que nacen colonizados y del 1-2% los que desarrollan una enfermedad invasiva. En México la incidencia de infección por SGB en neonatos es de 1/1500 RNV [32].

La prevalencia global de las infecciones por SGB desde el año 2000 se estima en 0.53 en la región Europea, 0.67 en América y 0.15 en Australia [33].

De acuerdo con una revisión sistemática de 74 estudios llevados a cabo entre el 2002 y el 2011 la incidencia de la EOD por SGB es de 0.43/1000 RNV, siendo dos veces mayor que la de la LOD [25]. Los tipos cps que se asocian con mayor frecuencia a la EOD son el *Ia* (35-40%), *III* (30%) y el *V* (15%). Los tipos *Ia* (24%) y *V* (31%) son los más habituales en la enfermedad del adulto, mientras que el tipo *III* (50%) se aísla en la mayoría de los casos de la LOD.

La administración de IAP ha ocasionado una importante reducción en la EOD, de 8000 infecciones al año en 1993 a 1800 en el 2002. Sin embargo esta medida profiláctica no ha tenido gran impacto sobre la LOD [22].

En cuanto a los adultos el número de infecciones por SGB es más elevado que en los neonatos (alrededor de 17000 infecciones invasivas en el 2002), pero la incidencia global es más elevada en éstos últimos. El riesgo de enfermedad es mayor en mujeres embarazadas que en hombres o mujeres no gestantes [3]. Un estudio reciente reporta una incidencia de 0.02/1000 en mujeres no embarazadas contra 0.49/1000 en mujeres que acaban de concebir, lo que indica que la mayoría de las enfermedades por SGB en mujeres asociadas al embarazo, ocurren en el periodo pos-parto.

La prevalencia de los tipos capsulares de los SGB varía en el tiempo y zona geográfica (Cuadro 6), sin embargo existen datos sugerentes de que la distribución del tipo CPS de SGB es similar en África, el oeste del Pacífico, Europa, América y el este del Mediterráneo. Dicha distribución parece haberse modificado muy poco en los últimos 30 años. Los cinco tipos más frecuentes reportados en una revisión del 2012 son el **Ia** (22.9%), **Ib** (7%), **II** (6.2%), **III** (48.9%) y **V** (9.1%) [22, 33].

En México la distribución capsular que se observó en el 2002 en un estudio donde se tipificaron 101 cepas fue 61.3% tipo I, 25.7% tipo II y 12.8% tipo III [34]. Un estudio más del 2004 se reportó 58.8% tipo **I**, 29.4% tipo **II** y 5.9% tipo **III** [35]. Finalmente en el 2005 donde se tipificaron 286 cepas fue: 48.6% tipo **I (Ia y Ib)**, 32.9% tipo **III**, 14% tipo **II** y 4% no tipificables [32]. Esto nos indica que los tipos cps más frecuentes en México con el **Ia, Ib, II** y **III**.

Cuadro 6. Comparación de la distribución de los tipos capsulares en el mundo.

Tipo cps	Distribución y frecuencia de los tipos cps en el mundo	
V	Irán con 4.9% y 19% [8, 36] India con 7% [18] Inglaterra con 9.1% [33] Brasil con 13.6%	China con 14.3% [16] Irlanda con 15.1% [9] Suiza con 25% [37] Francia con 44.6% [38]
la	Francia con 8% [38] China con 17.9% [16] Suiza con 19% [37]	Irlanda con 19.5% [9] Inglaterra con 22.9% [33] India con 23% [18]
III	Brasil con 6.7% [10], 14.2% , 14.5% [18, 39] y 38.46% [40] Francia con 19% [38] India con 20% Suiza con 29% [37] Irlanda con 29.5% [9]	China con 32.1% [16] Inglaterra con 48.9% [33] Irán con 65.8% , 50% y 49% [8, 36, 41] Canadá con 70.3% [21]
II	Inglaterra con 6.2% [33] Irlanda con 10.7% [9] Brasil con 13.6% , 10.8% [18, 39], 7.69% [40] y 19.1% [10]	India con 14% Irán con 16% [36] y 25% [41] Francia con 19% [38] China con 36% [18]
lb	Irán con 2% [41], 6% , 7.3% [36, 8] Brasil con 5.13% [40], 18.7% [10] Inglaterra con 7% [33]	China con 16.1% [16] Irlanda con 18.9% [9]
IV	Francia con 1.3% [38] Irlanda con 1.9% [9] Brasil con 8.1% [10]	

Vacunación como estrategia de prevención de enfermedades invasivas por SGB

A finales de los 70s, Baker y Kasper reportaron una correlación existente entre el aumento en la susceptibilidad de los neonatos a infecciones por SGB con la deficiencia de anticuerpos maternos. La idea de la vacunación representa una práctica y atractiva alternativa dirigida a las mujeres con edad fértil con el fin de proteger a los recién nacidos de infecciones por SGB [25].

Dado que en los últimos 30 años la distribución en el mundo de los tipos capsulares ha cambiado poco, los datos mundiales arrojan que una vacuna conjugada contra los tipos capsulares **la**, **lb**, **II**, **III** y **V** podría prevenir más de 85% de EOD [25, 26].

En la actualidad vacunas candidatas se encuentran en fase experimental, dentro de ellas figuran las que están compuestas por [26, 42, 43]:

1. Diversos cps purificados o monovalentes (que muestran poca inmunogenicidad),
2. Las conjugadas entre cps y proteínas para elevar su inmunogenicidad (regularmente usando toxoide tetánico como adjuvante),
3. Las conjugadas multivalentes (varios tipos de cps en una sola vacuna) y
4. Las que hacen uso de proteínas altamente conservadas entre los SGB para despertar inmunogenicidad y evitar o bloquear el problema del switching capsular (C5a peptidasa y proteína C).

A continuación se muestran las vacunas en las que actualmente se está trabajando y la fase de investigación en la que se encuentran (Cuadro 7).

Cuadro 7. Estatus del desarrollo actual de vacunas candidatas contra SGB [43].

Desarrollador	Nombre candidato/Identificador	Preclínica	Fase I	Fase II	Probado en
NIH	Conjugados de toxoide tetánico-CPS: Monovalente, Bivalente; Conjugado CRM197-CPS: monovalente	*	*	*	* (mujeres embarazadas)
Novartis/GSK	Conjugados CRM197-CP: monovalente, trivalente.	*	*	*	* (mujeres embarazadas)
Minervax	Dominios N-terminal de las proteínas de superficie Rib y AlfaC	*	*		
Novartis/GSK	Proteínas del pili	*			
Varios grupos académicos	Otras proteínas y/o conjugados proteínas-CPS	*			

*Fase de investigación por la que ha pasado la vacuna.

Diagnóstico

El diagnóstico microbiológico en el laboratorio de la infección por SGB es mediante cultivo en agar sangre a partir de las siguientes muestras: de líquido cefalorraquídeo (meningitis), secreciones de vías respiratorias (neumonía), secreción de heridas, exudado vaginal y perianal (infecciones) u otras muestras apropiadas. El tracto gastrointestinal es el principal reservorio y la fuente de la colonización vaginal por SGB. La colonización puede darse de

forma transitoria, intermitente o permanente y asintomática, por lo que el uso de un solo muestreo aumenta la posibilidad de obtener falsos negativos en el cultivo [28].

Tras la obtención de un cultivo positivo se continúa con la observación del frotis con tinción de Gram. La identificación definitiva implica la determinación serológica del grupo de Lancefield, siendo la aglutinación en látex la metodología más utilizada. La detección de colonización vaginal en mujeres embarazadas requiere procedimientos específicos con medios selectivos (Ej. LIM: caldo Todd Hewitt con ácido nalidíxico y colistina) y caldos enriquecidos. Éstos deben establecerse de manera independiente en el laboratorio, ya que no se les utiliza para ningún otro propósito. Se han evaluado métodos para la detección directa del antígeno de los SGB en muestras vaginales, pero su sensibilidad hasta la fecha es baja para utilizarla en el diagnóstico de infección neonatal. Se comercializan pruebas basadas en la PCR para detectar a las portadoras vaginales durante el embarazo y son tan sensibles como el cultivo donde a partir de los aislamientos se identifica la presencia de carbohidratos específicos del grupo (antígeno del grupo B) o por análisis de amplificación de ácidos nucleicos [2, 3].

Tratamiento

Los SGB son susceptibles a los mismos antimicrobianos que los SGA. La penicilina es el tratamiento de primera línea debido a su espectro estrecho y a su menor presión de selección. No existe resistencia conocida a los fármacos betalactámicos.

En las pacientes alérgicas a la penicilina con alto riesgo de shock anafiláctico, el tratamiento de referencia es clindamicina o eritromicina. Sin embargo, del 3-25% de los SGB son resistentes a la clindamicina o eritromicina e incluso a ambas asociadas [44]. Por esta razón en caso de alergia a penicilina es útil realizar un antibiograma dirigido a eritromicina y clindamicina. Una alternativa es emplear cefazolina en las pacientes alérgicas a la penicilina sin riesgo de reacción anafiláctica. En el caso de SGB resistentes a eritromicina y clindamicina, se utiliza vancomicina con cierta precaución en mujeres con alergia a penicilina y alto riesgo de reacción anafiláctica [44].

Las infecciones en neonatos, en la etapa inicial, a menudo se tratan en principio con combinaciones de penicilina (o ampicilina) y un aminoglucósido, debido a la sinergia conocida y a la posibilidad de presencia de otras bacterias. Una vez que se confirma el diagnóstico de SGB, el tratamiento puede concluirse utilizando sólo penicilina.

A continuación se muestra el esquema de tratamiento recomendado por la CDC 2010 para el manejo de profilaxis antibiótica intraparto (Figura 7 y 8) [28]:

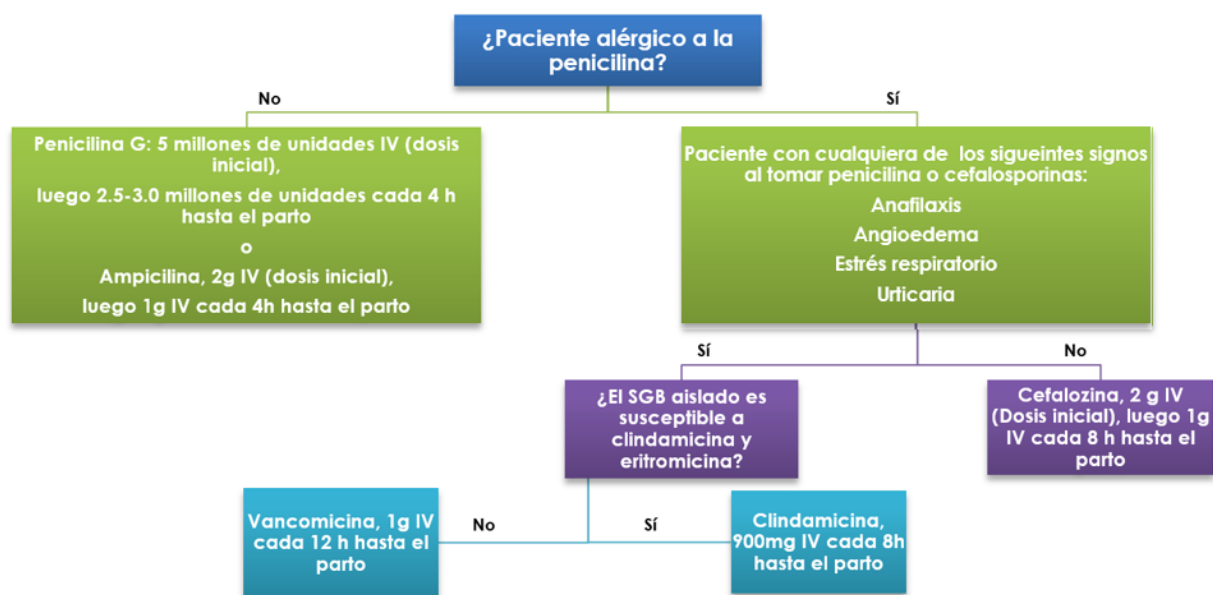


Figura 7. Esquema recomendado de profilaxis antibiótica intraparto para la prevención de EOD por el SGB [28]. IV: vía intravenosa.

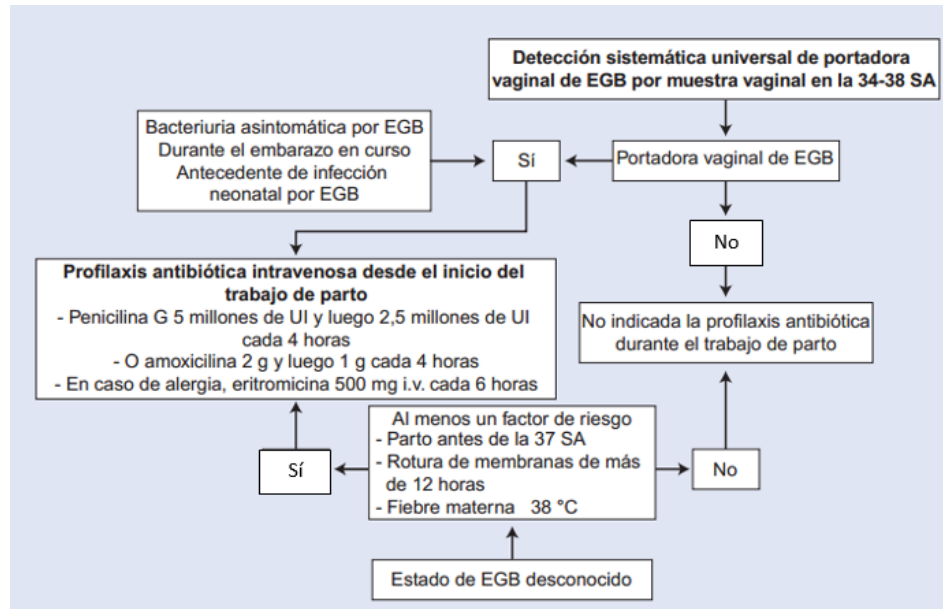


Figura 8. Esquema de tratamiento y prevención de las infecciones neonatales por SGB [44]. SA: semana de amenorrea, i.v.: vía intravenosa.

Antibióticos

Generalidades de antibióticos

Los antibióticos, son agentes antimicrobianos o quimioterapéuticos han sido utilizados a lo largo de la historia con el fin de erradicar microorganismos patógenos que suelen ser los causantes de diversas enfermedades que atacan al ser humano. Varios agentes antimicrobianos sintéticos y naturales se utilizan en el tratamiento de infecciones. Éstos agentes se clasifican de acuerdo con su estructura y mecanismo de acción. El requisito para un antimicrobiano es la toxicidad selectiva (inhibir al agente patógeno sin dañar al hospedero).

De manera muy general los antimicrobianos se agrupan en dos categorías, agentes sintéticos o quimioterapéuticos (Ej. sulfamidas, imidazoles y quinolonas) y antibióticos (compuestos químicos producidos por microorganismos (Ej. betalactámicos, aminoglucósidos, macrólidos y tetraciclinas) [1, 45].

