

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE MEDICINA-CARRERA BIOQUÍMICA CLÍNICA

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICO
CLÍNICO**

**CARACTERIZACIÓN DE CEPAS AISLADAS DE *Streptococcus agalactiae*
REMITIDAS AL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
PÚBLICA (INSPI) DE LA CIUDAD DE QUITO DE OCTUBRE 2007 A MARZO
2016**

VALERIA FERNANDA CASTRILLÓN CALLE

WILSON ARTURO MUÑOZ VIDAL

MAGISTER JOSÉ EDUARDO VILLACÍS ACUÑA

QUITO, 2016

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Valeria Fernanda Castrillón Calle C.I. 1718559493 autor/a del trabajo de graduación titulado: “Caracterización de cepas aisladas de *Streptococcus agalactiae* remitidas al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Quito de octubre 2007 a marzo 2016”, previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la FACULTAD DE MEDICINA.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Valeria Fernanda Castrillón Calle

C.I. 1718559493

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Wilson Arturo Muñoz Vidal C.I. 1725716235 autor/a del trabajo de graduación titulado: “Caracterización de cepas aisladas de *Streptococcus agalactiae* remitidas al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Quito de octubre 2007 a marzo 2016”, previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la FACULTAD DE MEDICINA.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Wilson Arturo Muñoz Vidal

C.I. 1725716235

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Bioquímica clínica de los estudiantes Valeria Fernanda Castrillón Calle y Wilson Arturo Muñoz Vidal sobre el tema “Caracterización de cepas aisladas de *Streptococcus agalactiae* remitidas al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Quito de octubre 2007 a marzo 2016” ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas, por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



José Eduardo Villacís Acuña, Mgt.

Director de la Disertación

Quito, 24 de agosto de 2016

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a nuestros padres por la confianza y el apoyo tanto moral y económico brindado para poder llevar a cabo esta investigación.

Agradecemos a la PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR, en especial a la FACULTAD DE MEDICINA-CARRERA BIOQUÍMICA CLÍNICA, por la formación académica y ética como profesionales del área de la salud e investigación.

También queremos expresar nuestro agradecimiento sincero al Centro Nacional de Resistencias a los Antimicrobianos del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI “Leopoldo Izquieta Pérez” de la ciudad de Quito, ya que sin su apoyo no se habría podido lograr este trabajo de investigación.

Agradecemos de manera muy especial al Máster José Eduardo Villacís, nuestro director de tesis que, gracias a su apoyo, confianza, paciencia y consejos dentro de este proceso investigativo, se pudo concluir con éxito esta disertación.

De igual manera queremos extender nuestra gratitud al Máster Andrés Zabala y al Doctor Santiago Escalante quienes con sus sugerencias y correcciones permitieron consolidar y concluir la redacción del presente trabajo de investigación.

DEDICATORIA

“A mis padres, Carmen y Fernando, a mi hermana Nathaly quienes son mi apoyo y los pilares de mi vida. A mi esposo Michel Eduardo quien ha sido mi soporte constante. A mis amigos quienes me han brindaron su tiempo y amistad.”

Valeria Castrillón C.

“Esta investigación la dedico a: Janet V. y a Wilson M., mis padres, quienes me apoyan y soportan todas mis locuras, a mi amiga Valeria C. quien sin su constante apoyo no se hubiera realizado esta investigación y, por último, a Rafael T. y Francisco M.”

Wilson Muñoz V.

TABLA DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
LISTA DE TABLAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE SIGLAS.....	X
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XIV
CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. JUSTIFICACIÓN.....	5
1.2. OBJETIVOS.....	8
1.2.1. General.....	8
1.2.2. Específicos.....	8
CAPÍTULO II.....	9
2. MARCO TEÓRICO.....	9
2.1. ANTECEDENTES.....	9
2.2. <i>Streptococcus agalactiae</i>	11

2.2.1.	Taxonomía.....	11
2.2.2.	Características del microorganismo.....	11
2.2.3.	Epidemiología.....	15
2.2.4.	Transmisión y factores de riesgo.....	16
2.2.5.	Patogénesis.....	17
2.2.6.	Diagnóstico del microorganismo.....	17
2.2.7.	Pruebas fenotípicas de la resistencia a antibióticos.....	24
2.2.8.	Métodos moleculares.....	27
2.3.	TRATAMIENTO.....	30
2.4.	VACUNACIÓN.....	32
2.5.	ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN.....	32
2.6.	ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN EN RECIEN NACIDOS EN EL ECUADOR.....	34
3.	MARCO CONCEPTUAL.....	35
	OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.....	36
	CAPÍTULO III.....	38
4.	MARCO METODOLÓGICO.....	38
4.1.	TIPO DE ESTUDIO.....	38
4.2.	TIPO DE MUESTREO.....	38
4.3.	TAMAÑO DE MUESTRA.....	39

4.4.	DECISIÓN.....	39
4.5.	CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	39
4.6.	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	40
4.7.	PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO.....	40
4.7.1.	Materiales y reactivos.....	40
4.7.2.	Métodos.....	42
4.7.3.	Control de calidad.....	46
	CAPÍTULO IV.....	47
5.	RESULTADOS.....	47
5.1.	PRUEBAS FENOTÍPICAS DE IDENTIFICACIÓN.....	49
5.2.	PERFILES DE SUSCEPTIBILIDAD.....	49
5.3.	PRUEBAS GENOTÍPICAS DE IDENTIFICACIÓN.....	52
5.4.	DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA TIPO <i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>lnuB</i>	52
5.5.	SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>ermB</i>	55
6.	DISCUSIÓN.....	57
7.	CONCLUSIONES.....	65
8.	RECOMENDACIONES.....	67
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	68
10.	ANEXOS.....	85
11.	FIGURAS.....	108

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Genes y secuencia de Primers de <i>Streptococcus agalactiae</i> utilizados en estudio.	29
Tabla 2: Tabla de contingencia de cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i> en el período desde 2007 a 2016 y porcentajes por género.	47
Tabla 3: Tabla de contingencia de la distribución de cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i> según tipo de muestra.....	48
Tabla 4: Cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i> resistentes a macrólidos, lincosamidas y estreptogramidas.....	53
Tabla 5: Cantidades usadas para realización de crioviales.....	87
Tabla 6: Tabla de recolección de datos de las muestras de <i>Streptococcus agalactiae</i> estudiadas.....	88
Tabla 7: Diámetros de los halos de inhibición de los antibióticos utilizados de los antibiogramas de las cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i>	96
Tabla 8: MasterMix para la detección del gen de identificación <i>cfb</i>	100
Tabla 9: MasterMix para la detección del gen de identificación <i>atr</i>	100
Tabla 10: Condiciones para termociclado genes <i>cfb</i> y <i>atr</i>	101
Tabla 11: MasterMix para la detección del gen de resistencia <i>ermA</i>	103
Tabla 12: MasterMix para la detección del gen de resistencia <i>ermB</i>	103
Tabla 13: MasterMix para la detección del gen de resistencia <i>lnuB</i>	104
Tabla 14: Condiciones para termociclado genes <i>ermA</i> y <i>ermB</i>	104
Tabla 15: Condiciones para termociclado gen <i>lnuB</i>	104
Tabla 16: Correlación entre el perfil de resistencia de cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i> que amplificaron el gen <i>ermB</i> con el tipo de sustitución de aminoácidos encontrados.	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Antibiogramas de algunas de las cepas resistentes a macrólidos y lincosamidas.	50
Figura 2: Porcentaje de sensibilidad a antibióticos de las cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i> estudiadas.....	51
Figura 3: Porcentaje de fenotipos de MLS _B en las cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i> que amplificaron para el gen <i>ermB</i>	55
Figura 4: Posicionamiento de discos.	91
Figura 4: Algoritmo recomendado para la profilaxis de pacientes embarazadas.	95
Figura 6: Orden de envío.	106
Figura 7: Resultado positivo del test de CAMP..	108
Figura 8: Prueba de sensibilidad hacia la bacitracina de baja carga.	109
Figura 9: Diferentes agares cromogénicos disponibles.	110
Figura 10: Técnica de estriado en placa.	111
Figura 11: Pruebas fenotípicas de algunas de las cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i>	112
Figura 12: Gel de productos de la PCR para el gen <i>cfb</i>	113
Figura 13: Gel de PCR para el gen <i>atr</i>	114
Figura 14: Gel de amplificación del gen <i>ermB</i>	115
Figura 15: Secuenciación del gen <i>ermB</i>	116

LISTA DE SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CTX	Cefotaxima
DA	Clindamicina
E	Eritromicina
EOD	Early-onset disease
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GBS	Estreptococo del grupo de B
INSPI	Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública
LOD	Late-onset disease
LEV	Levofloxacina
MLS _B	Macrólidos, Lincosamidas y Estreptograminas del grupo B
OMS	Organización mundial de la salud
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PYR	L-pyrroglutamil-aminopeptidasa
VP	Voges-Proskauer

RESUMEN

Streptococcus agalactiae es una bacteria colonizadora de tracto gastrointestinal, sin embargo, constituye un problema de salud pública en pacientes inmunocomprometidos, así como en neonatos e incluso en adultos no gestantes por las infecciones que causa. La identificación de este patógeno es crucial para los pacientes de riesgo como también para las mujeres gestantes en su último trimestre de embarazo por la transmisión vertical que podría ocasionar al neonato. A su vez, se requiere de una identificación adecuada de los perfiles de resistencia de esta bacteria para evitar la terapia antibiótica errónea o empírica lo que conllevaría a la aparición de nuevas resistencias bacterianas.

Por este motivo el objetivo de esta investigación fue caracterizar las cepas de *Streptococcus agalactiae* remitidas al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Quito de octubre 2007 a marzo 2016. Este objetivo abarca el aporte de datos de estas cepas tanto en la caracterización fenotípica como genotípica. Además, determinar las resistencias a los antibióticos, conjuntamente con sus genes de resistencia.

Para este estudio se incluyeron los aislados clínicos provenientes del cepario del área de: “Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos” (RAM) del INSPI-Q dentro del cual existió un total de 103 cepas de *Streptococcus agalactiae*, 57 cumplieron con los criterios de inclusión propuestos en este estudio que fueron reactivadas en agar sangre de cordero. La identificación fenotípica de todos los aislados se realizó mediante pruebas como la observación microscópica, con tinción Gram, seguido de la prueba de catalasa, además de la observación de la hemólisis producida por las colonias en agar sangre de cordero, así como

el test de CAMP y la prueba de susceptibilidad al disco de bacitracina. Mientras que, para la identificación genotípica de las cepas estudiadas, se extrajo el ADN mediante ebullición y se buscó, mediante la prueba de PCR, la amplificación de los genes *cfb* (codifica el factor CAMP), y el gen *atr* (gen housekeeping de *Streptococcus agalactiae*) los cuales fueron utilizados como marcadores moleculares de identificación de género y especie. Todas las cepas de este estudio fueron sometidas a pruebas de sensibilidad hacia penicilina, cefotaxima, levofloxacin, ciprofloxacina, eritromicina y clindamicina mediante el método de Kirby-Bauer, los halos de inhibición fueron interpretados de acuerdo a los puntos de corte presentados en el CLSI 2015. Las cepas que presentaron resistencia a macrólidos o lincosamidas se las sometió a la prueba de sensibilidad a antimicrobianos por un método automatizado (VITEK®-2Compact) para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los antibióticos eritromicina, clindamicina y quinupristina/dalfopristina. Por otro lado, el análisis molecular de las resistencias consistió en la extracción de ADN mediante ebullición, y la posterior amplificación de los genes *ermA*, *ermB* y *lnuB*. Se realizó la secuenciación del gen *ermB* para de esta manera evidenciar la presencia de sitios polimórficos a nivel de secuencia nucleotídica; para lograr esto se enviaron los amplicones purificados a la empresa MacroGen®.