Por otra parte, los antimicrobianos también pueden clasificarse de acuerdo al mecanismo de acción que tienen sobre el microorganismo. Esta clasificación se establece de acuerdo con los siguientes mecanismos de acción (Figura 9) [1]:

- Inhibición de la síntesis de la pared celular
- Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos
- Inhibición de la síntesis de proteínas (inhibición de traducción y transcripción de material genético)
- Inhibición de la función de la membrana celular
- Los implicados en el metabolismo del ácido fólico

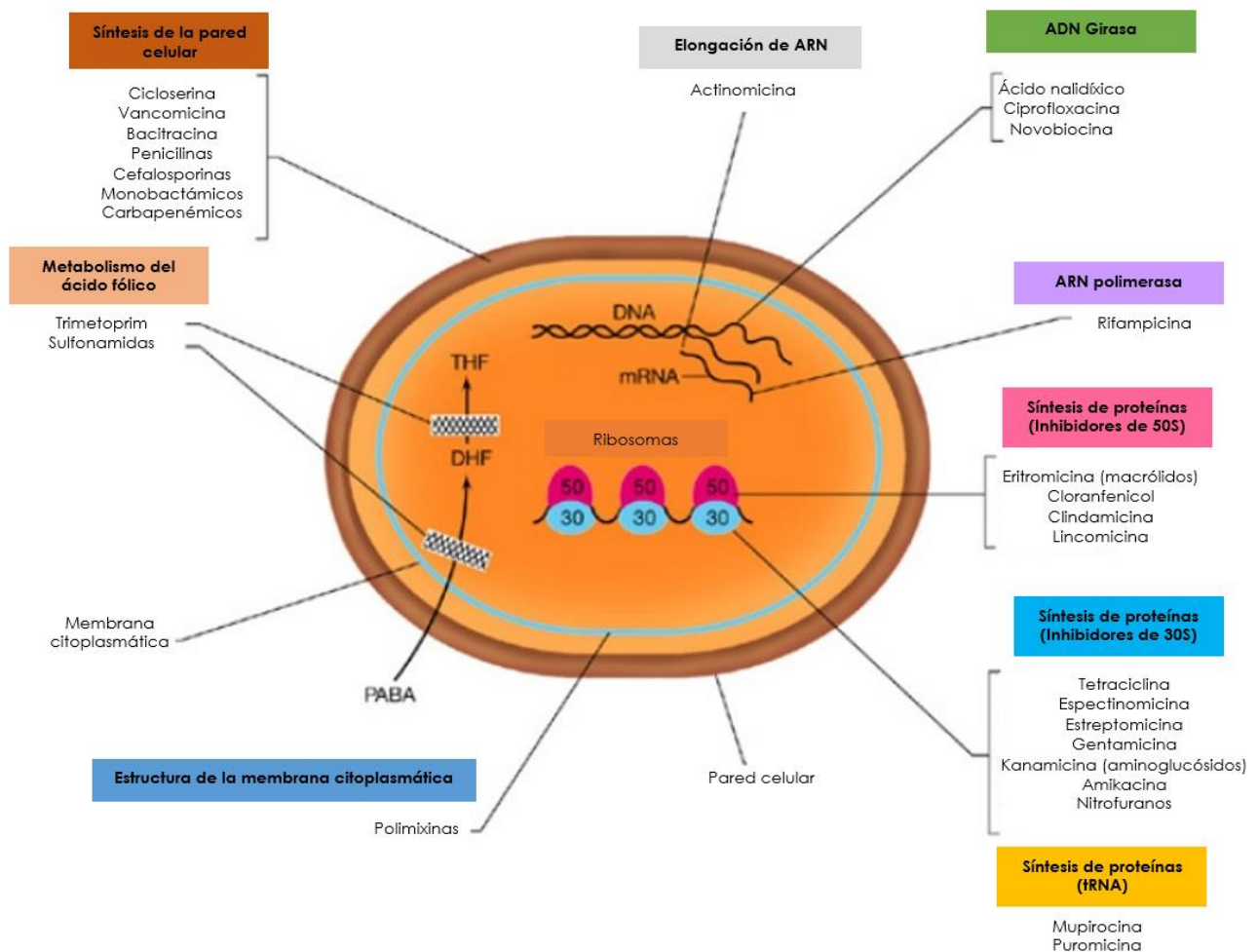


Figura 9. Mecanismo de acción de los principales antimicrobianos [45]. THF: tetrahidrofolato; DHF: dihidrofolato, PABA: ácido p-aminobenzoico.

Resistencia a antimicrobianos

La resistencia a los antimicrobianos es la resistencia de un microorganismo a un medicamento antimicrobiano al que originalmente era susceptible. Los microorganismos en ocasiones suelen presentar resistencia antimicrobiana natural o adquirida hacia uno o varios antimicrobianos. La resistencia a los antimicrobianos compromete la prevención y el tratamiento eficaz de un número cada vez mayor de infecciones causadas por bacterias, parásitos, virus y hongos [46]. Existen numerosos mecanismos a través de los cuales los microorganismos adquieren resistencia a los fármacos (Cuadro 8 y Figura 10).

Cuadro 8. Mecanismo de resistencia antimicrobiana [1].

Mecanismo de resistencia	Ejemplos
Los microorganismos producen enzimas que destruyen al fármaco activo	El estafilococo productor β -lactamasa. Los bacilos gramnegativos producen otras β -lactamasas. Las bacterias gramnegativas resistentes a los aminoglucósidos (gracias a un plásmido) debido a que producen enzimas adeniladoras, fosforiladoras o acetiladoras que destruyen al fármaco.
Los microorganismos cambian su permeabilidad al fármaco	Las tetraciclinas se acumulan en las bacterias sensibles pero no en las resistentes. Asimismo, la resistencia a las polimixinas está vinculada con un cambio en la permeabilidad a los fármacos. Los estreptococos poseen una barrera natural de permeabilidad contra los aminoglucósidos. Esta característica se puede vencer parcialmente por medio de la presencia simultánea de un fármaco activo en la pared celular, por ejemplo, una penicilina. La resistencia a la amikacina y otros aminoglucósidos depende en ocasiones de la falta de permeabilidad a los medicamentos, aparentemente por un cambio de la membrana externa que daña el transporte activo hacia el interior de la célula.
Los microorganismos forman un sitio de acción estructural modificado para el fármaco	Los microorganismos resistentes a la eritromicina tienen un receptor modificado en la subunidad 50S del ribosoma, que es resultado de la metilación de un RNA ribosómico 23S. La resistencia a ciertas penicilinas y cefalosporinas puede ser función de la pérdida o alteración de las proteínas de unión a penicilina (PBPs).
Los microorganismos forman una vía metabólica modificada que desvía la reacción que es inhibida por el fármaco	Algunas bacterias resistentes a las sulfonamidas no necesitan PABA extracelular pero, al igual que los mamíferos, pueden utilizar ácido fólico preformado.
Los microorganismos producen una enzima modificada que aún puede llevar a cabo su función metabólica resultando mucho menos alterada por el fármaco	En las bacterias resistentes al trimetoprim, la reductasa de ácido dihidrofólico se inhibe en baja proporción en comparación a las bacterias que son sensibles al trimetoprim.

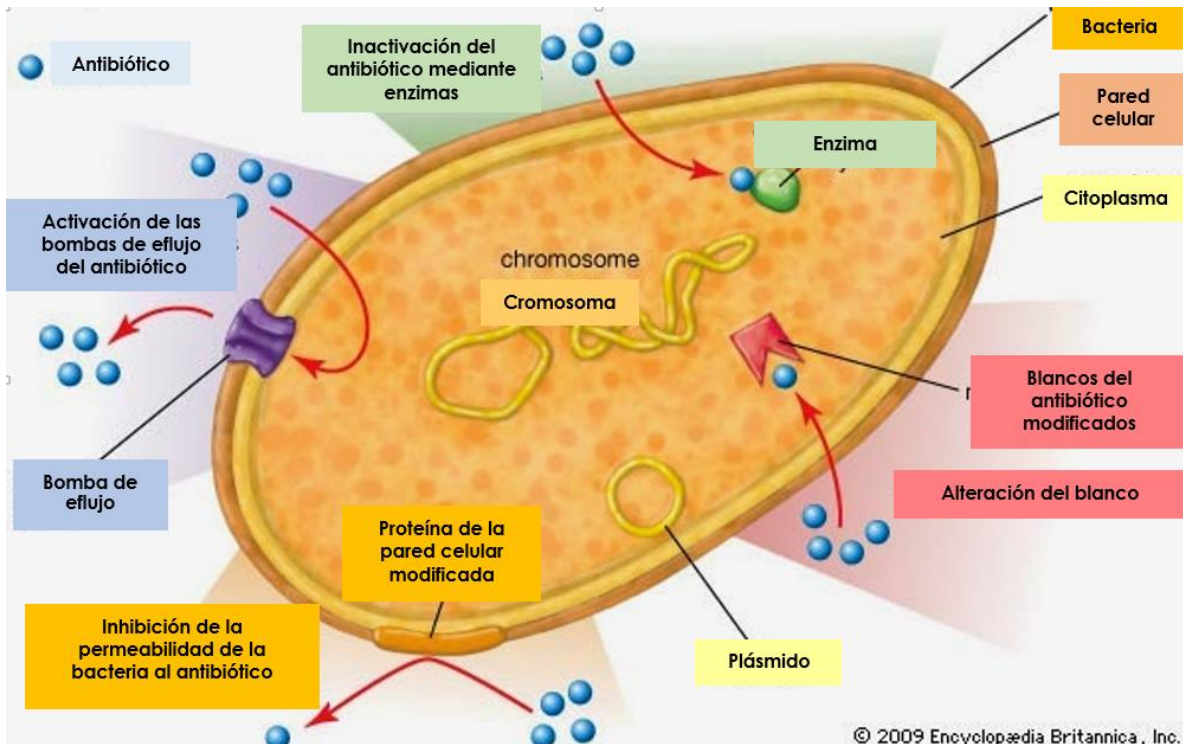


Figura 10. Mecanismos de resistencia antimicrobiana [47].

Resistencia antimicrobiana en *Streptococcus agalactiae*

Diversos estudios han mostrado que los SGB tienen cierta resistencia a diferentes antibióticos (Cuadro 9). La penicilina es el antibiótico de primera línea para el tratamiento de infecciones por SGB así como para la profilaxis antibiótica intraparto. Además, la clindamicina y eritromicina son utilizadas como alternativas para pacientes con alergia a penicilina [28].

Globalmente las cepas de SGB muestran ser susceptibles a penicilina así como a la mayoría de los β -lactámicos, con excepción de unas cepas raras reportadas recientemente en Japón y E.U.A., caracterizadas por tener una disminución en su susceptibilidad a penicilina [48]. La resistencia a clindamicina y eritromicina de cepas de SGB provenientes de individuos gestantes y no gestantes se ha descrito en diversos países con diferentes grados de resistencia (Cuadro 9).

Cuadro 9. Resistencia antimicrobiana de SGB en el mundo

Antibiótico	% resistencia
Eritromicina	Brasil 4.1% [10] Etiopia 6.5% [49] Suecia <10% [25] Suiza 14.5% [37] Arabia Saudita 15.7% [50] Italia 16.5% [51] Irán 24.24% [8] Colombia 28% [52] Bélgica 33% [25] Nueva York 54% [53] China 85.7% [16]
Clindamicina	Etiopia 3.2% [49] Brasil 3-7.69% [10, 40] Suiza 8.2% [37] Brasil 13.3% [39] Irán 14.6% [8] Colombia 28% [52] E.U.A. 38.4% [53] China 73.2% [16]
Tetraciclina	Colombia 25% [52] Etiopia 45.2% [49] Italia 68.1% [51] Brasil (Rio de Janeiro) 69.23% [40] China 91% [16] Brasil 97% [10] Irán 97.6% [8]

La resistencia a penicilina se asocia frecuentemente con mutaciones en las proteínas de unión a penicilina PBP 2X y PBP 2B [25, 39].

La mayoría de las cepas de SGB humanas son consideradas altamente resistentes a tetraciclinas (Cuadro 9). En los estreptococos la resistencia a tetraciclina está codificada por los genes de protección ribosomales entre los que se incluyen **tetM** y **tetO** o la bomba de eflujo codificada en los genes **tetK** o **tetL** [25].

En general, los mecanismos que confieren resistencia a eritromicina incluyen [36, 38, 39, 51, 54, 55]:

- La metilación pos-transcripcional de los residuos de adenina del RNA 23s del ribosoma mediada por los genes *erm* (*ermA/TR*, *ermB*, *ermT*). La expresión de los genes *erm* resulta en el fenotipo MLS_B responsable de la generación de resistencia cruzada a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B que puede ser constitutiva cMLS_B o inducible iMLS_B. El gen *ermB* es el más predominante gen *erm* en estreptococos, y es usualmente asociado con altos niveles de resistencia a eritromicina. El gen *erm (T)*, se detectó recientemente, es menos común, se expresa de forma inducida, usualmente causa altos niveles de resistencia a eritromicina, y es transmitido por plásmidos. El gen *ermA/TR* se expresa de manera inducida a través de la atenuación de un mecanismo regulador.
- Otro mecanismo está dado por una proteína unida a la membrana que sirve como bomba de eflujo del antibiótico codificada por los genes *mef* (*mefA/E*). La expresión de los genes *mef* da lugar al fenotipo M, confiriendo resistencia solo a los miembros 14 y 15 de los anillos macrólidos (eritromicina y azitromicina) y a estreptograminas B.
- La resistencia a clindamicina también puede presentarse de forma menos frecuente debido a una translocación ribosomal codificada en los genes *linB*.

El uso generalizado de antibióticos favorece el incremento de la resistencia antimicrobiana y por lo tanto una reducción en la eficacia de los tratamientos tradicionales, con lo que se vuelve fundamental la vigilancia de la resistencia antimicrobiana.

JUSTIFICACIÓN

Los estreptococos del grupo B son la principal causa de sepsis y meningitis neonatal, se asocian a infecciones invasivas y no invasivas en mujeres embarazadas así como en adultos mayores.

Actualmente se conocen diez tipos capsulares en *S. agalactiae*, su caracterización y frecuencia en poblaciones específicas es importante debido a que es el principal factor de virulencia.

La infección por SGB es usualmente tratada con la combinación de penicilina y gentamicina. Las mujeres embarazadas reciben tratamiento profiláctico, y en el caso de presentar alergia son tratadas con eritromicina o clindamicina. El uso generalizado de estos antibióticos ha favorecido el incremento de la resistencia antibiótica y por lo tanto una reducción en la eficacia del tratamiento tradicional. Con estos antecedentes es fundamental la vigilancia de la resistencia antimicrobiana.

Conocer la frecuencia de los tipos capsulares y la resistencia antimicrobiana de *S. agalactiae* que afectan a la población de interés, nos permitirá visualizar si la resistencia antimicrobiana está relacionada con un tipo capsular específico.

HIPÓTESIS

Existe una relación entre la resistencia antimicrobiana y los tipos capsulares de *S. agalactiae* en aislamientos clínicos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la distribución, frecuencia de los tipos capsulares, y la asociación con su perfil de resistencia antimicrobiana, de 134 cepas de *Streptococcus agalactiae* aisladas a partir de exudados vaginales, urocultivos y la secreción de una herida quirúrgica posparto en el Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 del IMSS.

Objetivos particulares

- Seleccionar un lote de cepas de *S. agalactiae* provenientes del Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 del IMSS.
- Confirmar la identificación de las cepas mediante la prueba de CAMP, la prueba de sensibilidad a bacitracina y la determinación del grupo de Lancefield.
- Realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a 10 antibióticos mediante la técnica de difusión en agar Kirby Bauer.
- Realizar la tipificación capsular mediante la técnica de PCR.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población

- Se utilizaron 134 cepas recolectadas y aisladas entre mayo – octubre del 2010 Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala” del IMSS. (Cuadro 10 y Figura 11)



Figura 11. Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala” del IMSS

Cuadro 10. Origen clínico de las muestras

Origen clínico	Frecuencia	%
Exudados vaginales	106	79.1%
Urocultivos	27	20.1%
Secreción de herida quirúrgica posparto	1	0.7%
Total	134	100%

Criterios de inclusión

- Exudados vaginales, urocultivos, secreciones y exudados faríngeos.
- Provenientes de infecciones o colonizaciones.
- Mujeres de entre 20-91 años.

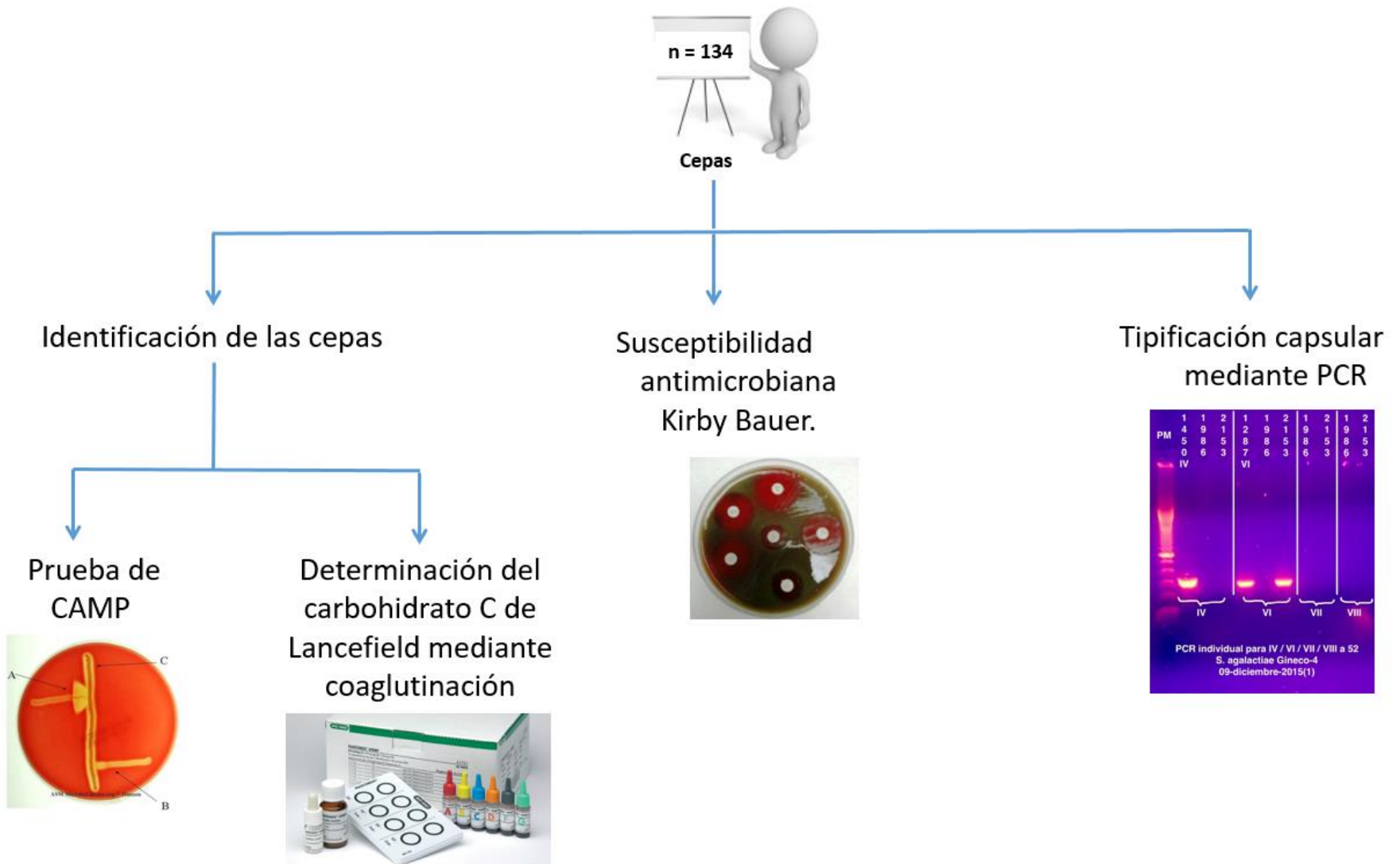


Figura 12. Diagrama de flujo general de trabajo

Identificación de las cepas

Las cepas estudiadas fueron recolectadas, aisladas e identificadas en el Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 "Luis Castelazo Ayala" del IMSS. Las cepas se caracterizaron en el laboratorio utilizando los siguientes criterios: la confirmación de su pureza, observación de la morfología colonial, el patrón de hemólisis en agar sangre, la prueba de CAMP y la coaglutinación en látex para la determinación del carbohidrato "C" de la pared celular específico del grupo B estreptocócico.

Cada cepa conservada en caldo BHI con glicerol al 15% a -72°C , fue sembrada por estría cruzada en agar sangre de carnero al 5% e incubada 24 h a 37°C en una atmósfera enriquecida de CO_2 al 5%. A partir de las colonias aisladas se realizaron las diferentes pruebas de identificación.

Prueba de CAMP

A partir de un cultivo puro se realizó la prueba de CAMP. En agar sangre de carnero al 5% se inoculó una estría recta con *S. aureus*, y una estría perpendicular a la última realizada, con la presunta cepa de *S. agalactiae* con una separación entre ellas de 3-4 mm. Las placas fueron incubadas por 24 h a 37°C en una atmósfera enriquecida de CO_2 al 5%. Tras el periodo de incubación se procedió a realizar la observación de las placas en busca del crecimiento bacteriano rodeado por un halo de β -hemólisis sinérgica en el punto donde ambas especies de bacterias se encuentran próximas, con la forma característica de punta de flecha. Se consideró positiva la prueba al observar la hemólisis en forma de punta de flecha, reconociendo como SGB a la cepa por identificar (Figura 13).

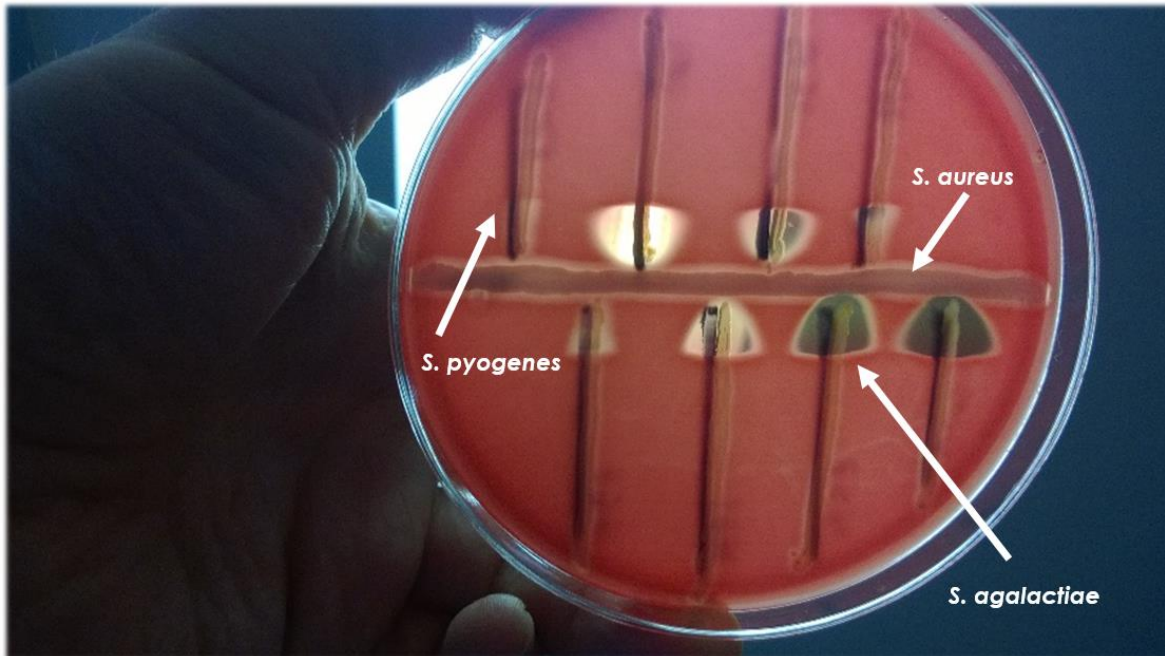


Figura 13. Imágenes de la prueba de CAMP positiva para EGB. Colección de imágenes del Laboratorio de Biología Molecular del departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina, U.N.A.M.

Determinación del carbohidrato “C” de grupo de Lancefield por coagulación en látex

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

1. Colocar 300 μ L de la solución de enzima para la extracción del carbohidrato en un tubo para cada cepa a estudiar.
2. Tomar de 5 a 10 colonias aisladas de un cultivo fresco y disociarlas en la solución de enzima, procurando obtener una turbidez evidente y homogénea.
3. Incubar de 30 minutos a temperatura ambiente o 15 minutos a 37°C.
4. Homogenizar por agitación con vórtex cada uno de los antisueros (suspensiones de partículas de látex recubiertas de los anticuerpos específicos de cada grupos: A, B, C, D, F y G).

5. Depositar una gota de cada antisuero en cada uno de los círculos de la tarjeta de aglutinación.
6. Con ayuda de una micropipeta colocar una gota del lisado bacteriano en cada uno de los círculos de la tarjeta, procurando no tocar la gota del antisuero que fue añadida en el paso anterior.
7. Utilizando un palillo de plástico para cada círculo, mezclar el lisado con su respectivo antisuero hasta obtener una mezcla homogénea.
8. Agitar la tarjeta con un movimiento orbital durante un minuto como máximo. Y observar la reacción de aglutinación.

Una reacción positiva se manifiesta por la aparición de aglutinados rojos sobre un fondo verde (Figura 14).

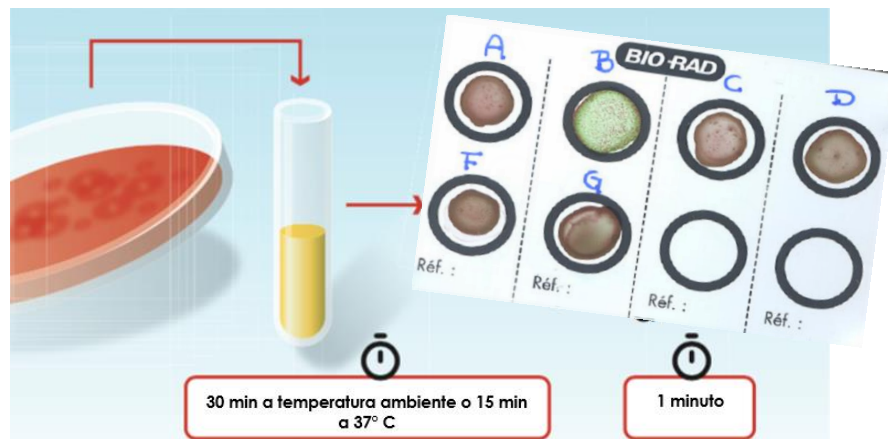


Figura 14. Reacción de coaglutinación en látex positiva para SGB. Con el Kit comercial Pastorex® Strep (BIO-RAD®). B: Reacción de aglutinación positiva evidenciada por aglutinados rojos sobre un fondo verde. A,C,D,F, y G: Reacción de aglutinación negativa

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana mediante la técnica de Kirby Bauer

A partir de colonias aisladas y puras de las cepas de SGB se prosiguió a realizar una suspensión celular en SSI (solución salina isotónica 0.9% NaCl) ajustada a 0.5 escala de MacFarland (1.5×10^8 UFC/mL) para cada cepa. Dichas suspensiones fueron sembradas en placas de agar Mueller-Hinton suplementado con sangre de carnero al 5% por estría masiva con un hisopo

estéril para probar su susceptibilidad (Cuadro 11). Los discos impregnados con antibiótico (Oxoid antimicrobial susceptibility discs) fueron colocados sobre la placa sembrada cuidando que hubiera una distancia pertinente entre cada disco para que no se traslaparan los halos de inhibición. Los antibióticos probados fueron elegidos de acuerdo con las tablas y siguiendo los lineamientos establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) para las pruebas estándar de susceptibilidad antimicrobiana [56]. Las placas fueron incubadas por 24 h a 37° C en una atmósfera enriquecida de CO₂ al 5%. Tras el periodo de incubación se observó el crecimiento bacteriano y se midieron los halos de inhibición del crecimiento para cada antibiótico probado utilizando un vernier y reportando el diámetro del halo en milímetros (Figura 15). Dependiendo del diámetro de cada halo se procedió a interpretarlos como resistentes o sensibles de acuerdo con los criterios del Cuadro 11. Los diámetros que cayeron dentro del rango intermedio fueron considerados como sensibles.

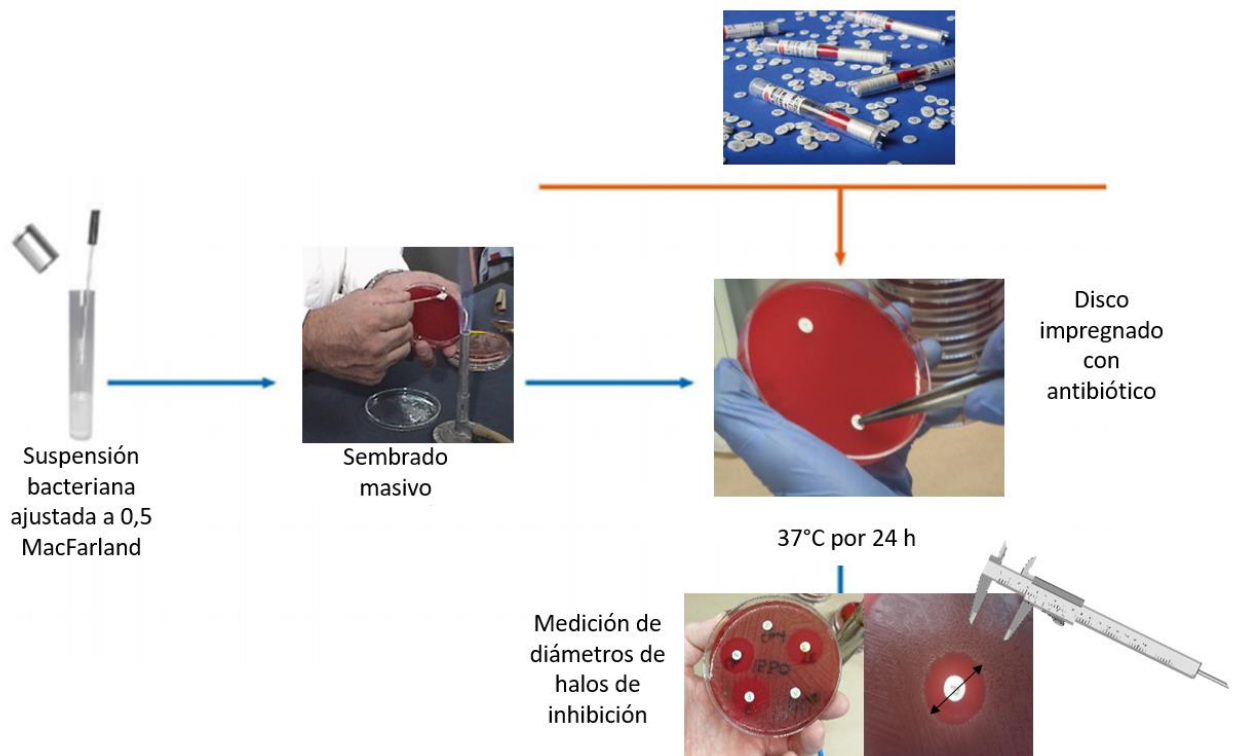


Figura 15. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana [57]. A partir de una suspensión bacteriana ajustada a 0.5 escala de MacFarland se siembra mediante estriado masivo una placa de agar sangre de carnero, donde posteriormente se colocarán los discos impregnados de antibiótico para determinar la susceptibilidad de la bacteria a ellos. Tras 24 h de incubación a 37° C en un atmosfera enriquecida con CO₂ al 5% se miden los halos de inhibición de crecimiento.

Cuadro 11. Lista de antibióticos utilizados en las pruebas de susceptibilidad y criterios de clasificación de resistencia [56].

Antibiótico	Concentración del disco	Resistente (mm)	Intermedio (mm)	Susceptible (mm)
Levofloxacina	5 µg	≤13	14-16	≥17
Eritromicina	15 µg	≤15	16-20	≥21
Clorafenicol	30 µg	≤17	18-20	≥21
Quinupristina-Dalfopristina	15 µg	≤15	16-18	≥19
Clindamicina	2 µg	≤15	16-18	≥19
Tetraciclina	30 µg	≤18	19-22	≥23
Penicilina	10 U			≥24
Vancomicina	30 µg			≥17
Oxacilina	1 µg			≥17
Ceftizoxima	30 µg			≥29

Tipificación capsular mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa

Una vez corroborada la identidad de las cepas como SGB se llevó a cabo la tipificación del polisacárido capsular mediante la reacción en cadena de la polimerasa de punto final.

Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó empleando el kit comercial DNeasy®Tissue (QIAGEN®) siguiendo las instrucciones del proveedor, de acuerdo con la siguiente metodología:

1. La extracción del ADN se realizó a partir de un cultivo bacteriano en caldo BHI de 24h.
2. Preparar el buffer de lisis agregando lisozima (Research Organics®) a una concentración final de 20 mg/mL.
3. En un tubo eppendorf agregar 180 µL de buffer de lisis enzimática recién preparado y adicionar varias colonias de un cultivo puro de 24 h con el fin de obtener una suspensión bacteriana con una concentración aproximada de 2×10^9 UFC/mL. Agitar para homogenizar.

4. Incubar a 37° C durante al menos 30 min. Agitar para homogenizar.
5. Adicional al tubo 25 µL de proteinasa K (>200U/mg) y 200 µL de buffer AL. Agitar para homogenizar.
6. Incubar a 70° C durante 30 min. Agitar para homogenizar.
7. Agregar a la mezcla 200 µL de etanol absoluto frío y agitar en el vórtex vigorosamente.
8. Pasar todo el contenido del tubo a la columna de extracción colocada sobre un tubo de colecta y centrifugar a 8000 rpm por un min. Eliminar el líquido del tubo de colecta.
9. Transferir la columna de extracción a un tubo de colecta nuevo y agregar a la columna 500µL de buffer AW1. Centrifugar a 8000 rpm durante un min. Eliminar el líquido del tubo de colecta.
10. Transferir la columna de extracción a otro tubo de colecta nuevo y agregar a la columna 500µL de buffer AW2. Centrifugar a velocidad máxima por tres minutos. Eliminar el líquido del tubo de colecta.
11. Transferir la columna de extracción a un tubo eppendorf nuevo y estéril y agregar a la columna 200µL de buffer AE. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto para eluir el ADN.