Dentro de los resultados, todas las cepas fueron identificadas fenotípicamente de forma satisfactoria puesto que 57/57 cepas obtuvieron los resultados esperados. Y, 56/57 cepas amplificaron para los genes de identificación *cfb* y *atr*. El 100% de las cepas fueron sensibles a penicilina y cefotaxima. La sensibilidad a levofloxacin y ciprofloxacina fue del 82.5% y 77.2% respectivamente. Por otro lado, la sensibilidad a eritromicina y clindamicina fue del 77.2% y 71.9% y, con una resistencia de 21.1% y 28.1% con la presencia de varios

fenotipos, además, un 2% mostró sensibilidad intermedia a eritromicina. Algunos fenotipos fueron encontrados en las cepas resistentes a eritromicina y/o clindamicina, el 55.6% de las cepas presentaron un fenotipo de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B de tipo constitutivo (cMLS_B), el 11.1% fueron de tipo inducible (iMLS_B), el 22.2% mostraron un fenotipo de resistencia a lincosamidas (L) mientras que el 5.6% tuvieron el fenotipo de resistencia a macrólidos (M) y, por último, el 5.6% fueron no clasificables. El gen de resistencia de mayor predominio fue *ermB*. No existieron cepas que amplifiquen para los genes de resistencia *ermA* y *lnuB*. La secuenciación demostró que existen mutaciones del gen *ermB* dentro de algunas de las cepas pero que no afectan a la expresión del mismo. Sin embargo, se encontró una cepa susceptible que amplificó para el gen *ermB* y no se encontraron mutaciones dentro de su secuencia nucleotídica.

Estos resultados evidencian la resistencia de las cepas de *Streptococcus agalactiae* hacia antibióticos utilizados en terapéutica y denota la importancia que se debe dar a la vigilancia de este patógeno en particular. Además, se concluye que la resistencia a macrólidos y lincosamidas se debe al gen *ermB* en varias de las cepas analizadas.

PALABRAS CLAVE:

Streptococcus agalactiae, Estreptococo Beta Hemolítico del grupo B, GBS, MLS_B, Test en D, *atr*, *cfb*, *ermA*, *ermB*, *lnuB*, MIC, Secuenciación.

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae colonizes the gastrointestinal tract, however, is referred as a public health problem for immunocompromised patients as well as in newborns and even in non-pregnant adults due to the caused infections. The identification of this pathogen is crucial in patients at risk as well for pregnant women in their third trimester because of the vertical transmission to the newborn. At the same time, it is required the adequate identification of its antibiotic resistance patterns so empiric or inaccurate antibiotic therapy is avoided which may cause an emerge of new bacterial resistance mechanisms.

For this reason, the main objective of this study is to characterize the *Streptococcus agalactiae* strains sent to the “Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública” (INSPI) of Quito from October 2007 to March 2016. This objective encompasses the data of these strains of their phenotypic and genotypic characterization. Moreover, the determination of the antibiotic resistance patterns as well as their resistance genes.

For this study, the clinical isolates held in the strain collection of INSPI’s “Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos” (RAM) area were included, there was a total of 103 strains of *Streptococcus agalactiae*, only 57 of them met the inclusion criteria proposed in this study and they were activated in blood sheep agar. The phenotypic identification of all strains was done by many tests such as the microscopic observation of the gram stain, besides the catalase test, as well as the observation of the hemolysis produced by colonies in sheep blood agar, also a CAMP test and the susceptibility test to bacitracin. For the genotypic identification of the studied strains, the DNA was extracted by boiling procedure and aimed,

by PCR, the amplification of the *cfb* gene (which codifies the CAMP factor) and the *atr* gene (housekeeping gene of *Streptococcus agalactiae*), both genes were used as molecular targets for the identification of genre and species. All strains were tested to penicillin, cefotaxime, levofloxacin, ciprofloxacin, erythromycin and clindamycin by the Kirby-Bauer method, all inhibition halos were interpreted according to the CLSI 2015 breakpoints. The isolates that were resistant to macrolides or lincosamides, were tested by an automatic method of antibiotic susceptibility such as VITEK®-2Compact to determine the minimal inhibitory concentration of erythromycin, clindamycin and quinupristin/dalfopristin. On the other hand, the molecular analysis of the resistances consisted on the DNA extraction by boiling procedure and the amplification of *ermA*, *ermB* and *lnuB* genes. The sequence type of the *ermB* gene was done to show the presence of polymorphic sites in the nucleotide level to achieve this, the purified amplicons were sent to MacroGen®.

The results of the phenotypic identification were successful, 57/57 strains had the expected results. But 56/57 strains amplified the identification genes *cfb* and *atr*.

These results exhibit the resistance of the *Streptococcus agalactiae* strains to antibiotics frequently used in therapeutic and also expose the importance to monitor this particular pathogen. The 100% of the strains were sensitive to penicillin and cefotaxime. The sensitivity to levofloxacin and ciprofloxacin were 82.5% and 77.2% respectively. On the other hand, the sensitivity to erythromycin and clindamycin were 77.2% and 71.9% with the resistance of 21.1% and 28.1% with the presence of several phenotypes and also a 2% had an intermediate sensitivity to erythromycin. The isolates that were resistant to erythromycin or clindamycin exposed several phenotypes, 55.6% of the strains showed the constitutive resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin B antibiotics (cMLS_B), the 11.1%

showed the inducible phenotype (iMLS_B), a 22.2% had the lincosamide resistance phenotype (L), just the 5.6% presented the macrolide resistance phenotype (M) and at last, the 5.6% were unclassified. The most predominant resistance gene was *ermB*. None of the isolates amplified *ermA* and *lnuB* genes. The sequencing showed the mutations of the *ermB* gene among some strains but they didn't affect the gene expression. Interestingly, one susceptible strain amplified to *ermB* gene and no nucleotide mutation was found.

These results exhibit the resistance of the *Streptococcus agalactiae* strains to antibiotics frequently used in therapeutic and also expose the importance to monitor this particular pathogen. In conclusion, the resistance to macrolides and lincosamides of some strains of this study was conferred by the *ermB* gene.

KEYWORDS:

Streptococcus agalactiae, Beta-hemolytic streptococci, GBS, MLS_B, D Test method, *atr*, *cfb*, *ermA*, *ermB*, *lnuB*, MIC, sequencing.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

El *Streptococcus agalactiae* también conocido como estreptococo del grupo de B (GBS) es un coco Gram positivo que forma cadenas (García et al., 2011), incapaz de desdoblar la catalasa (catalasa negativa), puede crecer en ambientes microaerofílicos como aerobios (anaerobio facultativo), con la capacidad de hemolizar la sangre en su totalidad (β -hemólisis.) (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2014); este patógeno puede causar infecciones sistémicas tanto en neonatos como en pacientes inmunocomprometidos (Berg, Houseman, Garrasi, Young, & Newton, 2013; Weston et al., 2012).

El *Streptococcus agalactiae* no solo está relacionado como la causa de sepsis la cual se caracteriza por ser una infección bacteriana que tiene por consecuencia del paso y la invasión del patógeno en el torrente sanguíneo (González, Caraballo, Guerrero, & Montenegro, 2006), sino que también se le considera el agente causal de varias afecciones que se las clasifica en un grupo denominado “Enfermedad de inicio temprano” o por sus siglas en inglés “EOD” (early-onset disease) que incluyen afecciones como bacteriemia, neumonía y meningitis que pueden llevar a la pérdida de audición o bien a la muerte (Weston et al., 2012). Así mismo, se la asocia con otro grupo de afecciones correspondientes a la “Enfermedad de inicio tardío” o bien por sus siglas en inglés “LOD” (late-onset disease). Estas dos afecciones tanto EOD como LOD, se presentan en neonatos; si la afección se da desde el momento del nacimiento hasta la primera semana de vida se la denomina EOD,

mientras que, si la afección se ocasionó entre la primera semana hasta los 3 meses de vida, se la clasifica como LOD (Dagneu et al., 2012).

A nivel mundial, *Streptococcus agalactiae* ha sido un problema de salud pública, sobretodo en neonatos, por ser la causa de EOD y LOD en dichos pacientes (Florindo et al., 2011). Si bien la patogenia de esta bacteria se ha asociado, casi siempre, a casos de mujeres embarazadas y neonatos, las infecciones de adultos con enfermedades de base han aumentado, sobretodo de casos invasivos (Castro, Silva et al., 2013). Por otro lado, las infecciones por *Streptococcus agalactiae* en adultos no gestantes sin enfermedades base, de igual manera han incrementado durante los últimos años (Huber, McOdimba, Pflueger, Daubenberger, & Revathi, 2011), mayormente en infecciones de tracto urinario, con bacteriurias asintomáticas, cistitis, pielonefritis, uretritis, entre otros (Ulett et al., 2010).

La detección de *Streptococcus agalactiae* se basa: en su cultivo (Berg et al., 2013), pruebas bioquímicas y la tipificación mediante antisueros (Fiolo et al., 2012; Kong, Gowan, Martin, James, & Gilbert, 2002).

Así mismo, se ha descrito que *Streptococcus agalactiae* presenta una sensibilidad del 100% a la Penicilina G, siendo este el más utilizado como tratamiento profiláctico en mujeres embarazadas (Díaz Álvarez, Claver Isás, & Pérez Amarillo, 2008). Sin embargo, la alergia a este antibiótico es una problemática que se soluciona con el uso de lincosamidas y macrólidos. Pero se evidencia un aumento significativo de la resistencia estos antibióticos (Emaneini et al., 2014).

Streptococcus agalactiae es capaz de evadir ciertas barreras inmunológicas como prevenir su fagocitosis por las células del huésped. Aparte, puede unirse al fibrinógeno para

así penetrar a las células epiteliales, propagarse e invadir el torrente sanguíneo para su diseminación hacia otros órganos (Nitschke, Slickers, Müller, Ehricht, & Monecke, 2014). Todos estos mecanismos son codificados por ciertos genes de virulencia (*fbsA*, *fbsB*, *cylB*, entre otros) que, se ha demostrado están presentes en el 100% de las cepas estudiadas (Laczeski, Novosak, Quiroga, & Vergara, 2014). Cabe recalcar que varios estudios demuestran la relación entre el serotipo de esta bacteria y la virulencia, así como la resistencia a ciertos antimicrobianos (Gosiewski, Brzychczy-Wloch, & Heczko, 2012).

Streptococcus agalactiae es una bacteria de distribución cosmopolita. Sin embargo, la incidencia o porcentaje de colonización va a variar según la zona geográfica dependiendo de las condiciones ambientales y socioeconómicas, por ejemplo, en naciones que son grandes potencias mundiales ese porcentaje está entre el 5%-35%, mientras que en naciones que se encuentran en vías de desarrollo este porcentaje es del 4%-20% (Instituto de Salud Pública de Chile, 2012). Dentro de la región (Latinoamérica) se tiene datos de prevalencia del *Streptococcus agalactiae* en pacientes embarazadas. En Colombia se mostró en un estudio la prevalencia del 0,38% (García et al., 2011), en Argentina el porcentaje está entre el 5% al 18% (Di Bartolomeo, Gentile, Priore, Valle, & Di Bella, 2005), en México y Perú se demuestran porcentajes del 13% y del 6,6% respectivamente (Tenorio & Viteri, 2009).

En Ecuador se encuentran porcentajes de prevalencia que varían según el lugar de investigación, en la ciudad de Ibarra en un estudio se demostró una prevalencia del 13,15% (Gómez Ortiz & Ramírez Bazante, 2013), mientras que en otra publicación de la ciudad de Cuenca se determinó una prevalencia del 11,36% (Tenorio & Viteri, 2009). Por otro lado, en la ciudad de Guayaquil se presentó una prevalencia del 9,9% (Aguilar, 2015). Cabe recalcar que en la ciudad de Quito, se evidenció una prevalencia del 10% en un estudio y en otro una

del 3,3% denotando la gran variación en la distribución de la prevalencia de este patógeno (Cantuña, 2012).

La importancia de realizar este estudio radica en aportar datos de la caracterización de las cepas existentes de *Streptococcus agalactiae* durante el tiempo del estudio. Dentro de esto se encuentra la relación entre las pruebas fenotípicas realizadas con los genes de identificación seleccionados para este estudio. Además, determinar los perfiles de susceptibilidad a los antibióticos que presentan las cepas encontradas no solo de forma tradicional (antibiograma) sino que conjuntamente se determinarán los genes presentes para la resistencia de macrólidos y lincosamidas.

Por lo mencionado anteriormente, el presente estudio responde a la siguiente pregunta de investigación. ¿Cuál es el fenotipo y el gen causante de la resistencia a macrólidos y lincosamidas encontrado en las cepas de *Streptococcus agalactiae* remitidas al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Quito desde octubre del 2007 a marzo del 2016?

1.1. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones debidas a *Streptococcus agalactiae* constituyen un problema de salud pública en el mundo entero (Viracachá, Barajas, & Báez, 2011), por su patogenia ha sido responsable de graves complicaciones de salud como sepsis, neumonía y meningitis tanto en neonatos, así como pacientes inmunocomprometidos e incluso en pacientes adultos no gestantes sin enfermedades base (Stoll et al., 2011). Además de las mencionadas complicaciones a este patógeno también se lo atribuye ser el causante de infecciones de vías urinarias, corioamnionitis, endometritis pre y postparto, infecciones de heridas en mujeres sometidas a cesáreas; a su vez, osteomielitis, bacteriemias, endocarditis e infecciones cutáneas y de tejidos blandos (García et al., 2011).

Cabe mencionar que aunque la importancia de la bacteria de estudio se establece primordialmente en neonatos y mujeres embarazadas, existen varios casos de pacientes adultos no gestantes con enfermedades asociadas a *Streptococcus agalactiae* que en su mayoría corresponden a infecciones de tracto urinario con infecciones asintomáticas (Ulett et al., 2010). En casos más graves, *Streptococcus agalactiae* causa infecciones invasivas, y algo que llama la atención es que en el estudio de Farley en el año 2011 muestra que dos terceras partes de las infecciones invasivas causadas por la bacteria antes mencionada, ocurridas en Estados Unidos, corresponden a casos de adultos no relacionados con el embarazo (Farley, 2001).

Es así que la letalidad de esta bacteria varía según el lugar de estudio, la población estudiada así como el sitio de infección (Díaz Álvarez et al., 2008), mostrando porcentajes de letalidad que van desde el 5 al 70% (Cruz, Doren, Tapia, & Abarzúa, 2008).

En Ecuador, se encuentran algunos trabajos científicos publicados de varios autores con respecto al *Streptococcus agalactiae*, que ha sido estudiado, en su mayoría, en mujeres embarazadas pues las infecciones bacterianas son los principales causantes de la morbilidad y mortalidad en neonatos, teniendo una prevalencia del *Streptococcus agalactiae* que bordea un 11% (Tenorio & Viteri, 2009) al 13% variando el lugar de estudio (Gómez Ortiz & Ramírez Bazante, 2013); en Ecuador, la neumonía y sepsis neonatal constituyen tercera y séptima de las causas principales de muerte neonatal respectivamente (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2013). Aunque la sepsis neonatal haya disminuido su incidencia al administrar tratamientos profilácticos (penicilina G, clindamicina, eritromicina) a las mujeres embarazadas, se observa claramente que continúa siendo una de las causas más comunes de mortalidad en recién nacidos (Gosiewski et al., 2012).

Dentro de la identificación fenotípica que se realiza por laboratorios de microbiología, usualmente se cultiva en agar base sangre de cordero para identificar la presencia de colonias beta hemolíticas, luego la realización de la coloración Gram que al ser cocos Gram positivos, se procede a la realización de la prueba de catalasa la cual, al ser negativa, se procede a la realización del test de CAMP (descrito en el acápite 2.2.6.5) para así llegar al reporte de estreptococo del grupo B (Berg et al., 2013). La producción de la Beta hemólisis se puede ver afectada por el tipo de sangre que se haya usado para realizar el medio de cultivo ya que en el agar sangre de cordero se han visto mejores resultados que en agar sangre humana (Aguinaga & Chiclayo, 2006). Por otro lado, el test de CAMP realizado en agar sangre humana refiere un alto índice de resultados negativos (40%), esto representa un problema en la identificación de *Streptococcus agalactiae* en muchos laboratorios (Regali, Pegels, Oviedo, Quiroga, & Vergara, 2010).

En la actualidad el *Streptococcus agalactiae* presenta una sensibilidad del 100% a la Penicilina G, pero en personas alérgicas se debe aplicar una antibioticoterapia distinta (Abarzúa et al., 2011); por lo que la resistencia a los distintos antimicrobianos es considerada como un grave problema de salud pública.

Según la Organización Mundial de la Salud (Organización Mundial de Salud, 2015), la resistencia en el *Streptococcus agalactiae* a macrólidos, lincosamidas y estreptogramidas B (MLS_B) es mediada por los genes de la familia *erm* (*A*, *B*, *C*, *TR*, etc.). La resistencia específica a macrólidos es codificada por la familia de los genes *mef* (*A*, *B*) (Laczeski et al., 2014) y la resistencia a lincosamidas está dada por los genes de la familia *lnu* (*A*, *B*) (Faccone et al., 2010), complicando el panorama de elección de antimicrobianos presionando a usar vancomicina (Centers for Disease Control and Prevention, 2010; Gosiewski et al., 2012).

Por todo lo mencionado, se demuestra que la bacteria *Streptococcus agalactiae* implica una gravedad alta en pacientes inmunocomprometidos como en neonatos e incluso en adultos no gestantes. Por lo que la aplicación de una técnica molecular para la identificación temprana de este patógeno es crucial para los pacientes de riesgo, así como las mujeres en el tercer trimestre de embarazo (para evitar la transmisión vertical), además de la identificación adecuada de los perfiles de resistencia y genes asociados; para que de esta manera se evite la terapia antibiótica errónea o empírica lo que llevaría a obtener más resistencias bacterianas y fracaso terapéutico.

Las cepas de *Streptococcus agalactiae* utilizadas en este estudio, los datos de las mismas, así como la infraestructura y equipos fueron proporcionados gentilmente por el Centro Nacional de Resistencias a los Antimicrobianos del Instituto Nacional de

Investigación en Salud Pública INSPI “Leopoldo Izquieta Pérez” de la ciudad de Quito para la realización de esta tesis.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. General

Caracterizar las cepas de *Streptococcus agalactiae* remitidas al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Quito de octubre 2007 a marzo 2016

1.2.2. Específicos

- Identificar por técnicas moleculares y fenotípicas las cepas de *Streptococcus agalactiae* remitidas al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Quito de octubre 2007 a marzo 2016
- Identificar el perfil de susceptibilidad frente a penicilina, cefotaxima, eritromicina, clindamicina ciprofloxacina, levofloxacina, por difusión de discos, en las cepas de *Streptococcus agalactiae* remitidas al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Quito de octubre 2007 a marzo 2016
- Determinar la presencia de genes de resistencia *ermB*, *ermA*, *lnub* en las cepas de *Streptococcus agalactiae* remitidas al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Quito de octubre 2007 a marzo 2016
- Relacionar el perfil de resistencia fenotípico con el perfil de resistencia genotípico de las cepas de *Streptococcus agalactiae* remitidas al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Quito de octubre 2007 a marzo 2016.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

La Organización Mundial de la Salud (2015), determina a la bacteria *Streptococcus agalactiae* como un factor de riesgo capaz de aumentar las infecciones maternas en la época de parto por lo general unas semanas antes del alumbramiento (periparto) (Organización Mundial de la Salud, 2015).

D. García (2011), en su estudio determina que la infección de *Streptococcus agalactiae* en recién nacidos se produce durante el parto, dado al contacto con el tracto genital materno colonizado o el útero materno que se encuentre colonizado (transmisión vertical), teniendo una tasa de transmisión del 50%. Por otra parte, indica que la prevalencia de esta bacteria fluctúa según el lugar y el ambiente (García et al., 2011).

Según F. Dickinson (2013), el *Streptococcus agalactiae* o estreptococo beta hemolítico del grupo B (EGB) es el primer agente causal de sepsis en el recién nacido; causando en etapas tempranas bacteriemia o neumonía y en etapas tardías meningitis que suele ser frecuente, y que a menudo es ocasionada por el serotipo III (Dickinson Meneses & Ortega Rodríguez, 2013).

Según el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) (2016), la incidencia en Estados Unidos de infecciones graves por el patógeno *Streptococcus agalactiae* es de 26500 casos por año. Además, determina que las secuelas de padecer infecciones por

Streptococcus agalactiae, sobre todo en neonatos, son la pérdida de visión o audición, así como parálisis cerebral y, determina que existe un porcentaje del 5% de mortalidad entre infantes y adultos debido a infecciones graves por esta bacteria (Centers for Disease Control and Prevention, 2016).

El autor G. Ulett, (2010) determina que *Streptococcus agalactiae* puede ser el causante de enfermedades del tracto urinario en pacientes adultos no gestantes. Estas afecciones urinarias pueden estar acompañadas de bacteriurias asintomáticas, cistitis y uretritis. A su vez, se pueden presentar complicaciones más delicadas como pielonefritis y urosepsis (Ulett et al., 2010).