Para evaluar la pureza y la cantidad del ADN extraído se realizó una electroforesis. Se cargaron 5µL de cada muestra de ADN en un gel de agarosa al 1.0%, con 0.5 µL/mL de bromuro de etidio, en buffer 1x de Tris-Boratos-EDTA (TBE). El gel se observa en un transiluminador de luz UV para visualizar las bandas de ADN.

Tipificación molecular por PCR

La amplificación de cada uno de los genes que codifican los tipos capsulares se realizó con el ADN extraído de cada cepa mediante la reacción en cadena de la polimeriza de punto final (PCR). La amplificación de realizó en tres etapas:

1. Todos los ADNs extraídos fueron utilizados para realizar una PCR múltiple, donde se amplificaron simultáneamente tres genes *cfb* (codifica el factor de CAMP), *cpsIII* y *cpsV*.

2. Las muestras de DNA que no amplificaron para los tipos *III* y *V* fueron sometidas a una PCR dual, donde se amplificaron los genes *cpsIa* y *cpsIb*.
3. Por último con las muestras que no amplificaron en las dos reacciones anteriores, se realizaron PCRs individuales para los genes *cpsII*, *cpsIV*, *cpsVI*, *cpsVII* y *cpsVIII*.

Cada reacción de la polimerasa en cadena consistió en 30 ciclos con las siguientes condiciones (Figura 16).

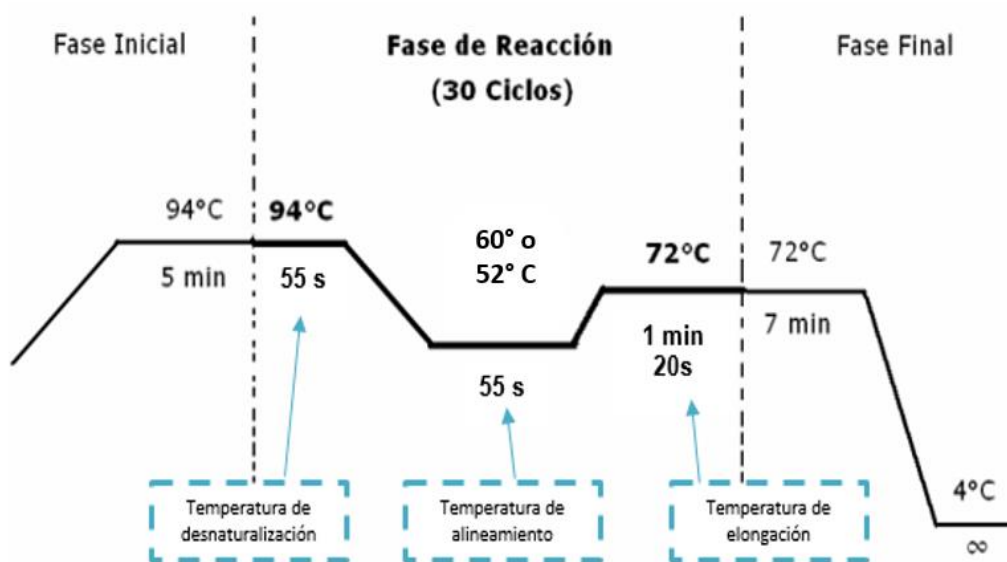


Figura 16. Diagrama de temperaturas utilizadas en la PCR

Las temperaturas de alineamiento cambiaron de acuerdo a los genes que se amplificaron (Cuadro 12).

Cuadro 12. Temperaturas de alineamiento para cada gen amplificado.

Tipo de PCR	Gen	Temperatura de alineamiento
Múltiple	<i>cfb</i> , <i>cpsIII</i> y <i>cpsV</i>	60° C
Dual	<i>cpsIa</i> y <i>cpsIb</i>	60° C
Individual	<i>cpsII</i> ,	52° C
	<i>cpsIV</i> , <i>cpsVI</i> , <i>cpsVII</i> y <i>cpsVIII</i>	60° C

El volumen de cada reacción fue de 15 µL con la siguiente composición (Cuadro13):

Cuadro 13. Composición de la mezcla de reacción utilizada en la PCR.

Reactivo	Volumen (µL)
Buffer para PCR con MgCl ₂ 1.5mM (Vivantis®)	1.5 µL
Deoxinucleótidostrifosfato (dNTPs) (Vivantis®) 1.25 mM	2.5 µL
Primer Forward 10 mM	0.4 µL
Primer Reverse 10 mM	0.4 µL
Taq DNA polimerasa 5 U/µL (Vivantis®)	0.08 µL
Agua ultrapura	c.b.p. 15 µL
ADN blanco	1 µL
Volumen final por reacción	15 µL

Para observar el producto de PCR, se realizó un corrimiento electroforético, en un gel de agarosa al 1.7% en buffer de TBE 1x con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/mL. Para determinar el tamaño del producto obtenido se utilizó un marcador de peso de 100 pb (Fermentas®). La electroforesis se llevó a cabo con las siguientes condiciones: 90V por 40 min, posteriormente fue observado en el transiluminador bajo luz UV. La secuencia nucleotídica de cada uno de los primers utilizados se muestra en el Cuadro 14:

Cuadro 14. Secuencia nucleotídica de los primers utilizados [58].

Gen	Primer	Secuencia (5' a 3')
<i>cfb</i>	CFB-F	ATGATGTATCTATCTGGAAGCTCTAGTG
	CFB-R	CGCAATGAAGTCTTTAATTTTTTC
<i>cpsIa</i>	Ia-HF	ATACAGTTGTCGTAAGAAGAAAAC
	Ia-HR	TGTTTAGCTTTCCTACCAATATTAG
<i>cpsIb</i>	Ib-HF	TTTAGAAGTCCAGAATTCATAGAGTC
	Ib-HR	CAAAGAAAGCCATTGCTCTCTG
<i>cpsII</i>	II-KF	CTCCAGATGGTCTTTGTGAC
	II-KR	AAAATTGGTATATTTCTCTTGAC
<i>cpsIII</i>	III-HF	CCACATATGAGAATAAGACTTGC
	III-HR	CCTAGTGATAGTACTTTGGTTTCTG
<i>cpsIV</i>	IV-HF	TGTAATCATCTACACCCCC
	IV-HR	ATAGCCTTTTGACAGGTAGGTT
<i>cpsV</i>	V-HF	CTTTTTATAGGTTTCGATACCATC
	V-HR	GATGTTCTTTAACAGGTAGATTACAC
<i>cpsVI</i>	VI-HF	TGTTTTCTTACAAAGTGGAGTC
	VI-HR	CCTGTTTTGTTGATAGCTTCTC
<i>cpsVII</i>	VII-MF	GTGCAATTAGAGGACAAAAATTTA
	VII-MR	CATCGAATCAGGAAAAATAGAT
<i>cpsVIII</i>	VIII-JF	ATCTCATGGCATGTCTGG
	VIII-JR	CATTGGAATAACAATCTTATTGC

El tamaño de los productos de PCR amplificados se muestra en el Cuadro 15.

Cuadro 15. 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

RESULTADOS

Identificación de *S. agalactiae*

Se corroboró que las 134 cepas estudiadas correspondieran a *S. agalactiae*, todas mostraron las características morfológicas particulares en agar sangre, evidenciaron una hemólisis sinérgica en la prueba de CAMP y en la tipificación serológica aglutinaron con el antisuero correspondiente al serotipo B.

Susceptibilidad antimicrobiana

Tras realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana con diez antibióticos diferentes, se midieron los halos de inhibición y su interpretación de acuerdo al diámetro obtenido de cada una de las cepas de *S. agalactiae* según los criterios del CLSI. En la Figura 17 se muestra el porcentaje de resistencia a cada antibiótico de acuerdo con su mecanismo de acción.

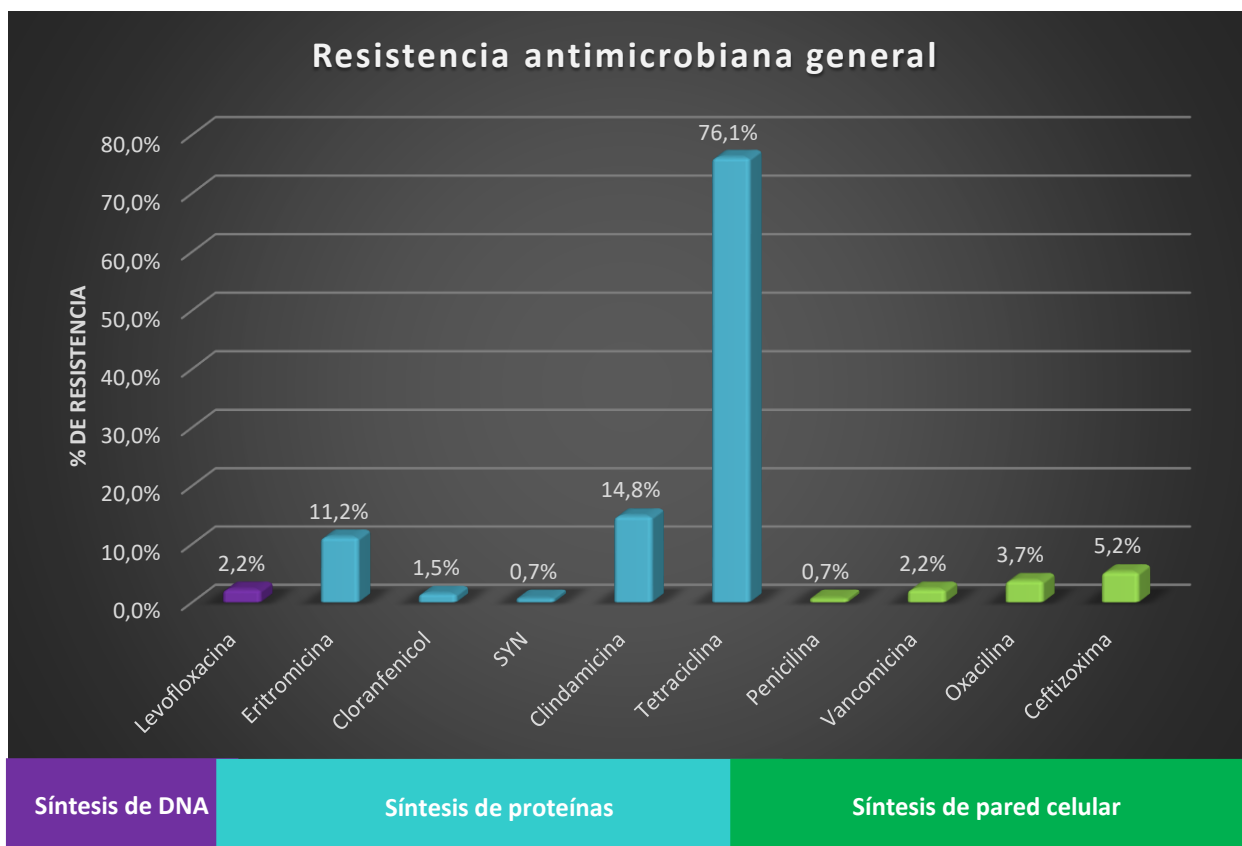


Figura 17. Porcentaje de resistencia de acuerdo con el mecanismo de acción de los antibióticos. (n=134)

En el Cuadro 16 se muestra la frecuencia y el porcentaje general de resistencia obtenida para cada antibiótico en nuestra población de estudio. Se observó que las cepas estudiadas fueron sensibles en mayor proporción a levofloxacin, cloranfenicol, quinupristina-dalfopristina, penicilina, vancomicina, oxacilina y ceftizoxima. La resistencia a eritromicina y clindamicina fue menor al 15%. Y en el caso de tetraciclina mayor de 76%.

Cuadro 16. Frecuencia y porcentaje de resistencia antimicrobiana obtenida para las 134 cepas de *S. agalactiae*.

Antibiótico	Frecuencia de resistencia	% de resistencia
Levofloxacin (LEV)	3	2.2
Eritromicina (E)	15	11.2
Cloranfenicol (C)	2	1.5
Quinupristina-Dalfopristina (SYN)	1	0.7
Clindamicina (Clin)	16	14.8
Tetraciclina (T)	102	76.1
Penicilina (P)	1	0.7
Vancomicina (V)	3	2.2
Oxacilina (Ox)	5	3.7
Ceftizoxima (Zox)	7	5.2

En el Cuadro 17 y Figura 18 se muestran los porcentajes de resistencia antimicrobiana en muestras provenientes de exudados vaginales (n=106). Estas cepas tuvieron una resistencia a tetraciclina del 75.5%. Fueron sensibles a levofloxacin (97.2%), eritromicina (92.5%), cloranfenicol (98.1%), quinupristina-dalfopristina (99.1%), penicilina (99.1%), vancomicina (97.2%), oxacilina (95.3%) y ceftizoxima (93.4%). Y su resistencia a clindamicina fue del 14.5%.

Cuadro 17. Frecuencia y porcentaje de resistencia para cada antibiótico de acuerdo con su origen clínico

Antibiótico	Vaginales (n=106)		Urocultivos (n=27)	
	Frecuencia de resistencia	% de resistencia	Frecuencia de resistencia	% de resistencia
Levofloxacina	3	2.8	0	0
Eritromicina	8	7.5	6	22.2
Cloranfenicol	2	1.9	0	0
Quinupristina-Dalfopristina	1	0.9	0	0
Clindamicina	12	14.5	3	12.5
Tetraciclina	80	75.5	21	77.8
Penicilina	1	0.9	0	0
Vancomicina	3	2.8	0	0
Oxacilina	5	4.7	0	0
Ceftizoxima	7	6.6	0	0

* Una cepa no es considerada en este Cuadro debido a que proviene de la secreción de una herida quirúrgica posparto.

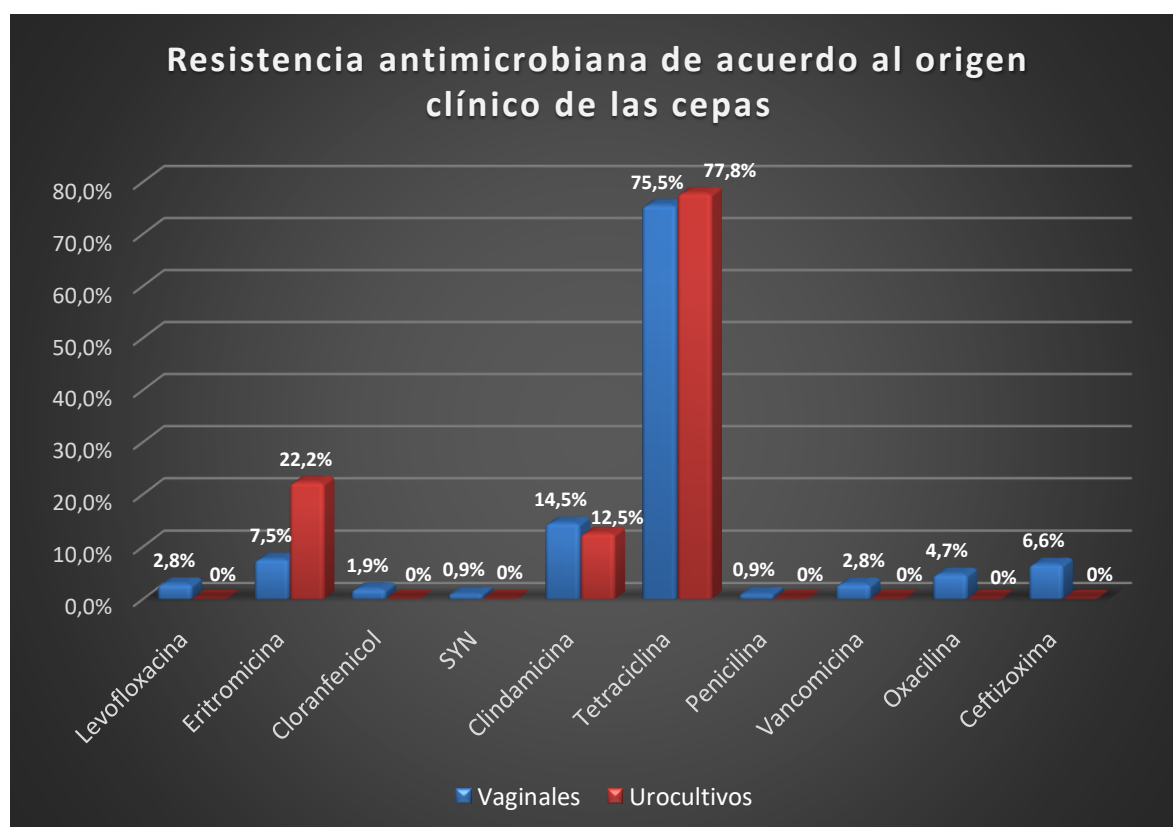


Figura 18. Porcentaje de resistencia antimicrobiana de acuerdo con el origen clínico de la muestra. Vaginales (n=106) y Urocultivos (n=27)

En el Cuadro 17 se muestra la frecuencia y porcentaje de resistencia antimicrobiana en cepas aisladas a partir de urocultivos (Figura 18). Se observó una susceptibilidad total a levofloxacin, cloranfenicol, quinupristina-dalfopristina, penicilina, vancomicina, oxacilina y ceftizoxima. Un porcentaje de resistencia mayor al 75% a tetraciclina (77.8%) y una resistencia a eritromicina y clindamicina menor al 25% (22.2% y 12.5% respectivamente).

El perfil de resistencia antimicrobiana de la cepa proveniente de la secreción de una herida quirúrgica posparto (n=1) mostró susceptibilidad total a levofloxacin, cloranfenicol, quinupristina-dalfopristina, penicilina, vancomicina, oxacilina y ceftizoxima. Dicha cepa fue resistente a tetraciclina, eritromicina y clindamicina.

Tipificación capsular de *S. agalactiae*

La tipificación capsular se llevó a cabo en tres etapas: en la primera 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 esta segunda PCR, se sometieron a PCRs simples, donde se realizó una PCR individual para cada gen restante (*cps II*, *cps IV*, *cps VI*, *cps VII* y *cps VIII*).

En la Figura 19 se observa la amplificación realizada mediante una PCR múltiple. Las cepas con clave 1439 y 1440 fueron utilizadas como controles positivos para los genes *cps V* y *cps III* respectivamente (tipificadas previamente en el laboratorio). Todas las cepas trabajadas (134) presentaron amplificación de una banda de aproximadamente 260 pb (gen *cfb*) correspondiente al factor de CAMP, lo que las identificó como SGB debido a que el gen que codifica el factor de CAMP se encuentra en todos los *S. agalactiae* siendo específico de la especie. En la amplificación del gen *cps III* se observó un producto de PCR cuyo tamaño aproximado es de 340 pb y para el gen *cps V* de 300pb.

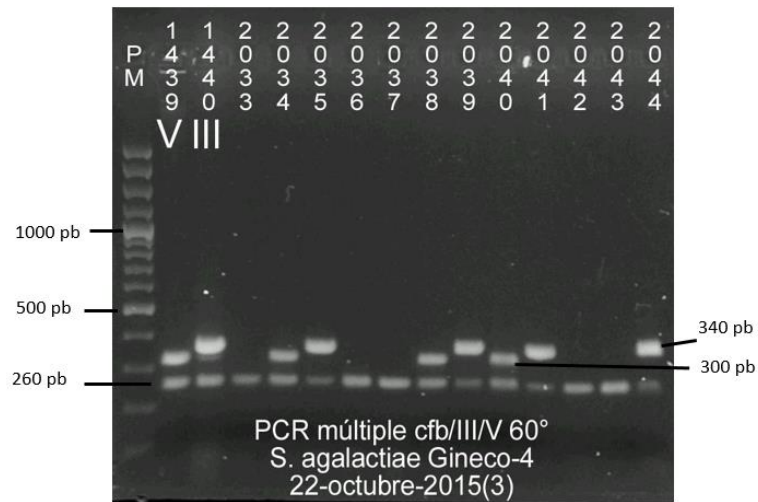


Figura 19. Electroferograma en gel de agarosa al 1.7% de los amplificados de PCR *cfb*, *cpsIII* y *cpsV* (PCR múltiple). PM: marcador de peso molecular de 100 pb.

En la PCR dual se observaron dos productos de PCR de aproximadamente de 300 y 340 pb, correspondientes a los productos de los genes *cps Ib* y *cps Ia* respectivamente. Dos cepas previamente tipificadas en el laboratorio fueron utilizadas como controles positivos de amplificación, con claves 2758 y 2761 (*cps Ia* y *cps Ib* respectivamente) (Figura 20).

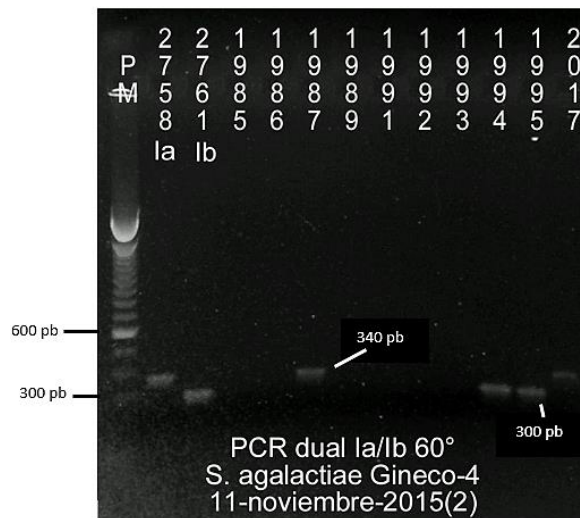


Figura 20. Electroferograma en gel de agarosa al 1.7% de los amplificados de PCR *cpsIa* y *cpsIb* (PCR dual). PM: marcador de peso molecular de 100 pb.

En las PCRs individuales, se obtuvo amplificación de productos para los genes *cps II*, *cps IV* y *cps VI*. Los productos mencionados tienen un tamaño aproximado de 300 pb, 303 pb y 290 pb

(*cps II*, *cps IV* y *cps VI* respectivamente). Cepas previamente tipificadas en el laboratorio se usaron como controles positivos para los genes *cps II*, *cps IV* y *cps VI* correspondientes a las claves 1916 (*cps II*), 1450 (*cps IV*) y 1287 (*cps VI*) (Figura 21).

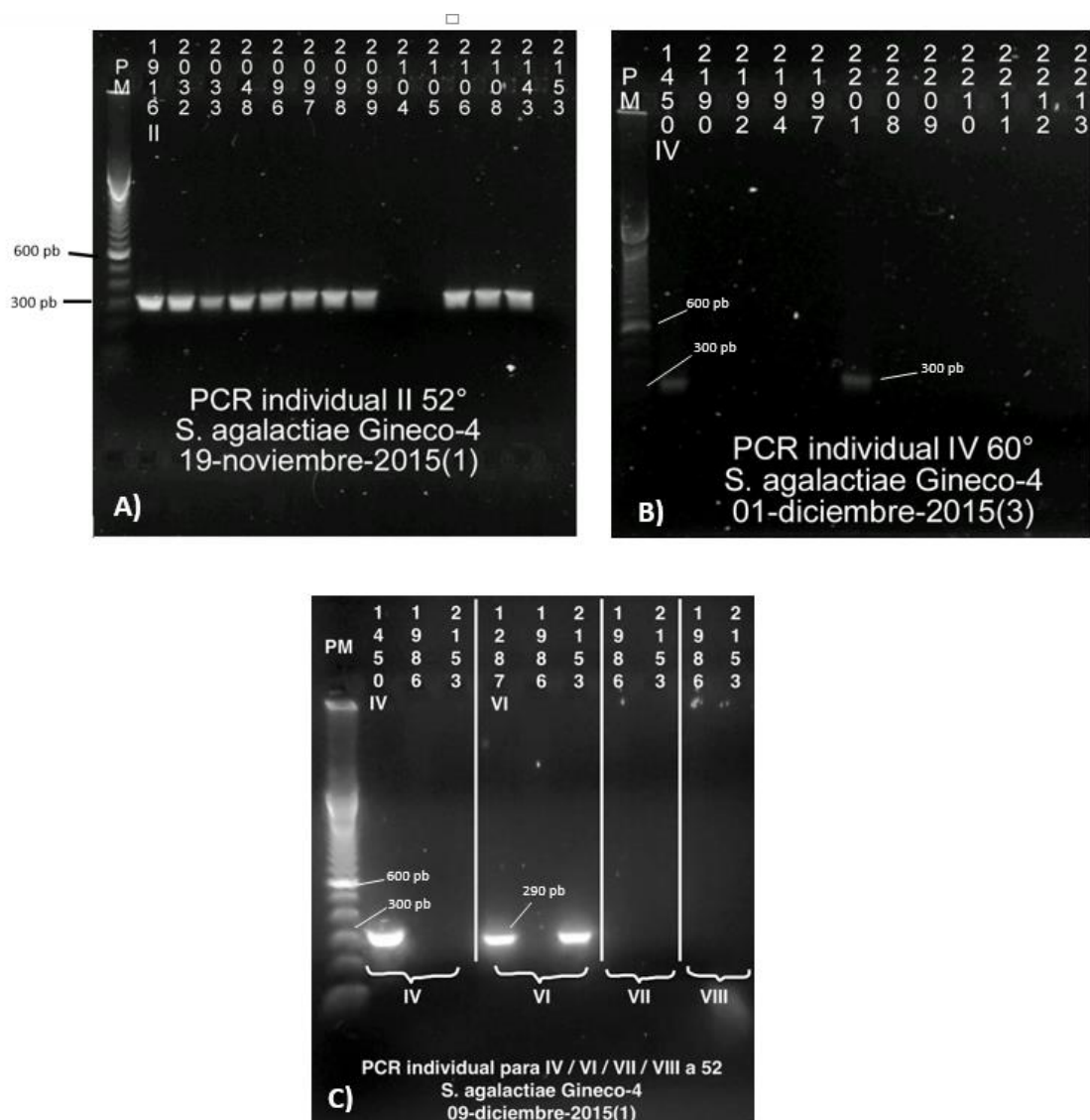


Figura 21. Electroferograma en gel de agarosa al 1.7% de los amplificados de PCR *cpsII* (A), *cpsIV* (B) y *cpsVI* (C).PM: marcador de peso molecular de 100 pb.

La distribución y frecuencia de los tipos capsulares entre las 134 cepas tipificadas se muestra en el Cuadro 18 y Figura 22. El tipo capsular más frecuente fue el **V** (41.8%) seguido por el **la**

(17.9%), **III** (14.9%), **II** (12.7%) y **Ib** (9.7%). Los tipos capsulares menos frecuentes en orden decreciente fueron el **VI**, **IV** con 2.2% y 0.7% respectivamente. No se tipificaron cepas de los tipos **VII** y **VIII**.

Cuadro 18. Frecuencia y distribución general porcentual de los tipos capsulares.

CPS	Frecuencia	% de distribución capsular (n=134)
V	56	41.8%
Ia	24	17.9%
III	20	14.9%
II	17	12.7%
Ib	13	9.7%
VI	3	2.2%
IV	1	0.7%
VII	0	0.0%
VIII	0	0.0%

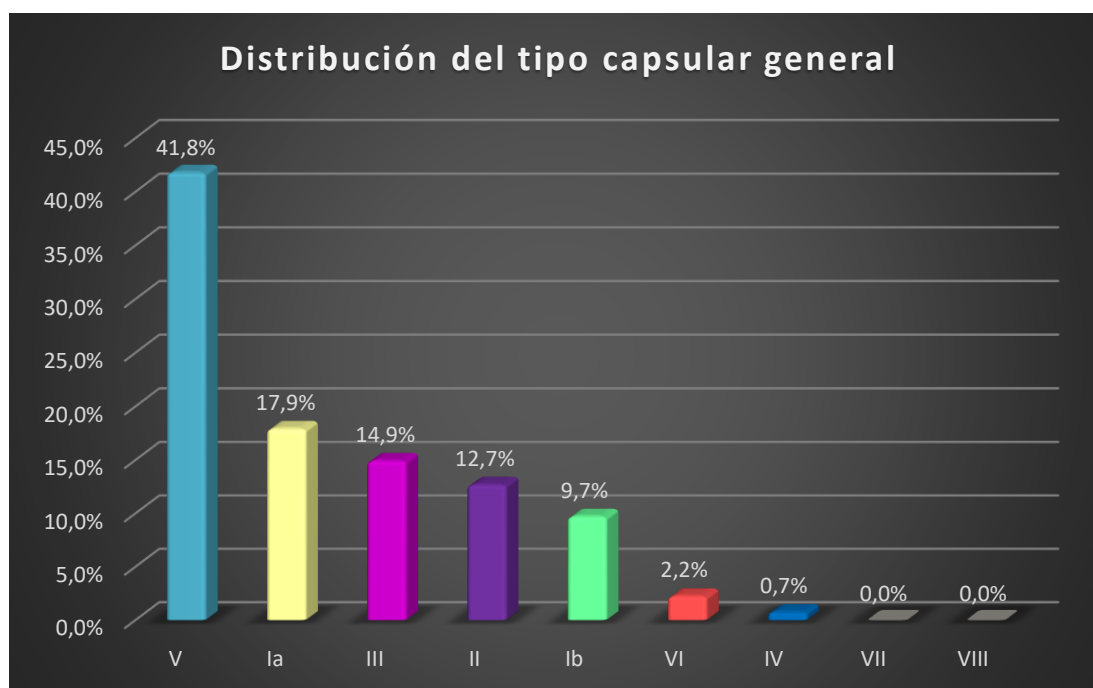


Figura 22. Distribución general porcentual del tipo capsular de SGB.

La distribución del tipo capsular en las cepas provenientes de exudados vaginales (n=106) mostró que el tipo capsular predominante fue el **V** (42.5%), seguido del **Ia** (18.9%), **Ib** (12.3%), **II** (12.3%) y **III** (11.3%). Los tipos menos frecuentes en esta subpoblación son el **VI** y **IV**, con 1.9% y 0.9% respectivamente (Cuadro 19 y Figura 23).

Cuadro 19. Frecuencia y distribución porcentual de los tipos capsulares de acuerdo con su origen clínico.

Tipo CPS	Vaginales (n=106)		Urocultivos (n=27)	
	Frecuencia	% distribución capsular	Frecuencia	% distribución capsular
Ia	20	18.9	4	14.8
Ib	13	12.3	0	0
II	13	12.3	4	14.8
III	12	11.3	8	29.6
IV	1	0.9	0	0
V	45	42.5	10	37
VI	2	1.9	1	3.7
VII	0	0	0	0
VIII	0	0	0	0
Total	106	100	27	100

* Una cepa no fue considerada en este Cuadro debido a que proviene de la secreción de una herida quirúrgica posparto.

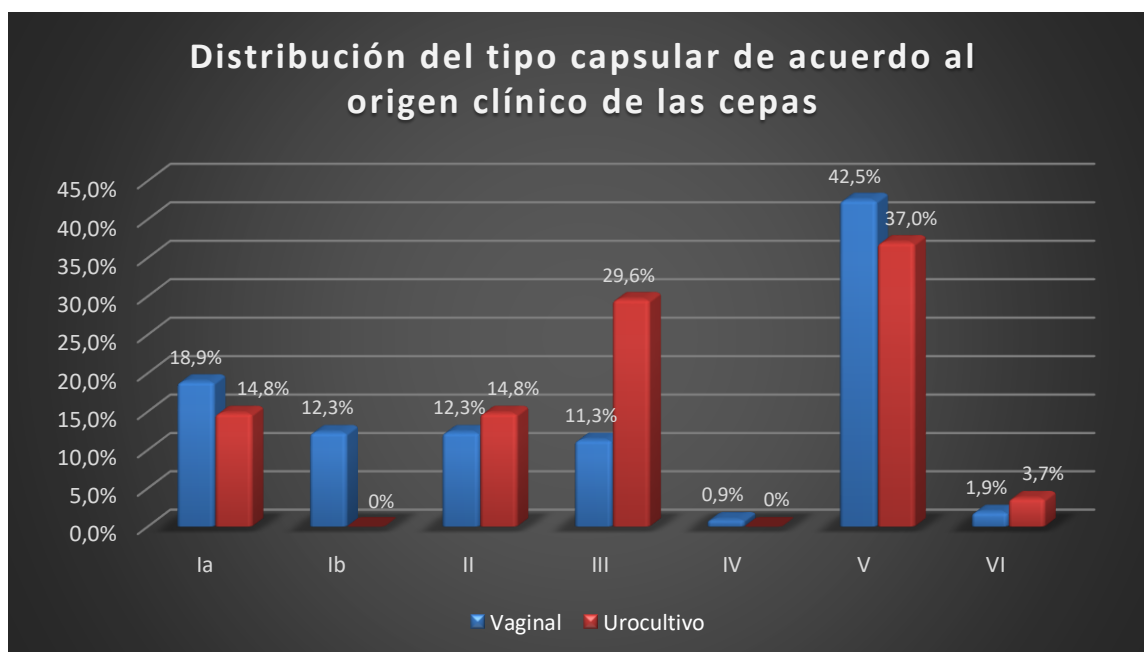


Figura 23. Distribución porcentual de los tipos capsulares de acuerdo con su origen clínico.