Por otro lado, la autora C. Huber (2011) en su estudio muestra que a pesar de la alta relación que se ha dado al *Streptococcus agalactiae* como patógeno en neonatos y mujeres embarazadas, los casos de afecciones a adultos no gestantes se han incrementado. Además, denota que las infecciones más recurrentes en estos pacientes son infecciones de tracto urinario seguido de complicaciones graves como bacteriemias, infecciones de piel y tejidos blandos así como neumonía, meningitis y osteomielitis (Huber et al., 2011).

M. Martínez (2004) menciona que el *Streptococcus agalactiae* es susceptible a penicilina y a antibióticos de la familia de los betalactámicos, pero en la actualidad ha aumentado los casos en los que se reporta la de resistencia a eritromicina y clindamicina, que son de uso alternativo en la antibiótico profilaxis intraparto de pacientes alérgicas a penicilina (Martínez T et al., 2004).

M. Arana (2014) describe los principales mecanismos de resistencia a antibióticos por parte del *Streptococcus agalactiae* y las principales familias de genes implicadas

causantes de: inactivación del antibiótico mediante enzimas (*lnu*), modificación del sitio diana (*erm*) y bombas de expulsión (*mef*); confiriendo a este microorganismo resistencia a lincosamidas y macrólidos (Arana, Rojo-Bezares, Torres, & Alós, 2014).

En Ecuador, la guía de componente normativo materno (2008) determina que se debe “realizar un cultivo ano-genital en la semana 35-37 de gestación de screening de infección por estreptococo agalactiae B y prevención de sepsis neonatal. Si el resultado es positivo administrar: Ampicilina 2g. IV (intravenosa) dosis inicial y luego 1g. cada 6 horas hasta el parto” (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2008, p. 31).

2.2. *Streptococcus agalactiae*

2.2.1. Taxonomía

En las últimas décadas los avances en la biología molecular han contribuido en la clasificación de la bacterias, creando nuevos géneros y reclasificándolos (Murray et al., 2007); actualmente el *Streptococcus agalactiae* pertenece al reino de la bacterias *Phylum firmicutes*, clase *bacilli*, al orden de los *lactobacillales*, familia *Streptococcaceae* al género de los *Streptococcus* especie *agalactiae* (Swedish University of Agricultural Sciences, 2015).

2.2.2. Características del microorganismo

2.2.2.1. Características generales.

Streptococcus agalactiae es un coco Gram positivo en cadenas (también conocido como estreptococo del grupo B) que se suele encontrar como colonizador del tracto

genitourinario y gastrointestinal tanto en personas sanas, pacientes inmunodeprimidos y en las mujeres embarazadas (Viracachá et al., 2011).

2.2.2.2. *Características microbiológicas*

El *Streptococcus agalactiae* un coco Gram positivo que presenta el antígeno B por lo que se lo considera perteneciente al grupo B de Lancefield, usualmente se lo encuentra dispuesto en cadenas cortas en muestras de origen clínico o cadenas largas en colonias de cultivo (Murray et al., 2014). Presentan colonias β -hemolíticas de 1-2 mm de diámetro de aspecto cremoso (Brooks, Carroll, Butel, Morse, & Mietzner, 2014; Murray et al., 2014). Esta bacteria es capaz de hidrolizar al hipurato de sodio y dar un resultado positivo en la prueba de CAMP, presenta resultados negativos en la prueba de sensibilidad a la bacitracina, da un resultado negativo en las pruebas de PYR (L-pyrroglutamil-aminopeptidasa) y VP (vogues-proskauer), al igual que da un resultado variable en la fermentación la trehalosa y es incapaz de fermentar el sorbitol (Brooks et al., 2014; Murray et al., 2007).

2.2.2.3. *Hábitat.*

Streptococcus agalactiae es un microorganismo comensal perteneciente a la microbiota del tracto gastrointestinal que suele colonizar el tracto genital (Centers for Disease Control and Prevention, 2010), siendo un problema en pacientes inmunocomprometidos ya que también puede infectar otras zonas del cuerpo actuando como un patógeno (Di Bartolomeo et al., 2005).

2.2.2.4. Factores de virulencia

Streptococcus agalactiae es capaz de evadir ciertas barreras inmunológicas como prevenir su fagocitosis por las células del huésped. Así mismo puede invadir a las células epiteliales, y de esta manera, propagarse hacia el torrente sanguíneo (Nitschke et al., 2014). Todo esto es posible gracias a sus características como son su polisacárido capsular, aparte de adhesinas de unión a la fibronectina, así como hemolisinas y su factor CAMP; de igual manera presenta varias proteasas (García et al., 2011). Todos estos mecanismos son codificados por ciertos genes de virulencia (*fbsA*, *fbsB*, *cylB*, *cfb* entre otros) que, se ha demostrado están presentes en el 100% de las cepas estudiadas (Laczeski et al., 2014).

Como se mencionó, un factor importante de virulencia en *Streptococcus agalactiae* es la cápsula, la cual está dotada de polisacáridos específicos que permite la identificación de distintos serotipos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX) para esta bacteria (Castro, Silva et al., 2013). Cada serotipo tiene la capacidad de actuar de forma diferente con el medio que la rodee teniendo la habilidad de presentar resistencias naturales a antibióticos; un buen ejemplo es el serotipo V de esta bacteria que tiene una resistencia natural a macrólidos, además que estos varían según el área geográfica, tiempo y clima (Laczeski et al., 2014). Cabe recalcar que varios estudios demuestran la relación entre el serotipo de esta bacteria y la virulencia, así como la resistencia a ciertos antimicrobianos (Gosiewski et al., 2012).

Es claro que el principal factor de virulencia del *Streptococcus agalactiae* es su cápsula de polisacáridos (CPS) por permitirle la evasión del sistema inmunitario, evadiendo la fagocitosis (Nuccitelli, Rinaudo, & Maione, 2015).

Y, así como se mencionó anteriormente, existen otros genes de virulencia que codifican proteínas necesarias para la interacción huésped-bacteria (Laczeski et al., 2014). Dentro de estos tenemos al gen *bca* que codifica la proteína α -C que ayuda la adherencia de la bacteria a las células epiteliales (Oviedo, Pegels, Laczeski, Quiroga, & Vergara, 2013). Mientras que el gen *bac* codifica la proteína β -C que se asocia a la invasión de células epiteliales así como la resistencia a la fagocitosis (Laczeski et al., 2014). El gen *bibA* codifica una adhesina inmunogénica bacterial (Godoy et al., 2013).

Ya se ha mencionado al gen *cfb* el cual codifica para el factor CAMP (García et al., 2011). Por otro lado existe el gen *cylE* que codifica para la β -hemolisina/citolisina (Godoy et al., 2013). La enzima hialuronato-liasa es codificada por el gen *hylB*, la cual ayuda a la unión del *Streptococcus agalactiae* a las cadenas de hialuronato para así facilitar su diseminación (Godoy et al., 2013; Oviedo et al., 2013).

Existen además, los genes *gbs2018-6* e *iagA* los cuales se asocian a la adhesión e invasión celular respectivamente (Godoy et al., 2013). La unión a la laminina humana se da por la proteína Lmb que es codificada por el gen *lmb* (Laczeski et al., 2014).

La enzima C5a peptidase que ayuda a la evasión de la respuesta inmunológica es codificada por el gen *scpB* (Godoy et al., 2013). Por otro lado, existen las proteínas ligadoras al fibrinógeno de tipo A y B las cuales se asocian a la adhesión celular y son codificadas por los genes *fbsA* y *fbsB* respectivamente (Godoy et al., 2013; Laczeski et al., 2014).

Además de todos los factores de virulencia mencionados, el estreptococo del grupo B posee además nucleasas (GBS_NucA) capaces de degradar al ADN del componente de la matriz de los neutrófilos (Moon, Gaudu, & Pedersen, 2014).

2.2.3. Epidemiología

Al ser el *Streptococcus agalactiae* un colonizador del aparato digestivo inferior y colonizador accidental del aparato genitourinario; cerca del 10% al 40% de las embarazadas suele presentar colonizaciones o infecciones a nivel vaginal (Alfa et al., 2010), la prevalencia de esta bacteria varía según localización geográfica, clima, condiciones de salud, acceso a servicios de salud, etc. (Laczeski et al., 2014).

Alrededor del 60% de neonatos provenientes de madres colonizadas con el *Streptococcus agalactiae* se colonizan durante el parto aumentado el riesgo de infección si la madre presenta un recuento elevado de bacterias (Murray et al., 2014), otros factores que incrementan el riesgo de colonización de este patógeno hacia el neonato son: si la madre es menor de 20 años (Di Bartolomeo et al., 2005) que el parto sea prematuro es decir que se dé antes de las 37 semanas de gestación, la presencia de fiebre al momento del alumbramiento y en mujeres multíparas el antecedente de hijos que presentaron colonización del *Streptococcus agalactiae* (Viracachá et al., 2011).

Se han identificado los serotipos del *Streptococcus agalactiae*, determinando la existencia de diez serotipos Ia, Ib, II-IX, siendo este último recientemente descubierto. Así mismo, la identificación de los serotipos más frecuentes de esta bacteria se ha realizado en varios países en el mundo, dando como resultado que los serotipos Ia, II, III y V son los más frecuentes (Gosiewski et al., 2012).

En Latinoamérica de igual manera, existen algunos datos sobre la prevalencia de los diferentes serotipos, arrojando que los serotipos más encontrados han sido III y V (Laczeski et al., 2014). El *Streptococcus agalactiae* presenta diferentes serotipos que se asocian con

mayor frecuencia a la enfermedad del recién nacido siendo los más comunes los serotipos: Ia, Ib, II, III y V (Murray et al., 2014).

El tratamiento profiláctico con antibioticoterapia intraparto con penicilina y ampicilina y en pacientes alérgicos la utilización de eritromicina o clindamicina (Abarzúa et al., 2011) ha reducido la colonización neonatal por contaminación al momento de pasar por el canal de parto, reduciendo de 8.000 infecciones en el año 1993 a 1.800 en 2002 (Murray et al., 2014).

2.2.4. Transmisión y factores de riesgo

El *Streptococcus agalactiae* es parte de la microbiota del tracto gastrointestinal. También suele colonizar el tracto genital causando infecciones de vías urinarias que en su mayoría son asintomáticas (Oyanguren et al., 2015). La colonización del *Streptococcus agalactiae* en el recién nacido se da al momento del parto cuando el neonato tiene contacto con el tracto genital materno. Otras causas que intervienen para la colonización del neonato son la ruptura de membranas, presencia de fiebre intraparto, que el alumbramiento se dé antes de las 37 semanas de gestación (parto prematuro) y al presencia bacteriurias en durante el periodo de gestación (Viracachá et al., 2011).

Además de la inminente relación entre *Streptococcus agalactiae* y las enfermedades en los neonatos por transmisión vertical o las causas antes descritas, esta bacteria también es capaz de provocar infecciones en pacientes inmunocomprometidos o con enfermedades crónicas como pacientes diabéticos, obesos, con enfermedades cardíacas, pacientes con VIH, o incluso la edad avanzada (Centers for Disease Control and Prevention, 2016). Las infecciones por esta bacteria a personas adultas no embarazadas ha ido en aumento, con

manifestaciones clínicas como bacteriemia, infecciones de piel o tejidos blandos, e incluso afecciones respiratorias o genitourinarias (Brooks et al., 2014).