La distribución del tipo capsular en las cepas provenientes de urocultivos (n=27) mostró que el tipo capsular más predominante fue el **V** (37%), seguido del **III** (29.6%), **Ia** (14.8%) y **II** (14.8%). El tipo menos frecuente fue el **VI** con 3.7%. No se encontraron cepas tipo **Ib** ni **IV**. (Cuadro 19 y Figura 23).

El tipo capsular de la cepa proveniente de la secreción de una herida quirúrgica posparto fue **V**.

Relación entre la resistencia antimicrobiana y los tipos capsulares de *S. agalactiae*

A continuación se muestra en los Cuadros 20 y 21 y Figuras 24-26, la relación entre el tipo capsular identificado y su perfil de resistencia antimicrobiana.

Cuadro 20. Relación entre la resistencia antimicrobiana y los tipos capsulares de *S. agalactiae*

Tipo capsular	% Resistencia									
	Eritromicina	Tetraciclina	Penicilina	Vancomicina	Cloranfenicol	Levofloxacina	SYN	Oxacilina	Ceftizoxima	Clindamicina
Ia (n=24)	0	44	4	0	0	0	0	0	4	4
Ib (n=13)	0	76.9	0	0	7.7	15.4	0	0	0	7.7
II (n=17)	17.6	82.4	0	0	0	0	0	5.9	5.9	17.6
III (n=20)	30	85	0	5	5	5	5	0	5	25
IV (n=1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V (n=56)	10.7	89.3	0	1.8	0	0	0	7.1	7.1	10.7
VI (n=3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cuadro 21. Relación general del tipo capsular y el perfil de resistencia antimicrobiana.

Clave de la cepa		Resistencia a uno o más antibióticos	
Tipo capsular V			
1985	1	T	
1986	1	T	
1989	1	T	
1990	1	T	
1991	1	T	
1992	3	T, E, Clin	
1993	1	T	
1996	3	T, E, Clin	
1997	0		
1998	1	T	
2020	2	T, E	
2021	2	T, E	
2022	0		
2023	1	T	
2024	0		
2025	2	T, E	
2026	1	T	
2034	1	T	
2038	1	T	
2040	4	T, E, Zox, Clin	
2047	1	T	
2050	1	T	
2051	0		
2052	1	T	
2102	2	T, Clin	
2109	1	T	
2115	1	T	
2116	1	T	
2133	1	T	
2135	2	T, Clin	
2136	1	T	
2137	1	T	
2139	1	T	
2142	1	T	
2144	2	T, Clin	
2145	0		
2151	1	T	
2152	1	T	
2154	0		
2155	1	T	
2157	1	T	
2161	1	T	
2162	1	T	
2164	1	T	
2166	1	T	
2183	2	T, Zox	
2186	1	T	
2189	1	T	
2193	1	T	
2196	2	T, Zox	
2198	1	T	
2203	2	T, Ox	
2204	3	T, Ox, Zox	
2207	3	T, V, Ox	
2211	2	T, Ox	
2213	1	T	
Tipo capsular Ia			
1987	1	T	
2017	2	T, Zox	
2037	0		
2042	0		
2043	0		
2045	1	T	
2046	0		
2049	2	P, Clin	
2100	0	0	
2107	1	T	
2112	0		
2114	0		
2140	1	T	
2149	0		
2156	1	T	
2158	1	T	
2188	0		
2190	0		
2194	1	T	
2197	1	T	
2208	2	T, V	
2209	0		
2210	1	T	
2212	0		
Tipo capsular III			
1988	2	T, Clin	
2016	1	T	
2028	1	T	
2029	1	T	
2035	1	T	
2039	1	T	
2041	3	T, E, Clin	
2044	1	T	
2095	0		
2101	1	T	
2110	3	T, E, Clin	
2111	3	T, E, Clin	
2132	1	T	
2134	1	T	
2150	1	T	
2159	0	0	
2160	5	T, E, C, Lev, Clin	
2195	1	E	
2199	2	T, Zox	
2206	4	T, E, V, SYN	
Tipo capsular II			
2027	1	T	
2030	1	T	
2031	1	T	
2032	1	T	
2033	1	T	
2048	0		
2096	2	Ox, Zox	
2097	1	T	
2098	1	T	
2099	3	T, E, Clin	
2106	3	T, E, Clin	
2108	1	T	
2143	1	T	
2163	3	T, E, Clin	
2165	0		
2191	1	T	
2205	1	T	
Tipo capsular Ib			
1994	1	T	
1995	2	T, C	
2018	1	Lev	
2036	1	T	
2103	0		
2113	1	T	
2138	1	T	
2146	1	T	
2147	1	T	
2148	1	Lev	
2185	2	T, Clin	
2187	1	T	
2192	1	T	
Tipo capsular VI			
2104	0		
2105	0		
2153	0		
Tipo capsular IV			
2201	0		

Las cepas con los tipos capsulares de mayor prevalencia en nuestro estudio presentaron mayor resistencia a tetraciclina, con porcentajes de resistencia variables: **V** (89.3%), **Ia** (44%), **III** (85%), **II** (82.4%) y **Ib** (76.9%) (Cuadro 20). La distribución de los tipos capsulares en las cepas resistentes a tetraciclina mostró que el tipo cps más predominante resistente a tetraciclina fue el **V**, seguido del **III**, **II**, **Ia** y **Ib** (Figura 24).

Cabe mencionar que todos los grupos capsulares tipificados en este estudio con excepción del tipo **Ia**, no tienen resistencia a penicilina, es decir son 100% susceptibles a éste antibiótico. En la población de cepas tipificadas con el tipo capsular **Ia** (n=24), se identificó una cepa resistente a penicilina, lo que le confiere a este subgrupo un 4% de resistencia a dicho antibiótico.

El tipo capsular más común en la población de cepas estudiadas fue el **V**, y presentó el siguiente perfil de resistencia: eritromicina (10.7%), tetraciclina (89.3%), vancomicina (1.8%), oxacilina-ceftizoxima (7.1%) y clindamicina (10.7%).

Las cepas con el tipo capsular **III** tuvieron resistencia a ocho de los diez antibióticos probados, (mayor al 75% para tetraciclina, y menor o igual al 30% para E, V, C, LEV, SYN, ZOX y Clin) siendo únicamente la penicilina y oxacilina los antibióticos a los cuales mostraron un 100% de susceptibilidad.

El mayor porcentaje de resistencia a eritromicina lo presentó el tipo capsular **III** seguido del tipo **II** (30% y 17.6% respectivamente). La distribución de los tipos capsulares en las cepas resistentes a eritromicina mostró que los tipos cps resistentes más prevalentes a este antibiótico fueron el **V**, **III** y **II** (Figura 25).

El tipo capsular con mayor porcentaje de resistencia a clindamicina fue el **III** seguido del **II** (25% y 17.6% respectivamente). La distribución de los tipos capsulares en las cepas resistentes a

clindamicina mostró que los tipos cps más prevalentes resistentes a este antibiótico son el **V**, **III** y **II** (Figura 26).

El quinto tipo capsular más frecuente en la población estudiada fue el **Ib**, caracterizándose por tener el mayor porcentaje de resistencia a levofloxacina (15.4%) con respecto a los demás tipos capsulares. El tipo capsular **III** tuvo 5% de resistencia a levofloxacina y los tipos **V**, **Ia**, **II**, **VI** y **IV** fueron totalmente sensibles a dicho antibiótico.

El tipo capsular que presentó mayor sensibilidad a la batería de antibióticos estudiados fue el **Ia**, es decir es el más sensible. Además de ser el tipo con menor resistencia a tetraciclina en comparación con los demás (44%).

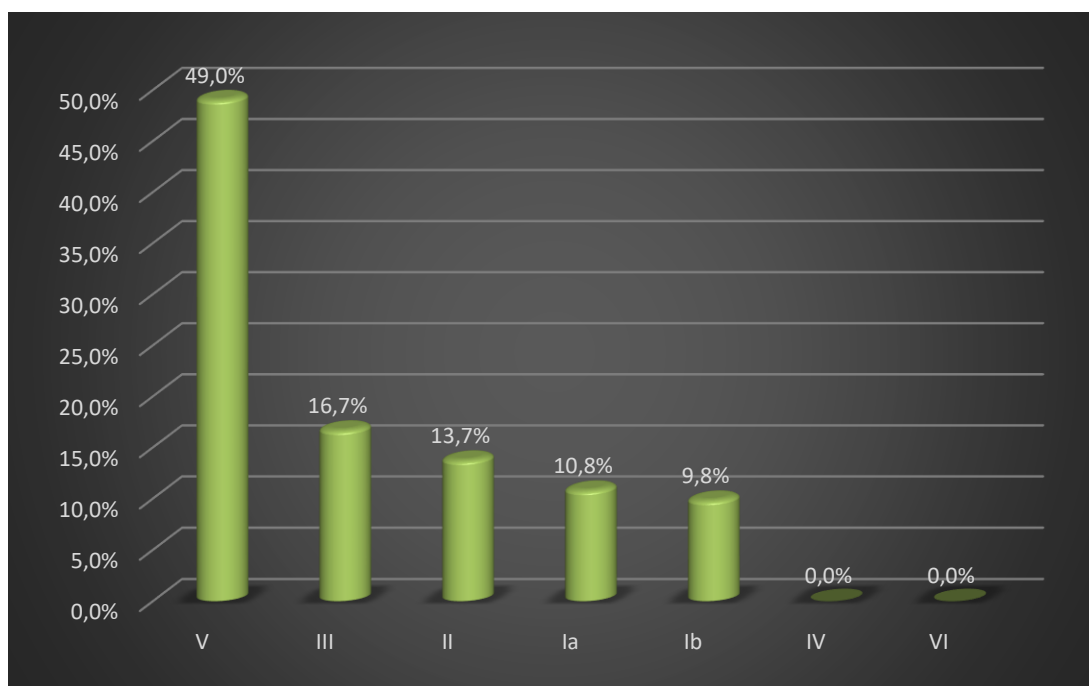


Figura 24. Distribución de los tipos cps de cepas resistentes a tetraciclina (n=102).

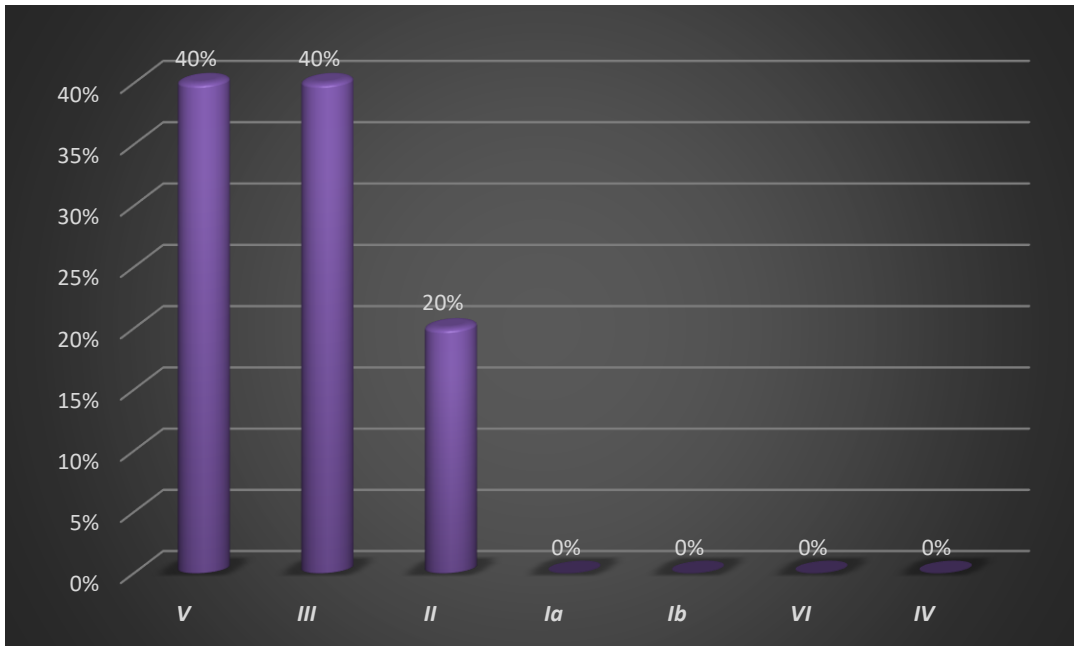


Figura 25. Distribución de los tipos cps de cepas resistentes a eritromicina (n=15).

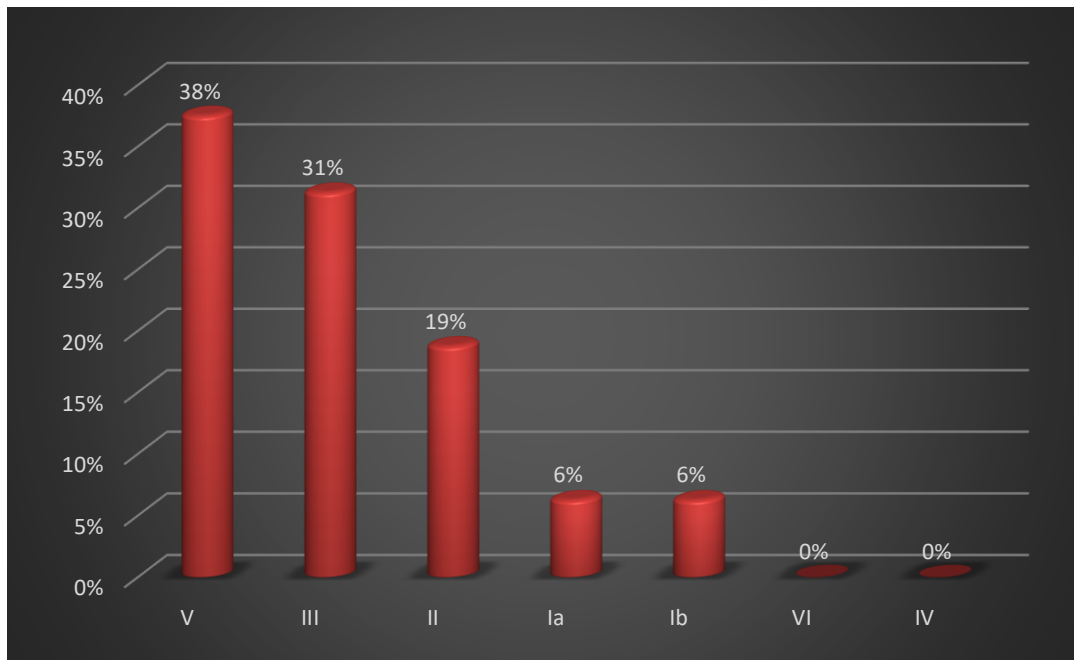


Figura 26. Distribución de los tipos cps de cepas resistentes a clindamicina (n=16).

DISCUSIÓN

Susceptibilidad antimicrobiana

Los SGB son la principal causa de enfermedades severas como meningitis y septicemia en recién nacidos, así como una gran variedad de enfermedades en mujeres embarazadas, no embarazadas y personas de edad avanzada o con enfermedades subyacentes.

El uso inadecuado de antibióticos (automedicación, falta de pruebas de susceptibilidad a antibióticos, el desapego al tratamiento) como alternativa a la profilaxis antibiótica intraparto (IAP), es cuestionable debido a las tendencias a incrementar los niveles de resistencia a eritromicina y clindamicina entre los SGB. De aquí la necesidad de realizar una vigilancia y monitoreo en el cambio de los perfiles de resistencia a antibióticos de cepas de SGB circulantes en nuestro medio.

En nuestro estudio el porcentaje general de resistencia a eritromicina y clindamicina observado en las cepas trabajadas fue de 11.2 % y 14.8% respectivamente, dichos porcentajes son mayores con respecto a los observados en el 2002 y 2004 en dos estudios realizados en México, con valores de resistencia del 5.9 % para eritromicina y menor al 4% para ambos antibióticos [34, 35]; esto indica que la resistencia a eritromicina ha aumentado al doble y casi al triple la de clindamicina en un periodo de 11 años, posiblemente por el uso indiscriminado de estos antibióticos o a la falta de apego a los tratamientos farmacológicos. Porcentajes similares de resistencia para eritromicina se reportan en Suiza, Arabia Saudita e Italia; y para clindamicina en Brasil e Irán (Cuadro 9). Porcentajes mayores al 22% de resistencia a eritromicina se observaron en Irán, Colombia, Bélgica, Nueva York, y China; y mayores al 28% para clindamicina en Colombia, E.U.A y China (Cuadro 9). Dentro de los países que reportan un porcentaje menor al 10% de resistencia para clindamicina se encuentran Etiopía, Brasil y Suiza; en el caso de eritromicina en Brasil, Etiopía y Suecia se han observado porcentajes de resistencia menores al 10% (Cuadro 9). Esto muestra que el grado de resistencia antimicrobiana puede variar de acuerdo con las zonas geográficas y

que el incremento en el uso de macrólidos y lincosamidas en la terapéutica de segunda elección ante la existencia de pacientes con reacciones alérgicas a los β -lactámicos, ha ejercido una presión selectiva que con lleva a un aumento en la resistencia antimicrobiana.

En nuestro estudio se evaluaron cepas provenientes de diferente origen clínico: exudados vaginales, urocultivos y la secreción de una herida quirúrgica posparto (Figura 18 y Cuadro 17). Al comparar los perfiles de resistencia antimicrobiana de acuerdo al origen clínico de la muestra entre exudados vaginales y urocultivos, observamos que dichos perfiles son similares en cuanto a la resistencia a tetraciclina y clindamicina (Figura 18 y Cuadro 17); la mayor resistencia antimicrobiana fue para la tetraciclina en ambos casos (75.5% exudados vaginales y 77.8% en urocultivos), seguida de clindamicina en exudados vaginales (14.5%) y eritromicina en urocultivos (22.2%).

La resistencia a eritromicina en urocultivos fue casi tres veces mayor a la observada en exudados vaginales (22.2% y 7.5%, Figura 18 y Cuadro 17). Contrario a lo reportado en un estudio del 2002 en México en mujeres embarazadas, donde se reportó que la resistencia a eritromicina en cepas de SGB de urocultivos fue de 0% comparada con un 6.5% de las cepas de SGB de exudados vaginales [34]. En cuanto a los perfiles de resistencia a levofloxacina, cloranfenicol, quinupristina-dalfopristina, penicilina, vancomicina, oxacilina y ceftizoxima entre cepas de diferentes orígenes clínicos se observó que las cepas provenientes de exudados vaginales tienen mayor resistencia antimicrobiana en comparación con las cepas de urocultivos, tomando en cuenta que esta diferencia para todos los antibióticos mencionados va del 1 al 7% (Figura 18 y Cuadro 17).

De este comportamiento podemos afirmar que en nuestro estudio el origen clínico de las muestras está relacionado con los perfiles de resistencia antimicrobiana de las cepas aisladas. Este resultado reafirma la importancia de realizar la búsqueda de SGB a partir de varias muestras con orígenes clínicos diversos en una misma paciente (vaginal, urocultivos, anorectal), con el objetivo de aumentar la probabilidad de encontrar al patógeno oportunista y por lo tanto que la mujer y el neonato reciban la atención adecuada.

El porcentaje de resistencia a tetraciclina dentro de las cepas de este estudio sin tomar en cuenta el origen clínico de la muestra fue de 76.1%, un porcentaje alto que correlaciona con el hecho de que la mayoría de las cepas de SGB humanas son consideradas altamente resistentes a las tetraciclinas [25] . Valores similares se observan en Italia y en algunas regiones de Brasil (Rio de Janeiro); menores al 50% en Colombia y Etiopia. Sin embargo, también existen zonas geográficas con porcentajes mayores de resistencia a tetraciclina como China e Irán (Cuadro 9). La resistencia a tetraciclina podría explicarse debido al uso indiscriminado de la misma a lo largo del mundo y a que las cepas estudiadas son de pacientes intrahospitalarios, donde pudiera estar circulando una cepa resistente a tetraciclina, que por recombinación genética estuviese transmitiendo la información a otras cepas para adquirir dicha resistencia.

La penicilina es el antibiótico de primera elección en el tratamiento profiláctico en mujeres embarazadas con infección por SGB, de acuerdo con nuestro estudio las cepas trabajadas presentaron 100% de susceptibilidad a penicilina, excepto por una cepa que presentó resistencia (1/134, Cuadro 17). La susceptibilidad total a la penicilina se ha observado en general a lo largo del mundo, en países como Suiza, Irán, Brasil, China, Colombia, Argentina, Arabia Saudita, Etiopia, por mencionar algunos donde la resistencia a penicilina es nula para SGB (Cuadro 9). Recientemente en Japón y E.U.A., se han caracterizado algunas cepas con disminución en su susceptibilidad a penicilina, en nuestro estudio la cepa resistente que encontramos podría formar parte de este brote de cepas recientemente reportadas [48]. Para determinar si la cepa resistente a penicilina forma parte de este grupo es necesario calcular la CIM (concentración mínima inhibitoria) de penicilina en nuestra población y compararla con la CIM de la cepa resistente, esperando ver un aumento en ésta última con respecto a la de la población. La baja susceptibilidad a la penicilina reportada se asocia frecuentemente con mutaciones en las proteínas de unión a penicilina PBP 2X y PBP 2B [25, 39]. El hecho de que la susceptibilidad a la penicilina sea total, es alentador ya que habla

de que la terapia de primera elección para controlar la infección por SGB en mujeres gestantes continúa siendo eficaz en nuestro país.

Con fines de este estudio se toma como multirresistente una cepa que presenta resistencia a tres o más antibióticos diferentes. Alrededor de 13 de las cepas estudiadas presentaron multirresistencia (Cuadro 21), hecho que podría explicarse dado su origen intrahospitalario donde puede existir una selección positiva sobre las bacterias.

Distribución del tipo capsular

La distribución de los tipos capsulares en las 134 cepas tipificadas por PCR, mostró que el tipo capsular predominante en nuestra población de estudio fue el **V** (41.8%), seguido del **Ia** y **III** (17.9% y 14.9% respectivamente), finalmente el **II**, **Ib**, **VI** y **IV** con el 12.7%, 9.7%, 2.2% y 0.7% respectivamente (Cuadro 18 y Figura 22). En México en el 2005, se reportó una distribución del tipos capsulares del 48.6% tipo **I**, 32.9 % tipo **III** y 14% tipo **II** [32]. Un estudio más del 2004 en mujeres embarazadas en México reportó 58.8% tipo **I**, 29.4% tipo **II** y 5.9% tipo **III** [35]. Se puede observar que el tipo cps **V** no figuraba entre los más frecuentes y ahora es el de mayor prevalencia. Entre 2004 y 2005 el tipo cps **I** (**Ia+Ib**) era el más predominante, 58.8% y 48.6% respectivamente. De acuerdo con lo reportado en los estudios mencionados, este tipo cps ha disminuido su prevalencia en la Ciudad de México a lo largo de estos años, llegando a ser del 28.1% en el 2016 de acuerdo con nuestros resultados. En cuanto al tipo cps **III** en nuestro estudio se observó una disminución en la prevalencia casi del 50% con respecto a la observada en el 2005 (32.9%) [32]. La frecuencia del tipo cps **II** se ha modificado muy poco con respecto a lo observado en el 2005.

Nuestros datos reportan porcentajes similares en la prevalencia del tipo cps **V** con los observados en Francia, del tipo **Ia** con Suiza, Irlanda y China, del tipo **III** con Brasil, del tipo **II** con Irlanda e India, y del tipo **Ib** con Irán e Inglaterra (Cuadro 6).

La distribución global de acuerdo con una revisión del 2012 muestra que el tipo cps **III** es el más frecuente en diversas regiones (48.9%) seguidos de los tipos **Ia** (22.9%), **V** (9.1%), **Ib** (7.0%) y **II** (6.2%) [33]. En comparación con esta revisión, las cepas estudiadas muestran que efectivamente los tipos más comunes son el **Ia**, **Ib**, **II**, **III** y **V**, a pesar de no tener la misma frecuencia que la reportada como global. A lo largo de casi diez años los principales tipos capsulares en México se han mantenido constantes, aun cuando entre ellos ha variado la frecuencia. Lo anterior sugiere que la vacuna polivalente propuesta como medida preventiva mundial que incluye los tipos **Ia**, **Ib**, **II**, **III** y **V** también podría ser funcional en nuestro país para prevenir la infección por SGB, con una eficacia teórica del 97% de acuerdo con resultados encontrados en este estudio de los tipos capsulares más frecuentes.

En este trabajo se tipificaron cepas de diferente origen clínico (Cuadro 19 y Figura 23), la distribución de los tipos cps entre las muestras de exudados vaginales y de urocultivos muestran que el tipo **V** es el más prevalente para ambos casos, 42.5% y 37% respectivamente. Esto muestra congruencia con los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio en el 2013, donde se identificó al cps **V** como el tipo de mayor prevalencia en cepas provenientes de exudados vaginales y de urocultivos [59]. En estudios realizados en la Ciudad de México del 2002 [34], 2005 [32] y 2008 [58] se había reportado al tipo cps **I** (que incluye **Ia+Ib**) como el tipo de mayor predominancia en muestras con este origen clínico, lo que nos indica una vez más que aunque la distribución de los tipos cps no varía significativamente en el tiempo la frecuencia de éstos sí puede ser modificada en plazos cortos de tiempo dentro de una misma región.

En cepas provenientes de exudados vaginales, el segundo tipo cps predominante fue el **Ia** (18.9%), lo que muestra similitud con los resultados obtenidos previamente en el laboratorio (18%) en el 2013 [59]. En los urocultivos el cps **Ia** tuvo una prevalencia del 14.8% siendo el tercer tipo cps predominante junto con el tipo **II** en muestras de dicho origen.

En cuanto al tipo cps **III** en urocultivos mostró tener una prevalencia del 29.6%, 2.5 veces mayor a la observada en exudados vaginales (11.3%), similar a lo observado en el 2002 [34] donde esta relación entre ambos orígenes clínicos para el cps **III** fue de 3:1, 40% y 13% respectivamente [34]. La prevalencia del cps tipo **II** entre exudados vaginales y urocultivos fue similar. No se tipificaron cepas tipo **Ib** y **IV** a partir de urocultivos. En exudados vaginales se tipificó un 12.3% tipo **Ib** comparable con lo reportado en el 2008 (11.2%) en nuestro laboratorio, y un 0.9% con tipo **IV**. Cabe resaltar que la única cepa tipificada como cps **IV** en nuestro estudio proviene de un exudado vaginal.

Se sabe que el tipo capsular **III** es uno de los tipos que se asocia en mayor medida con EOD y LOD, mientras que el **V** y **Ia** se asocia frecuentemente con la enfermedad invasiva en adultos [21]. Dado que los tipos **V**, **Ia** y **III** son los que tienen mayor prevalencia de acuerdo con este estudio en México, es importante realizar más estudios que nos brinden mayor información epidemiológica sobre la incidencia de la enfermedad invasiva por SGB, la distribución y frecuencia de los tipos cps en las diferentes regiones del país, debido a que los datos conocidos hasta ahora en su mayoría contemplan estudios realizados en la Ciudad de México [23].

Relación entre la resistencia antimicrobiana y los tipos capsulares de *S. agalactiae*

Los tipos capsulares predominantes del estudio (**V**, **Ia**, **III**, **II** y **Ib**) presentaron mayor resistencia al antibiótico tetraciclina. Los mecanismos de resistencia a la tetraciclina de los SGB reportados actualmente están relacionados con genes de protección ribosomal (genes **tetM**, **tetT** y **tetO**) o con la bomba de eflujo del antibiótico (genes **tetK** o **tetL**). La alta resistencia a tetraciclina entre los tipos capsulares **V**, **III**, **II** y **Ib** está distribuida de forma uniforme e independiente del tipo capsular. Mientras que el tipo **Ia** fue el más sensible a la tetraciclina, presentando una resistencia del 48% para dicho antibiótico (Cuadro 20).

Es probable que la resistencia a tetraciclina se deba a una amplia distribución de los genes que le confieren dicha resistencia entre las cepas estudiadas e incluso podríamos sospechar que hay un alto índice de transferencia de información genética entre las cepas dado su

origen intrahospitalario. Dentro de las cepas resistentes a tetraciclina en nuestro estudio, el tipo cps predominante fue el **V** (49%, Figura 24), similar a lo reportado previamente en el laboratorio en el 2013 (36%) [59]. Se sabe que las cepas con cps **V** se asocian mayormente con infección invasiva en adultos, por lo que es de relevancia establecer esquemas de vigilancia epidemiológica alrededor de estas cepas y de la población susceptible a ellas. Nuestros datos muestran que en cepas resistentes a tetraciclina el 16.7% pertenece al cps **III**, el 13.7% al **II**, el 10.8% al **Ia** y el 9.8% al **Ib** (Figura 24). La distribución en orden decreciente de prevalencia de tipos cps reportada previamente en el laboratorio en el 2013 fue **V** (36%), **III** (28%), **Ia** (27%), **II** (7%) y **Ib** (2%) [59]. Podemos observar que en ambos estudios los dos tipos capsulares predominantes dentro de la población resistente a tetraciclina son el **V** y el **III**.

Se sabe que los tipos cps resistentes a tetraciclina reportados como más prevalentes en nuestro estudio son los más frecuentes globalmente, sin embargo en la actualidad la tetraciclina no se utiliza como tratamiento para infecciones por SGB de acuerdo con las guías de los CDC.

En cuanto a las cepas resistentes a clindamicina, se observó que los tipos cps que predominaron son el **V** (38%), **III** (31%) y **II** (19%) (Figura 26).

Respecto a las cepas resistentes a eritromicina la distribución de los tipos capsulares fue **V**, **III** y **II** en orden decreciente de prevalencia, con 40%, 40% y 20% respectivamente (Figura 25), similar a lo observado en estudios previamente realizados en nuestro laboratorio en el 2013 donde el cps tipo **V** fue el más prevalente, seguido del **III**, **Ia** y **II** [59]. El tipo **Ia**, en el 2013 tenía un 20% de prevalencia en cepas de SGB resistentes a eritromicina mientras que en la actualidad es del 0% en nuestra población de estudio.

Italia y Suiza reportaron en dos estudios del 2007 y 2014 que el tipo cps **V** está asociado con resistencia a eritromicina [37], parecido a lo observado en nuestro estudio.

En general, se observó que los tipos **V** y **III** son el primer y tercer tipo capsular más común en nuestra población de estudio y también mostraron ser los tipos con mayor resistencia a diferentes antibióticos (Cuadro 20). Así como lo reportado en un estudio de Brasil en el 2013, donde los tipos **III** y **V** fueron los más frecuentes y resistentes a diferentes antibióticos [40].

El tipo capsular **III** (3ro más predominante en nuestra población) presentó resistencia a un mayor número de antibióticos, es decir las cepas cps **III** estudiadas tienden a ser multirresistentes. Otros estudios también han reportado al tipo **III** como uno de los tipos capsulares encontrados con mayor frecuencia en casos de infección invasiva.

Los tipos capsulares **III** y **II** fueron los que mostraron tener mayor resistencia a la eritromicina con 30% y 17.6%, y a clindamicina con 25% y 17.6% respectivamente. La resistencia a eritromicina está asociada frecuentemente pero no siempre con resistencia a clindamicina [28]. Por lo que es pertinente realizar la prueba “D” a las cepas que son resistentes a eritromicina y susceptibles a clindamicina para corroborar que dichas cepas no presenten resistencia a clindamicina inducida por la eritromicina. La resistencia inducible para macrólidos, lincosamidas y estreptograminas no se detecta utilizando los test de susceptibilidad antimicrobiana estándar, por consiguiente la no identificación de esta resistencia inducible puede conducir a una falla del tratamiento con clindamicina. En estos casos se debe realizar en conjunto el antibiograma convencional y la prueba “D” para clindamicina y eritromicina.