2.2.5. Patogénesis

Debido a la presencia de antígenos de superficie y la capacidad de evadir la fagocitosis gracias a su polisacárido capsular, la presencia de hemolisinas y su factor CAMP junto con varias proteasas (García et al., 2011), este patógeno causa daño al unirse al fibrinógeno de las células epiteliales mediado por adhesinas de unión a la fibronectina para así invadir y propagarse hacia el torrente sanguíneo para su posterior diseminación hacia otros órganos y tejidos (Nitschke et al., 2014).

2.2.6. Diagnóstico del microorganismo

2.2.6.1. Tinción GRAM

Hans Christian Gram en 1884 desarrolla una tinción que permite diferenciar a las bacterias por la coloración que adquiere la pared bacteriana en Gram positivas si adquieren el colorante primario y Gram negativas si adquieren el colorante secundario (Jiménez Tobón & Vélez Hoyos, 2015).

El cristal violeta (colorante primario) atraviesa la pared bacteriana tiñéndose de color púrpura, el lugol (mordiente) ayuda a que se fije el colorante primario a la pared bacteriana creando un complejo que es insoluble al agua, pero no al alcohol-acetona (decolorante) el cual no decolora a las bacterias gram positivas, pero sí a las gram negativas por lo que se utiliza safranina (colorante secundario) para poder visualizar las bacterias decoloradas (Bartholomew & Mittwer, 1952).

2.2.6.2. *Prueba de Catalasa*

Esta prueba es frecuentemente usada para diferenciar a los cocos Gram positivos en estafilococos, estreptococos o enterococos. Se basa en la búsqueda de la enzima catalasa la cual al estar en presencia del peróxido de hidrógeno (al 3% en esta técnica) es capaz de desdoblarlo en agua y oxígeno gaseoso (Murray et al., 2007, 2014). Los estreptococos no poseen la enzima catalasa (resultado negativo) por lo que se distinguen de los estafilococos los cuales dan un resultado positivo en esta prueba.

2.2.6.3. *Presencia de hemólisis*

Muchos microorganismos tienen la capacidad de destruir (hemolizar la sangre) gracias a una enzima llamada hemolisina que destruye los glóbulos rojos en el agar base sangre (Aguinaga & Chiclayo, 2006), lo que permite clasificar a las bacterias según el tipo de hemólisis (Murray et al., 2014):

- Alfa hemólisis (α): es una hemólisis incompleta que en agar sangre se observa un halo de hemólisis de color verde (Fernández Olmos, García de la Fuente, Saéz Nieto, & Valdezate Ramos, 2010).
- Beta hemólisis (β): es una hemólisis completa que en agar sangre se observa un halo de hemólisis de color blanco (Regali et al., 2010).
- Gamma hemólisis (γ): la falta de hemólisis (Murray et al., 2014)

Cabe mencionar que es de gran importancia la incubación de las cajas Petri con agar sangre en un ambiente microaerofílico puesto que la presencia de oxígeno podría inhibir a la hemolisina y opacar esta reacción (Murray et al., 2007).

2.2.6.4. *Inmunoensayo de Lancefield*

Rebecca Lancefield (1895-1981) fue la investigadora responsable de clasificar al género de los *Streptococcus* por su serología. En un inicio clasificó a estas bacterias por su grupo específico de polisacárido, seguido, los clasificó acorde a la proteína M presente en la pared celular (D. Stevens & Kaplan, 2009). Así fue como se conformaron los grupos A, B, C, D, E, F, G, R de Lancefield y en serotipos no tipificables (Murray et al., 2014; D. Stevens & Kaplan, 2009).

Dentro de esta clasificación, la bacteria objeto de este estudio pertenece al grupo B de Lancefield, es por esto que se la denomina como estreptococo del grupo B (Brooks et al., 2014; Murray et al., 2014; Viracachá et al., 2011).

2.2.6.5. *Prueba de CAMP*

Esta prueba fue descrita por primera vez por los científicos Christie, Atkins y Munch-Petersen en el año de 1944 (Murray et al., 2007). Esta prueba se refiere a la sinergia que existe entre la proteína CFB del *Streptococcus agalactiae* (en agar sangre de cordero) con la beta lisina estafilocócica (Murray et al., 2007).

En forma más detallada, el *Staphylococcus aureus* el cual puede ser una cepa de tipo ATCC (ATCC 25923 utilizada en este estudio) libera una esfingomielinasa que hidroliza la esfingomielina del eritrocito que en conjunto con la liberación de factor CAMP presente en

Streptococcus agalactiae aumenta el área de hemólisis cuando éste crece cerca del *Staphylococcus aureus*. Este tipo de interacción entre estas bacterias se observa como una de β -hemólisis en forma de “punta de flecha” (Regali et al., 2010). Figura 7 . El procedimiento se realiza como se menciona en el Anexo 1.

Casi la totalidad de las cepas de *Streptococcus agalactiae* (>98%) tienen la expresión del gen (*cfb*) que codifica el factor de CAMP; sin embargo, existen cepas mutantes que dan un resultado negativo para esta prueba (Murray et al., 2007; Nakamura et al., 2011).

Existen otros métodos distintos al tradicional antes mencionado. Estos métodos pueden ser discos que contengan beta-lisina o un método de detección rápida del factor CAMP (Murray et al., 2007).

Es menester tener un algoritmo de identificación adecuado para este tipo de bacterias puesto que, si bien la prueba del factor CAMP se la suele relacionar directamente con el *Streptococcus agalactiae*, existen otras bacterias como los bacilos Gram positivos del género *Corynebacterium* y *Listeria monocytogenes* que podrían presentar un resultado positivo en esta prueba (Murray et al., 2007).

2.2.6.6. *Hidrólisis de hipurato de sodio*

Esta prueba es una alternativa en la identificación del *Streptococcus agalactiae*. Se basa en la búsqueda de la hidrólisis del hipurato de sodio en ácido benzoico y glicina mediada por la enzima hipuricasa (Fernández Olmos et al., 2010), esta enzima se encuentra presente en el *Streptococcus agalactiae* (Murray et al., 2014). Esta prueba se la puede realizar de manera rápida incubando una suspensión turbia de colonias en 0.4ml de hipurato de sodio

líquido de concentración al 1% durante 2 horas a una temperatura de 35°C. La formación de glicina se detecta por la adición de 5 gotas de ninhidrina, se reincuba por 10 minutos. Si se observa la formación de un color púrpura oscuro es un resultado positivo (Murray et al., 2007).

2.2.6.7. *Bacitracina*

Este test consiste en la determinación de la sensibilidad o resistencia hacia la bacitracina de baja carga (0.04U) que es un antimicrobiano polipéptido el cual es obtenido de una cepa de *Bacillus subtilis* (cepa Tracy) (Brooks et al., 2014). La bacteria de estudio, *Streptococcus agalactiae*, presenta resistencia hacia este antibiótico (De la rosa & De Cueto Lopez, n.d.; Murray et al., 2007). Figura 8.

2.2.6.8. *Medios cromogénicos*

El desarrollo de nuevos métodos de detección de *Streptococcus agalactiae* ha ido avanzando por la necesidad de detectar esta bacteria a tiempo (Poisson, Evrard, Freneaux, Vivés, & Mesnard, 2011). Sobre todo en muestras de hisopados vaginales o rectales, la búsqueda del *Streptococcus agalactiae* puede presentar varias complicaciones como son el sobre crecimiento de flora normal que opaque al *Streptococcus agalactiae* (por presentar colonias pequeñas) o bien por la dificultad de crecimiento por los requerimientos nutricionales que esta bacteria presenta (Tibbs & Creighton, 2013).

Debido a esto, varias casas comerciales han incorporado a sus catálogos, medios de tipo cromogénicos para la detección fácil y rápida de *Streptococcus agalactiae*. Dentro de ellos se encuentran:

- CHROMagar™ StrepB: fabricado por CHROMagar™. Es un medio selectivo que inhibe el crecimiento de algunas bacterias y levaduras, muestra las colonias de *Streptococcus agalactiae* de color malva y de bacterias como *Enterococcus* de color azul (CHROMagar, 2015). Figura 9 (A).
- Granada Agar: Fabricado por BioMérieux y creado por Manuel de la Rosa. Es un medio que inhibe el crecimiento de levaduras y otras bacterias y, que tiñe a las colonias de *Streptococcus agalactiae* de color rojo-anaranjado, mientras que otras bacterias no inhibidas son incoloras (BioMérieux, 2016a). Figura 9(B).
- chromID™ Strepto B: este medio es fabricado por BioMérieux. Inhibe el crecimiento de varias bacterias, así como de levaduras. Las colonias de *Streptococcus agalactiae* se las distingue por presentar un color rosa pálido-rojo, mientras que especies de enterococos se los puede ver de color celeste o casi incoloras (BioMérieux, 2016b).
Figura 9(C)
- StrepBSelect™ Agar: medio fabricado por Bio-Rad. Es un medio selectivo que presenta a las colonias de *Streptococcus agalactiae* pigmentadas de color azul en diferentes tonalidades, mientras que las especies de enterococos en color púrpura y los lactobacilos en color rosa (Bio-Rad, 2012). Figura 9 (D).

2.2.6.9. *Detección de antígenos en muestras biológicas*

Las técnicas tradicionales para la detección del *Streptococcus agalactiae* tienen un tiempo de respuesta elevado (días o semanas) por lo que es fundamental la determinación rápida (minutos u horas) de este microorganismo, especialmente para grupos de riesgo en los que se sospeche la infección o colonización (Lara, García, & Barreales, 2013).

En la actualidad se han creado pruebas rápidas para la detección directa de este patógeno, usando directamente la muestra sin necesidad del aislamiento bacteriano. Estas técnicas varían de metodología según la casa comercial o el tipo de muestra a ser usada. Unas se basan en anticuerpos monoclonales específicos que están pegados a moléculas de látex que se unen al exoantígeno bacteriano permitiendo ver la interacción antígeno-anticuerpo a modo de aglutinación (Becton Dickinson and Company, 2010). También existen pruebas moleculares para la detección de este microorganismo basándose en una PCR para la amplificación de genes específicos entre ellos gen *cfb* del *Streptococcus agalactiae* siendo esta una técnica de alta sensibilidad y especificidad (BD Diagnostics, 2014).

2.2.6.10. *Serotipificación de tipos capsulares*

En la actualidad se conocen diez de serotipos de *Streptococcus agalactiae* (Ia ,Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX) los cuales son identificados por la estructura capsular (Castro, Silva et al., 2013; Dutra et al., 2014). Para ello se han creado diferentes técnicas como: aglutinación con partículas de látex, coaglutinación, inmunoprecipitación, contraelectroforesis, también existen las técnicas moleculares que tienen una alta sensibilidad y especificidad analizando al operón *cps* del *Streptococcus agalactiae* (Liébana-Martos et al., 2015).

2.2.7. Pruebas fenotípicas de la resistencia a antibióticos

2.2.7.1. Antibiograma

Es una técnica utilizada para determinación *in vitro* de la sensibilidad de una bacteria frente a varios antibióticos (Cercenado, 2009), así como la búsqueda de mecanismos de resistencias (Cantón, 2010). El medio de cultivo recomendado por el Clinical Laboratory Standars Institute (CLSI) es el Mueller-Hinton, al cual se le puede añadir sangre al 5% u otros suplementos para microorganismos de difícil desarrollo (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012).

2.2.7.2. Técnica de difusión de discos

Para la utilización de esta técnica se usa discos de papel de 6mm de diámetro que son impregnados con una concentración conocida del antibiótico a ser analizado, estos se colocarán en el agar Mueller-Hinton cuya superficie ha sido previamente inoculado con una solución bacteriana y se incuba de 16-20 horas (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012), tras el periodo de incubación el diámetro del halo de inhibición bacteriana está relacionado con la sensibilidad del microorganismo (Cercenado, 2009), el cual se lo puede categorizar en sensible, intermedio, resistente mediante puntos de corte establecidos por instituciones internacionales como CLSI, EUCAST, etc. (Turnidge & Paterson, 2007).

2.2.7.3. Concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la técnica que se basa en la concentración mínima de un antimicrobiano necesario para inhibir el crecimiento bacteriano. En la actualidad existen varias formas de realización de esta técnica; entre ellas de forma

manual como la E-test® el cual se lo realiza con el procedimiento de la técnica de difusión de discos en medio Mueller-Hinton (Turnidge & Paterson, 2007)

Así mismo, se puede realizar la concentración mínima inhibitoria de un antibiótico de en equipos automatizados entre ellos el Vitek 2® mediante una tarjeta de 64 pocillos que contiene diluciones seriadas dobladas de los antibióticos a ser probados (Food and Drug Administration, 2011).

2.2.7.4. Resistencia a antibióticos

El *Streptococcus agalactiae* es sensible a penicilina siendo este el antibiótico de primera línea y de mayor uso clínico en pacientes no alérgicos a estos (Villar & Jugo, 2013b), mientras que el uso de eritromicina o clindamicina (antibióticos de segunda línea) han sido recomendados para tratamientos en pacientes alérgicos a betalactámicos (Abarzúa et al., 2011). Con el pasar de los años el uso de este tipo de antibiótico-terapia y/o antibiótico-profilaxis ha generado el apareamiento de resistencias a eritromicina y clindamicina, y a su vez ha disminuido ligeramente la sensibilidad a betalactámicos en conjunto con la aparición de nuevos serotipos (Emaneini et al., 2014).

2.2.7.5. Resistencia específica de *Streptococcus agalactiae* hacia antibióticos

2.2.7.5.1. Resistencia a eritromicina

La resistencia a eritromicina está mediada por la presencia de una bomba de expulsión que es codificada por lo los genes de la familia de *mef* (macrolide efflux) este tipo de mecanismo evita que los antibióticos entren en la célula bacteriana y lleguen al sitio diana sin la modificación del medicamento o del sitio de acción (Dutra et al., 2014).

2.2.7.5.2. Resistencia a clindamicina

La resistencia a lincosamidas, entre ellas la clindamicina, está mediada por una familia de genes denominados *lnu*. Estos genes son capaces de codificar a una enzima *O*-nucleotidiltransferasa los cuales pueden inactivar a las lincosamidas por una adenilación en el grupo hidroxilo de la posición 3 del antibiótico (Paterson & Kim, 2009). En específico el gen *lnuB* se encuentra presente en un gran plásmido conjugativo que solo hidroliza a lincosamidas, pero no a los macrólidos presenciado una visualización fenotípica de sensibilidad a eritromicina y resistencia de clindamicina con un test en D negativo (Arana et al., 2014; Paterson & Kim, 2009).

2.2.7.5.3. Resistencia a eritromicina y clindamicina

La resistencia a los antibióticos de tipo macrólidos como lo es la eritromicina, puede ocurrir por la alteración de la subunidad 50S del ribosoma debido al gen *erm* (erythromycin ribosome methylase) por sus siglas en inglés (Brooks et al., 2014). Esta modificación del blanco altera al sitio 23S del rRNA (usualmente donde se unen los antibióticos de tipo MLS_B) y puede conferir una resistencia cruzada. La expresión de este fenotipo puede ser constitutiva (MLS_{Bc}) o bien, inducible (MLS_{Bi}) (Sadowy, Matynia, & Hryniewicz, 2010). La diferencia fenotípicamente se puede demostrar cuando es de forma constitutiva por la resistencia a todos los antibióticos del grupo MLS_B; mientras que, si es inducible, la resistencia se da solo frente a macrólidos de 14 o 15 átomos (Arana et al., 2014; Perez, Caierão, Antunes, & d'Azevedo, 2007; Steward et al., 2005).

2.2.8. Métodos moleculares

2.2.8.1. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

2.2.8.1.1. Características generales

Es una técnica de duplicación de ADN en la que se producen millones de copias de una sección o secuencia blanco en horas. Esta técnica consiste en tres pasos (Villegas, Sánchez, & Chuairé, 2009):

- **Denaturación:** consiste en separar las dos cadenas de ADN, para esto se utiliza una temperatura que rodee los 94 a 96 grados centígrados (Bolívar, Rojas, & García-Lugo, 2014).
- **Hibridación:** consiste en la unión de los primers o cebadores a las hebras de ADN que se separaron en la denaturación, para esto se utiliza una temperatura que bordee los 50 a 65 grados centígrados (Bolívar et al., 2014).
- **Elongación:** a una temperatura de 72 grados centígrados, permite la síntesis de las nuevas cadenas de ADN (Bolívar et al., 2014).

Estos tres pasos equivalen a un ciclo. La repetición de los ciclos permite que se amplifique una secuencia específica y que no se amplifique todo el ADN (Villegas et al., 2009).

La técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) al ser un método molecular ha demostrado ser una técnica de alta sensibilidad y especificidad, que requiere de menor tiempo para identificar a cualquier bacteria de manera apropiada. Además, para la presencia

de genes específicos que confieren resistencia y virulencia a la bacteria, la PCR es mucho más específica y sensible que las pruebas fenotípicas de sensibilidad (Gosiewski et al., 2012).

2.2.8.1.2. PCR específica para la detección de *Streptococcus agalactiae*

Para la identificación de *Streptococcus agalactiae* varios autores en sus publicaciones proponen la búsqueda y amplificación de los genes *cfb* (Munari et al., 2012) y *atr* (Godoy et al., 2013). El gen *cfb* es un gen que codifica el factor CAMP por lo que se muestra como un gen de virulencia y a la vez es bastante específico de la bacteria en estudio (Gosiewski et al., 2012; Ke et al., 2000). Mientras que el gen *atr* es un gen de tipo “housekeeping” que son aquellos que se mantienen constantes a pesar del cambio de condiciones celulares, por lo que su probabilidad de mutar es baja (Andre Schorner, 2014; Lorkowski & Cullen, 2006). El gen *atr* es específico de *Streptococcus agalactiae* el cual codifica para la gs0538 que es una glutamil transferasa la cual es una proteína transportadora de aminoácidos (De-Paris et al., 2011; Lorkowski & Cullen, 2006).

2.2.8.1.3. PCR para la detección de genes de resistencia de *Streptococcus agalactiae*

Dentro de la detección de genes de resistencia a antimicrobianos, se ha propuesto varios genes que codifican la resistencia a macrólidos y lincosamidas como son la familia de los genes *erm* (erythromycin ribosome methylase) por sus siglas en inglés (Perez et al., 2007; Steward et al., 2005). Dentro de la familia de los *erm* para este estudio se escogieron los genes *ermA* y *ermB*.

Para resistencias a lincosamidas existen de igual manera varios genes que confieren dicha resistencia como lo es la familia de los genes *lnu* (licosamide nucleotidyltransferase) por sus siglas en inglés, estos codifican una enzima capaz de inactivar a la clindamicina (Paterson & Kim, 2009). Dentro de esta familia de genes de resistencia se ha escogido al gen *lnuB* (antes conocido como *linB*) para este estudio (Faccone et al., 2010).

En la Tabla 1 se resumen tanto los genes de identificación, así como los genes de resistencia utilizados para este estudio con las secuencias de primers utilizados para cada uno de ellos:

Tabla 1: Genes y secuencia de Primers de *Streptococcus agalactiae* utilizados en estudio. En la tabla se detalla los genes usados, la secuencia de los primers forward y reverse para los mismos; el tamaño del gen, la temperatura de hibridación, la función y la referencia de donde se obtuvo la secuencia.

Genes estudiados para <i>Streptococcus agalactiae</i> y sus secuencias de Primers respectivas						
Gen	Primer	Secuencia (5' - 3')	Tamaño productos PCR (pb*)	Tm (°C)	Función	Referencia
<i>atr</i>	<i>atr-F</i> <i>atr-R</i>	CGATTCTCTCAGCTTTGTTA AAGAAATCTCTGTGCGGAT	779	54	Gen de tipo housekeeping específico de <i>Streptococcus agalactiae</i>	(Munari et al., 2012)
<i>cfb</i>	<i>cfb-F</i> <i>cfb-R</i>	TTTACCAGCTGTATTAGAAGTA GTCCCTGAACATTATCTTTGAT	153	54	Gen que codifica para el factor CAMP	(Gosiewski et al., 2012)
<i>ermA</i>	<i>ermA-F</i> <i>ermA-R</i>	TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA CTTCGATAGTTTATTAATATTAG	645	52	Codifica una modificación del blanco que altera al sitio 23S del rRNA	(Arana et al., 2014)
<i>ermB</i>	<i>ermB-F</i> <i>ermB-R</i>	GAAAAGTACTCAACCAATA AGTAACGGTACTTAAATTGTTTA	639	52	Codifica una modificación del blanco que altera al sitio 23S del rRNA	(Arana et al., 2014)
<i>lnuB</i>	<i>lnuB-F</i> <i>lnuB-R</i>	CCTACCTATTGTTTGTGGAA ATAACGTACTCTCCTATTC	944	54	Codifica a la enzima O-nucleotidiltransferasa que inactiva a las lincosamidas por una adenilación	(Arana et al., 2014)

*pares de bases.

2.2.8.2. *Secuenciación de ADN*

Esta técnica se basa en la búsqueda de la secuencia o el orden en que se encuentra las pares de bases (adenina, timina, citosina, guanina) de un gen, genes o fragmentos de ADN, esto se da mediante procesos químicos enzimáticos (Reza Reguero, 2014) . Fue descrita por el científico Sanger en el año de 1997 y es una técnica que se basa en la interrupción al momento de la replicación del ADN utilizando solo iniciador al cual se le agregan didesoxinucleótidos marcados los que carecen del grupo hidroxilo en el extremo 3', los fragmentos obtenidos de esta amplificación son analizados electroforéticamente. Esta es la técnica más usada no solo por su bajo costo sino también por sencillez, teniendo como limitación de la cantidad de pares de bases que puede secuenciar (Jiménez-Escrig, Gobernado, & Sánchez-Herranz, 2012).