El quinto tipo capsular más frecuente en nuestro estudio fue el **Ib**, caracterizado por tener el mayor porcentaje de resistencia a levofloxacina (15.4%) con respecto a los demás tipos cps que fueron totalmente susceptibles a este antibiótico (sin tomar en cuenta el **III** que presentó una ligera resistencia del 5%). En Asia se han reportado cepas resistentes a levofloxacina, específicamente en China con alrededor de 35.7% de resistencia [16, 25]. Se han descrito diversos mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas, dentro de las que se incluyen mutaciones en los genes que codifican la DNA girasa y la topoisomerasa IV

dando lugar a las QRDR, que son alteraciones en la permeabilidad de la membrana que disminuyen la penetración intracelular del fármaco, y la activación de transportadores de expulsión de los antibióticos desde la membrana celular al medio exterior [60]. Este antibiótico actualmente no es utilizado en el tratamiento de infecciones por SGB de acuerdo con los CDCs. Sin embargo en caso de ser necesario su uso, debe ser utilizado con reserva y como uno de los últimos recursos de tratamiento para no favorecer la aparición de cepas resistentes o el aumento de la prevalencia en las mismas.

Se recomienda dar seguimiento epidemiológico de las cepas resistentes con el fin de establecer si el tratamiento farmacológico con determinado antibiótico es el adecuado de acuerdo con la zona geográfica y a una población específica.

La investigación y la vigilancia de los cambios en la distribución de tipos capsulares y su susceptibilidad a los antibióticos son de gran relevancia y utilidad para la prevención y el tratamiento de las infecciones causadas por SGB.

CONCLUSIONES

- La distribución de los tipos capsulares más frecuentes obtenidos en nuestro estudio en orden decreciente fue **V** (40%), **Ia**, **III**, **II** y **Ib** (con porcentajes entre 10% y 20%).
- En nuestra población de estudio no se identificaron cepas de los tipos **VII** y **VIII**.
- La distribución en el mundo de los tipos capsulares con frecuencias variables es similar a la observada en nuestro estudio.
- El tipo **III** es más frecuente en cepas provenientes de urocultivos (29.6%) con respecto a las cepas de exudados vaginales (11.3%). No se tipificaron cepas **Ib** ni **IV** de urocultivos.
- La prevalencia de susceptibilidad a penicilina de los SGB es alta (100%), lo que corrobora la eficacia del tratamiento profiláctico en mujeres gestantes.
- La tetraciclina es el antibiótico al cual las cepas estudiadas presentan mayor resistencia. En cepas resistentes a tetraciclina los tipos capsulares más representativos son el **V** y el **III**.
- La resistencia a eritromicina y clindamicina ha aumentado en los últimos diez años en México. En cepas resistentes a eritromicina los tipos capsulares más representativos son el **II**, **III** y **V**. En cepas resistentes a clindamicina los tipos capsulares más representativos son el **III** y el **V**. No se encontraron cepas con tipo cps **Ia** ni **Ib** resistentes a eritromicina.
- En general los tipos capsulares **III** y **V** son los que presentan resistencia a un mayor número de antibióticos.
- Los únicos tipos cps que mostraron tener resistencia a levofloxacina fueron el **Ib** y **III**.
- La implementación en México de guías de recomendaciones para el manejo de infecciones por SGB de forma oficial y de cobertura nacional es indispensable para la prevención y tratamiento específico de las enfermedades causadas por este agente.
- El proyecto de vacunación contra los tipos cps prevalentes puede prevenir riesgos de reacciones alérgicas a antibióticos y disminuir las tasas de resistencia

antimicrobiana, y en nuestro país podría tener una eficacia teórica de hasta el 97% de acuerdo a nuestros resultados de distribución y prevalencia de los tipos cps.

REFERENCIAS

- [1] Brooks, G. Carrol, K. Butel, J. Mietzner, T. **Microbiología médica. Jawetz. Melnick y Adelberg**, 25ª ed., Mc Graw Hill. México, 2011, pp. 195.
- [2] Kenneth, J. C. George, R. **Sherris. Microbiología médica**. 5ª ed., Mc Graw Hill. México, 2011, pp. 342.
- [3] Murray, P. Rosenthal, K. Pfaller, M. **Microbiología médica**. 7a ed., Elsevier Saunders. España, 2014, pp. 188.
- [4] Winn, W. Allen, S. Janda, W. Koneman, E. **Koneman. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas en color**. 6ª ed., Editorial medica panamericana. Argentina, 2008, pp. 640-641.
- [5] Chen, V. Avci, F. Kasper, D. (2013) **A maternal vaccine against Group B *Streptococcus*: past, present and future**. *Vaccine*: 31(04): D13–D19.
- [6] Porras, L. Castón, J. Sáenz, A. (2010) **Infecciones por estreptococo. Clasificación. Factores predisponentes. Aspectos patogénicos de relevancia clínica o diagnóstica. Manifestaciones clínicas. Formas de comienzo**. *Medicine*: 10(50): 3339-45.
- [7] Maisey, H. Doran, K. Nizet, V. (2009) **Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence**. *Expert Rev Mol Med*: 10 (e27): 1-18.
- [8] Beigverdi, R. Jabalameli, F. Mirsalehian, A. (2014) **Virulence factors, antimicrobial susceptibility and molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women**. *Acta Microbiol Imm H*: 61 (4): 425-434.
- [9] Dore, N. Bennett, D. Kaliszer, M. (2003) **Molecular epidemiology of group B streptococci in Ireland: associations between serotype, invasive status and presence of genes encoding putative virulence factors**. *Epidemiol Infect*: 131, 823–833.
- [10] Dutra, V. Alves, V. Olendzki, A. (2014) ***Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility**. *BMC Infect Dis*: 14:323.
- [11] MacFaddin, J. **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica**. 3ª ed., Editorial Médica Panamericana. Argentina, 2004.
- [12] Garza-Velasco, R. **Manual de prácticas de bacteriología**. Comité editorial de la Facultad de Química, U.N.A.M. 2005.
- [13] Universidad de Salamanca, **Pruebas de identificación**. [En línea]. «Servidor educativo. Depto de microbiología y genética» [Fecha de consulta 20 noviembre 2015]. Disponible en: <http://edicion-micro.usal.es/web/identificacion/AyudaPruebas.html>
- [14] Bennett, J. Dolin, R. Blaser, M. **Principles and practice of infectious diseases**. 8ª ed., Elsevier Saunders. Canadá, 2015.
- [15] Alarcón, P. **Diagnóstico microbiológico del género *Streptococcus***. [En línea] Instituto de Salud Pública. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile. [Fecha de consulta 20 mayo 2016]. Disponible en: <http://www.ispch.cl/boletines>.
- [16] Wang, P. Tong, J. Ma, X. Song, F. (2015) **Serotypes, antibiotic susceptibilities, and multi-locus sequence type profiles of *Streptococcus agalactiae* Isolates circulating in Beijing, China**. *Plos One*: 10(3):1-13.
- [17] Slotved, H. Kong, F. Lambertsen, L. (2007) **Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype**. *JCM*: 45(9): 2929–2936.
- [18] Johri, A. Lata, H. Yadav, P. Dua, M. (2013) **Review: Epidemiology of group B *Streptococcus* in developing countries**. *Vaccine*: 31(S): D43– D45.
- [19] Yao, K. Poulsen, K. Maione, D. (2013) **Capsular gene typing of *Streptococcus agalactiae* compared to serotyping by latex agglutination**. *JCM*: 51 (2): 503-507.
- [20] Toniolo, C. Balducci, E. Romano, M. (2015) ***Streptococcus agalactiae* capsule polymer length and attachment is determined by the proteins CpsABCD**. *J. Biol. Chem*: 290 (15): 9521–9532.

- [21] Teatero, S. McGeer, A. Low, D. Li, A. (2014) **Characterization of invasive group B *Streptococcus* strains from the greater Toronto area, Canada.** JCM: 52(5): 1441–1447.
- [22] Le Doare, K. Heath, P. (2013) **Review: an overview of global GBS epidemiology.** Vaccine: 31(S): D7-D12.
- [23] Reyna, J. Ortiz, F. Jaramillo, A. (2007) **Maternal B group *Streptococcus* colonization in Mexico: prevalence based on literature review.** Ginecol Obstet Mex: 75(7): 399-403.
- [24] Galarza, P. Callejo, R. **Recomendaciones para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección precoz por estreptococo β hemolítico del grupo B (EGB).** Dirección nacional de salud materno infantil, Ministerio de Salud de la Nación. Argentina 2004, pp. 1-13.
- [25] Melin, P. Efstratiou, A. (2013) **Review: group B streptococcal epidemiology and vaccine needs in developed countries.** Vaccine: 31(S): D31-D42.
- [26] Nuccitelli, A. Rinaudo, C. (2015) **Review: Group B *Streptococcus* vaccine: state of the art.** Ther Adv Vaccines: 3(3): 76-90.
- [27] UNICEF. **Inter-agency group for child mortality estimation.** [En línea] El banco mundial de datos, UNICEF [Fecha de consulta 20 noviembre 2015] Disponible en: <http://datos.bancomundial.org/indicador/SH.DYN.NMRT>.
- [28] Verani, J. McGee, L. Schrag, S. (2010) **Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from Centers for Disease Control and Prevention.** Atlanta, E.U.A. MMWR 2010;59.
- [29] Reyna, J. Ortiz, F. Pérez, B. (2008) **Quimioprofilaxis para evitar la colonización materna por estreptococo grupo B. Consecuencias de no adoptar la recomendación internacional.** Salud Publica Mex: 50(2):155-161.
- [30] Secretaría de Salud. **Mortalidad neonatal.** [En línea] [Fecha de consulta 18 Noviembre 2015] Disponible en: <http://www.spps.gob.mx/noticias/277-oms-disminuye-la-mortalidad-neonatal.html>
- [31] Revuelta, A. Rodríguez, K. **Panorama epidemiológico y estadístico de la mortalidad en México 2011.** [En línea] Dirección general de epidemiología, SSA. [Fecha de consulta 20 de mayo 2015] Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2015/Mortalidad_2011.pdf.
- [32] Palacios, G. González, M. Beltrán, M. (2005) **Serotypes of 286 group B streptococci isolated from asymptomatic carriers and invasive disease cases in Mexico.** Rev Latinoam Microbiol: 47(1-2): 21-24.
- [33] Edmond, K. Kortsalioudaki, C. Scott, S. (2012) **Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis.** Lancet: 379: 547–556.
- [34] González, A. Ortiz, M. Mota, R. (2002) **Serotypes and antimicrobial susceptibility of group B *Streptococcus* from pregnant women in Mexico.** Rev Latinoam Microbiol: 44(3-4): 133-136.
- [35] Villaseñor, A. Morales, P. Palacios, G. (2004) **Prevalence of *Streptococcus agalactiae* serotype III in pregnant women.** Ginecol Obstet Mexi: 72, pp. 103-108.
- [36] Emaneini, M. Mirsalehian, A. Beigvierdi, R. (2014) **High incidence of macrolide and tetracycline resistance among *Streptococcus agalactiae* strains isolated from clinical samples in Tehran, Iran.** JCM: 9(2): 157-161.
- [37] Fröhlicher, S. Reichem, G. Muller, M. (2014) **Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of group B streptococci in pregnant women: results from a Swiss tertiary centre.** Swiss Med Wkly: 144:w13935.
- [38] Bergal, A. Loucif, L. Benouareth, D. (2015) **Molecular epidemiology and distribution of serotypes, genotypes, and antibiotic resistance genes of *Streptococcus agalactiae* clinical isolates from Guelma, Algeria and Marseille. France.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis: 34:2339–2348.
- [39] Saori, E. Beletto, A. Reis, E. (2013) **Commensal *Streptococcus agalactiae* isolated from patients seen at University hospital of Londrina, Paraná, Brazil: capsular types, genotyping, antimicrobial susceptibility and virulence determinants.** BMC Microbiology: 13(297): 1-9.
- [40] Tavolaro, C. Sales, D. Da Silva, G. (2013) **Prevalence of Group B *Streptococcus* serotypes III and V in pregnant women of Rio de Janeiro, Brazil.** Braz J Microbiol: 44(3): 869–872.

- [41] Sadeh, M. Firouzi, R. Derakhshandeh, A. (2016) **Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates from pregnant and non-pregnant women at Yazd University hospital, Iran, Irán.** Jundishapur J Microbiol 9(2): 1-6.
- [42] Burns, G. Plumb, J. (2013) **GBS public awareness, advocacy, and prevention—What’s working, what’s not and why we need a maternal GBS vaccine.** Vaccine 4(S): D58–D65.
- [43] Heath, P. (2016) **Status of vaccine research and development of vaccines for GBS.** Vaccine: 34(26): 2876–2879.
- [44] Menard, J. Bretelle, F. (2009) **Infecciones cervicovaginales durante el embarazo (recomendaciones)** EMC - Tratado de medicina: E – 5-047-G-30, pp. 1-9.
- [45] Madigan, Brock. **Biología de los microorganismos**, 10 ed., Pearson Prentice Hall. España, 2006.
- [46] Organización Mundial de la Salud. **Resistencia a los antimicrobianos.** [En línea] Centro de prensa [Fecha de consulta 18 de Abril 2015] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>.
- [47] Morier, D. **Resistencia a antibióticos.** [En línea] Enciclopedia Británica. School and library subscribers [Fecha de consulta 21 Noviembre 2015]. Disponible en: <http://global.britannica.com/science/antibiotic-resistance>.
- [48] Nagano, N. Nagano, Y. Toyama, M. (2014) **Penicillin-susceptible group B streptococcal clinical isolates with reduced cephalosporin susceptibility.** J Clin Microbiol: 52(9): 3406–3410.
- [49] Mengist, A. Kannan, H. Abdissa, A. (2016) **Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of anorectal and vaginal group B streptococci isolates among pregnant women in Jimma, Ethiopia,** BMC Res Notes: 9(351): 1-5.
- [50] Khan, A. Faiz, A. Ashshi, AM. (2015) **Maternal colonization of group B streptococcus: prevalence, associated factors and antimicrobial resistance.** Ann Saudi Med: 35(6): 423-427.
- [51] Gherardi, G. Imperi, M. Baldassarri, L. (2007) **Molecular epidemiology and distribution of serotypes, surface proteins, and antibiotic resistance among group B streptococci in Italy.** J Clin Microbiol: 45(9): 2909–2916.
- [52] Duque, C. Sánchez, D. Uribe, O. (2011) **Perfil de sensibilidad de *S. agalactiae* obtenido a partir de muestras de introito vaginal y región perineal de mujeres gestantes de Medellín (Colombia),** NOVA Publicación científica en ciencias biomédicas: 9(15): 31-34.
- [53] Ephraim, E. O’Grady, E. Back, J. (2012) **High rates of perinatal group B streptococcus clindamycin and erythromycin resistance in an upstate New York hospital.** Antimicrob Agents Chemother.: 56(2): 739–742.
- [54] Mingoia, M. Morici, E. Marini, E. (2016) **Macrolide resistance gene erm(TR) and erm(TR)-carrying genetic elements in *Streptococcus agalactiae*: characterization of ICESagTR7, a new composite element containing IMESp2907.** J Antimicrob Chemother: 71(3): 593–600.
- [55] Bolukaoto, J. Monyama, C. Chukwu, M. (2015) **Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women in Garankuwa, South Africa.** BMC Res Notes: 8(364): 1-7.
- [56] Patel, J. Cockerill, F. Alder, **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement.** Clinical and Laboratory Standards Institute Vol. 34 No. 1, 2014, pp. 94-97. Pensilvania, Estados Unidos:.
- [57] Gamazo, C. Sánchez, S. Camacho, A. **Microbiología basada en la experimentación.** Elsevier.España, 2013.
- [58] Monroy, I. **Aplicación de la técnica de PCR en la tipificación de aislamientos clínicos de *Streptococcus agalactiae*, México.** Tesis de licenciatura Q.F.B.. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.
- [59] Zavala, K. **Identificación de genes asociados a la resistencia a eritromicina y tetraciclina en aislamientos clínicos de *S. agalactiae* y su asociación con el serotipo capsular, México.** Tesis de licenciatura Q.F.B., Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 2013.

- [60] Taléns-Visconti, R. Garriques, TM. Cantón, E. (2002) **Quinolones and Streptococcus pneumoniae. Mechanisms of action and resistance.** Rev Esp Quimioter: 15 (4): 313-324.
- [61] Zalazar, A. **Prevalencia de Strptococcus agalactiae en mujeres embarazadas.** Tesis doctoral, facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba 2009. Córdoba, Argentina.