2.3. TRATAMIENTO

Se conoce que el *Streptococcus agalactiae* se mantiene sensible a la penicilina (Abarzúa et al., 2011; Di Bartolomeo et al., 2005; Murray et al., 2007, 2014) por lo que sigue siendo el antibiótico de preferencia tanto como profilaxis (Centers for Disease Control and Prevention, 2010; Crespo-Ortiz, Castañeda-Ramirez, Recalde-Bolaños, & Vélez-Londoño, 2014) como para infecciones del neonato así como en infecciones que ponen en riesgo la vida del paciente (Villar & Jugo, 2013a).

Para profilaxis, como se mencionó antes, se determina el uso de penicilina como antibiótico principal o ampicilina (Farley, 2001). Sin embargo, cuando las pacientes son alérgicas a la penicilina se deberá utilizar otro antimicrobiano siendo la cefazolina el de elección si la paciente no presenta un historial de reacciones alérgicas severas a la penicilina

o cefalosporinas (Centers for Disease Control and Prevention, 2010). Por otro lado, si la paciente presentara el historial de urticaria, anafilaxis, estrés respiratorio, etc. al suministrarse penicilina o cefalosporinas, se deberá realizar un antibiograma para probar la sensibilidad de la cepa a eritromicina y clindamicina; si la cepa es sensible a los dos antibióticos se utilizará de preferencia, clindamicina (Abarzúa et al., 2011; Centers for Disease Control and Prevention, 2010). Pero si la cepa es resistente a los dos antimicrobianos, se necesitará aplicar terapia antibiótica con vancomicina (Centers for Disease Control and Prevention, 2010; Gosiewski et al., 2012). Este protocolo se lo ve detallado en el Anexo 6.

Las enfermedades de inicio temprano (EOS) se recomienda se las debe tratar de administrando una terapia antibiótica combinada empírica, utilizando ampicilina más gentamicina o amikacina más cefotaxima. En la sepsis de inicio tardío (LOS) la terapia empírica es igual a la de EOS, a menos que se sospeche de una infección intrahospitalaria para lo cual se debe administrar terapia combinada de meropenem/imipenem más vancomicina. Es necesario reevaluar el tratamiento es ambos casos, tanto en EOS como en LOS una vez identificada la bacteria (González et al., 2006).

En pacientes no embarazadas y con infecciones por *Streptococcus agalactiae* se debe utilizar como primera medida penicilina o ampicilina, si el paciente fuera alérgico, se considerará el uso de eritromicina o clindamicina si la cepa es sensible a ambos; pero si las cepas son resistentes, las opciones terapéuticas son vancomicina, cloranfenicol (Villar, Jugo, Estevez, & Baserni, 2014), cefalosporinas de primera y segunda generación (excluyendo al cefoxitin) así como cefalosporinas de tercera generación. Los aminoglucósidos tienen bajo efecto sobre esta bacteria por lo que se lo puede utilizar en terapia combinada sea con penicilina o ampicilina (Farley, 2001).

2.4. VACUNACIÓN

A pesar de los avances en la salud en el área de la prevención y tratamiento de infecciones por el *Streptococcus agalactiae* en el recién nacido, la infección por este microorganismo sigue siendo un tema de preocupación; por lo que la creación de una vacuna ayudaría a reducir y controlar la infecciones por este patógeno (de Quadros, 2004).

La vacuna contra el *Streptococcus agalactiae* es una de las mejores alternativas para la prevención de las enfermedades causadas por este patógeno ya que estimularían la producción de anticuerpos específicos de memoria que cruzarían la barrera hemato-placentaria confiriendo protección al neonato. En la actualidad los únicos ensayos clínicos realizados en humanos han sido con las vacunas basadas en polisacáridos específicos capsulares (Nuccitelli et al., 2015), pero con un resultado bajo del título de anticuerpos, esto se ha dado por la gran variedad de serotipos; la creación de estas vacunas ha sido de solo un serotipo por lo que se estudia la posibilidad de crear un vacuna que confiera inmunidad a la mayoría de los serotipos existentes o a los de mayor prevalencia (Murray et al 2014).

Se tiene conocimiento de la existencia de vacunas que son de uso animal, tanto de estudios para poder establecer la eficacia en humanos así como en peces para su propia protección obteniendo resultados favorables (Murray et al., 2014; Salvador, CS, & JRE, 2012).

2.5. ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN

Es claro el papel de patogenicidad que presenta la bacteria *Streptococcus agalactiae*, es por esto que la Organización Mundial de la Salud en el año de 2015 redactó un manual de

recomendaciones para la prevención y tratamiento de las infecciones maternas en el periparto dentro del cual se considera al estreptococo del grupo B (EGB) como un factor de riesgo para las infecciones perinatales. Es por esto que emitió, dentro de este manual, guías para el screening del EGB y, a su vez tratamiento profiláctico a las gestantes colonizadas (Organización Mundial de la Salud, 2015).

De la misma manera, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en el año 2010 emitió guías para la prevención de infección perinatal por EGB. Dentro de las cuales determina un cultivo de screening a las 35-37 semanas de embarazo y tratamientos profilácticos si existiese la presencia de *Streptococcus agalactiae*. Argumenta a su vez, la efectividad que tiene el tratamiento profiláctico intravenoso en las pacientes colonizadas que es del 86%-89% (Centers for Disease Control and Prevention, 2010).

En países latinoamericanos el panorama es similar, puesto que se previene con cultivos prenatales en búsqueda de *Streptococcus agalactiae*, así como antibiótico-terapia profiláctica a pacientes con factores de riesgo como haber tenido historial de hijos previos con infecciones por *Streptococcus agalactiae*, bacteriurias identificadas con el mismo patógeno durante el embarazo, parto prematuro o rotura de membranas e incluso si se presenta fiebre intraparto de al menos 38°C (Di Bartolomeo et al., 2005).

La prevención para pacientes adultos no gestantes que puedan estar en riesgo de adquirir infecciones por *Streptococcus agalactiae* va destinado sobre todo a pacientes de edad avanzada y/o diabéticos, puesto que la bacteria puede ocasionar infecciones de piel graves. Se recomienda prestar meticulosa atención y actuar oportunamente ante la presencia de heridas (Farley, 2001).

2.6. ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN EN RECIEN NACIDOS EN EL ECUADOR

En el Ecuador las medidas de prevención para el *Streptococcus agalactiae* se basan en exámenes de orina (E.M.O.) con cultivo en: el primer control gestacional (sin importar en qué semana se encuentre de gestación), además se realiza otro examen entre las 12-16 semanas y, por último, en el tercer trimestre (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2008).

Además de este tipo de exámenes, se tiene uno específico para el screening de *Streptococcus agalactiae* es la realización de un cultivo genito-rectal en las pacientes que se encuentren entre la semana 35-37 de gestación (Centers for Disease Control and Prevention, 2010; Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2008). Si la paciente presentara un cultivo positivo para *Streptococcus agalactiae*, se le deberá administrar una antibiótico-terapia de profilaxis que consistirá en la administración intravenosa de 2g. de ampicilina como dosis inicial, luego se administrará 1g. de ampicilina intravenosa cada 6 horas hasta el momento del parto (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2008).

Una medida alternativa es no realizar el cultivo y practicar la terapia antibiótica profiláctica, siempre y cuando la paciente presente un parto prematuro (menos de 37 semanas de gestación), rotura de membranas o si presenta fiebre de más de 38°C (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2008).

3. MARCO CONCEPTUAL

Adhesinas: proteínas que permiten la adhesión de las bacterias (Koneman & Allen, 2008).

Bacteriemia: presencia de bacterias en la sangre (Koneman & Allen, 2008).

Fibronectina: es la glicoproteína de adhesión que se encuentra en la matriz extracelular en casi todos los tejidos (Lucena, Arocha Piñango, & Guerrero, 2007).

Múltiparas: mujer con varios alumbramientos (Cabero & Saldivar, 2008).

Periparto: período del último mes de gestación hasta dos o tres semanas después del parto (Reece & Hobbins, 2010).

PYR: prueba que busca la detección de la enzima L-pyrroglutamyl-aminopeptidasa utilizando como sustrato al L-pirrolidonil- β -naftilamida para diferenciar especies de *Streptococcus* o *Enterococcus* (Fernández Olmos et al., 2010; Lopardo et al., 2003).

Primers: son secuencias de oligonucleótidos, fragmentos cortos de DNA de cadena sencilla capaces de detectar a los extremos del fragmento a amplificar (Pérez, 2012).

Screening: anglicismo que refiere a la palabra cribado, o búsqueda (Kirch, 2008).

Sepsis: infección generalizada del organismo causado por un germen patógeno el cual se extendió por sangre (González et al., 2006).

VP: prueba que detecta la fermentación de la glucosa a través de la vía butanodiólica (Fernández Olmos et al., 2010).

OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Objetivos	Variables	Tipo de Variables	Definición Operacional	Categoría	Indicador	Metodología, Técnica o Instrumento
Identificar por técnicas moleculares y fenotípicas las cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i>	Técnicas	Cuantitativa	Pruebas bioquímicas y microscópicas para la identificación de una bacteria.	Prueba de Hemólisis	Alfa	Presencia del tipo de halo hemolítico
					Beta	
	Gamma					
	Fenotípicas	Cuantitativa		Prueba de Camp	Positivo	Visualización de la forma de flecha del <i>Streptococcus agalactiae</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i>
					Negativo	
					Tinción de Gram	Cuantitativa
	Gram negativo					
	Coco					
	Bacilo	$= \frac{\# \text{ de cepas}}{57} \times 100$				
	Test de sensibilidad a Bacitracina	Cuantitativa		Prueba de sensibilidad	Sensible	Tamaño del halo de difusión del disco de antibiótico
Resistente			$= \frac{\# \text{ de cepas}}{57} \times 100$			

	Técnicas moleculares	Cuantitativa	Pruebas moleculares dedicadas a la identificación genética de la bacteria	Búsqueda del gen <i>atr</i>	Presencia Ausencia	PCR Convencional $= \frac{\# \text{ de cepas}}{57} \times 100$
				Búsqueda del gen <i>cfb</i>	Presencia Ausencia	PCR Convencional $= \frac{\# \text{ de cepas}}{57} \times 100$
Determinar la presencia de genes de resistencia <i>ermB</i> , <i>ermA</i> , <i>lnuB</i>	Técnicas moleculares	Cuantitativa	Pruebas moleculares dedicadas a la identificación genética de la bacteria	Búsqueda del gen <i>ermB</i>	Ausencia	$= \frac{\# \text{ de cepas}}{57} \times 100$
				Búsqueda del gen <i>ermA</i>	Presencia Ausencia	
				Búsqueda del gen <i>lnuB</i>	Presencia	
					Ausencia	
Identificar el perfil de susceptibilidad de las cepas de GBS frente a P, CTX, E, DA, CIP, LEV.	Técnica de difusión de disco	Cuantitativa	Inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco de antibiótico	Tamaño del halo de inhibición	Resistente Intermedio Sensible	Tamaño del halo de difusión del disco de antibiótico $= \frac{\# \text{ de cepas}}{57} \times 100$
Relacionar el perfil de resistencia fenotípico con el perfil de resistencia	Técnica estadística	Cuantitativa	Estadística inferencial para relación entre la resistencia fenotípica y resistencia genotípica	Frecuencia	Frecuencia relativa	Interpretación relación mediante la frecuencia relativa entre las variables $= \frac{\# \text{ de cepas}}{57} \times 100$

CAPÍTULO III

4. MARCO METODOLÓGICO

4.1. TIPO DE ESTUDIO

El presente trabajo es de tipo descriptivo transversal ya que solo se realiza el estudio de las muestras en un tiempo determinado, sin involucrar su seguimiento. Además de que los objetivos propuestos son el desarrollo de una técnica molecular para la identificación de la bacteria y sus genes de resistencia, así como la identificación de sus respectivos patrones de resistencia a antibióticos de manera fenotípica, sin que esto signifique la identificación de causas o efectos y, no pretende realizar una generalización de los comportamientos de las variables. Igualmente, este estudio se llevará a cabo desde octubre del año 2015 hasta el mes de abril del año 2016.

4.2. TIPO DE MUESTREO

En este estudio no existirá un muestreo ya que se va a trabajar con todas las cepas de *Streptococcus agalactiae* que cumplan con los criterios de inclusión propuestos y que hayan sido aisladas en el laboratorio de Resistencias a antimicrobianos del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Quito desde octubre 2007 a marzo 2016.

4.3. TAMAÑO DE MUESTRA

En el presente estudio no se requiere un tamaño de muestra ya que se va a trabajar con la cantidad total de las cepas de *Streptococcus agalactiae* que sean remitidas al laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Quito de octubre 2007 a marzo de 2016 y que cumplan con los criterios de inclusión propuestos a continuación.

4.4. DECISIÓN

Se trabajará con todas las cepas de *Streptococcus agalactiae* que cumplan con los criterios de inclusión propuestos y que hayan sido remitidas al laboratorio de Resistencias a antimicrobianos el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Quito de octubre 2007 a marzo de 2016 que cumplan con los criterios de inclusión propuestos en este estudio.

4.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Todas las cepas que sean identificadas como *Streptococcus agalactiae* o Estreptococo Beta hemolítico del grupo “B” recibidas en el INSPI.
- Todas las cepas que se encuentran en el listado y que estén preservadas correctamente en el cepario del INSPI.
- Todas las muestras que posean datos demográficos completos.

4.6. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Las cepas que no están identificadas como *Streptococcus agalactiae* o Estreptococo Beta hemolítico del grupo “B”.
- Las cepas que tengan faltantes dos o más datos demográficos.
- Las cepas que no se encuentren viables o estén contaminadas, sin la posibilidad de recuperar a la bacteria *Streptococcus agalactiae*.

4.7. PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO

4.7.1. Materiales y reactivos

4.7.1.1. Materiales

4.7.1.1.1. Cultivo, aislamiento identificación de *Streptococcus agalactiae*

- Agar base sangre Marca: BD® Lote: 4338930
- Caldo BHI (Brain Heart Infusion) Marca: BD® Lote: 4363669
- Bacitracina (Taxo “A”) 0.04U Marca: BD®
- Cepa ATCC 25927 de *Staphylococcus aureus*

4.7.1.1.2. Antibiógramas

- Discos de Eritromicina (E) 15µg Marca: Bioanalyse®
- Discos de Clindamicina (DA) 2µg Marca: Bioanalyse®

- Discos de Cefotaxima (CTX) 30µg Marca: Bioanalyse®
- Discos de Levofloxacin (LEV) 5µg Marca: Bioanalyse®
- Discos de Ciprofloxacina (CIP) 5µg Marca: Bioanalyse®
- Discos de Penicilina G. (P) 10U Marca: Bioanalyse®
- Agar Müeller-Hinton suplementado con 5% de sangre de cordero. Marca: BD®
Lote:4350581

4.7.1.1.3. Insumos Microbiología

- Cajas monopetri pequeñas
- Asas
- Pinzas
- Hisopos estériles
- Tubos de vidrio estériles

4.7.1.2. *Reactivos*

4.7.1.2.1. Reactivos de microbiología

- Peróxido de hidrógeno
- Solución salina al 0.9%
- Reactivos para la tinción Gram

4.7.1.2.2. Reactivos de biología molecular

- GoTaq® Master Mix
- Agua de tipo molecular II
- Primers forward y reverse de *cfb*, *atr*, *ermA*, *ermB*, *lnuB*
- Agarosa grado analítico
- TAE 40X
- GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain. Lote: 1686145. Marca: Thermo Fisher Scientific®
- Ladder de 100pb
- Kit de purificación Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Lote: 158121. Marca: Promega®

4.7.2. Métodos

Fase I: Identificación fenotípica

Para este estudio se seleccionaron todas las cepas identificadas como *Streptococcus agalactiae* o Estreptococo Beta hemolítico del Grupo B preservadas en el Instituto de Investigación en Salud Pública de Quito (INSPI) y que cumplieran con los criterios de inclusión descritos anteriormente. En total se obtuvieron 57 cepas provenientes de diversas casas de salud durante el periodo de octubre 2007 a marzo 2016. Todas las cepas fueron identificadas de forma fenotípica de acuerdo a los parámetros descritos en el Anexo 1,

utilizando pruebas como la presencia del factor de CAMP, catalasa y la prueba de sensibilidad a la Bacitracina de 0.04U (taxo "A").

Todas las cepas aisladas e identificadas fueron preservadas en criotubos que contienen medio BHI + glicerol al 20% a una temperatura de -70°C descrito en el Anexo 2.

Para el estudio estadístico se tomó en cuenta variables epidemiológicas como la edad, sexo, tipo de muestra y fecha de aislamiento.

Fase II: Determinación de susceptibilidad antimicrobiana

Para determinar los perfiles de susceptibilidad de las 57 cepas acogidas en este estudio, se siguió la técnica de difusión de discos Kirby Bauer en el medio de cultivo Mueller-Hinton 5% sangre como se muestra en el Anexo 3. Se utilizaron 6 discos de antibióticos de diversas familias ya sean los utilizados en terapéutica o bien para determinar el mecanismo de resistencia enzimático (presencia de metilasas). Dentro del grupo de las penicilinas naturales la Penicilina G (P), de las cefalosporinas de 3° generación la Cefotaxima (CTX), una quinolona de 2° generación Ciprofloxacina (CIP), Levofloxacina (LEV) como una fluoroquinolona de 3° generación, una lincosamida como es la Clindamicina (DA) y un macrólido de 14 átomos que es la Eritromicina (E). Estos últimos dispuestos de manera conjunta para determinar, de forma fenotípica, la presencia de metilasas (Test en D) como se muestra en el Anexo 5 y la Figura 1.

Además de la realización de los antibiogramas, las cepas que presentaron alguna resistencia a eritromicina, clindamicina o ambos antibióticos, se las testeó para obtener la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) con la utilización de la tarjeta AST-GP67 del equipo Vitek® 2 (BioMérieux) el cual trabaja con una técnica de microdilución.

Fase III: Determinaciones por biología molecular

4.7.2.1.1. Identificación de *Streptococcus agalactiae* por PCR

Para la identificación genotípica de las cepas de *Streptococcus agalactiae* se utilizaron los genes *cfb* y *atr*. Para cumplir con esto, se extrajo el DNA bacteriano según el protocolo detallado en el Anexo 8, de cada una de las 57 cepas estudiadas, así como el de una cepa conocida de *Streptococcus agalactiae* codificada como OPS 205 proporcionada por el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos del INSPI-Quito, la cual se utilizó como control positivo para los genes de identificación mencionados. El protocolo de trabajo utilizado se detalla en el Anexo 9. Los amplicones obtenidos del ensayo de PCR fueron comparados con un marcador de peso molecular (Ladder de 100pb).

4.7.2.1.2. Determinación de genes de resistencia mediante PCR

Dentro de la determinación genotípica de los mecanismos de resistencia enfocados en este trabajo, se escogieron a las cepas que presentaron resistencia a eritromicina y/o clindamicina y, se realizó un ensayo de PCR para la búsqueda de los genes *ermA*, *ermB*, *lnuB* siguiendo el protocolo detallado en el Anexo 10. Como control positivo para el gen *ermB* se utilizó una cepa salvaje de *Enterococcus spp.* que amplificó para este gen. Los amplicones obtenidos del ensayo de PCR fueron comparados con un marcador de peso molecular (Ladder de 100pb).

4.7.2.1.3. Purificación y secuenciación

Las cepas de *Streptococcus agalactiae* que presentaron resistencia a eritromicina y/o clindamicina cuyos productos de amplificación para el gen *ermB* dieron resultados positivos

fueron purificados mediante el Kit de purificación Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega siguiendo su protocolo indicado en el Anexo 11. Una vez purificados los productos, se procedió a enviarlos a la empresa MACROGEN (Seúl, Corea) para su respectiva secuenciación como lo indica el Anexo 12 y la Figura 6.

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el programa *Geneious 9.1.2*, donde se ingresan las secuencias obtenidas y se las compara con la secuencia de la base de datos moleculares de la página del NCBI del gen *ermB* (gen Y00116).

Fase IV: Análisis de resultados

Los resultados obtenidos de los antibiogramas (mediciones de los halos de inhibición), fueron comparados con las medidas establecidas en el manual del CLSI, 2015, para su posterior interpretación como sensible, intermedio o resistente, además de reportar la presencia de un test en “D” positivo en las cepas que así lo presentaban. De la misma manera, los resultados obtenidos de MIC fueron interpretados por el equipo Vitek® 2 (BioMérieux) para la determinación de las cepas como sensible, intermedio, resistente o bien con resistencia inducida (metilasas).

Dentro de la parte genotípica, se realizaron las PCR de acuerdo a lo descrito anteriormente y la presencia de las bandas en el peso específico se las consideró como positivas para cada gen.

Dentro de la secuenciación, se observaron las mutaciones en la secuencia del gen *ermB* de cada cepa resistente comparada con la secuencia preexistente del gen Y00116 de *ermB*, demostrando los cambios de las bases nitrogenadas de algunas de las secuencias que, producían o no cambios en los aminoácidos codificados.

4.7.3. Control de calidad

4.7.3.1. Agar base sangre

El control de calidad de este medio se realizó acorde a lo establecido en el CLSI contando con un control de esterilidad para cada lote preparado.

4.7.3.2. Agar Müeller-Hinton 5% sangre

El control de calidad de este medio se lo realizó mediante los lineamientos descritos en la publicación de Zurita del año 2012. Donde se muestran los controles para el pH del medio, la profundidad del agar, la humedad y esterilidad del medio, además del almacenamiento adecuado del mismo (Zurita, 2012, pp. 22–24).

4.7.3.3. Discos antibióticos

Se realizó el control de calidad de cada lote de los discos de antibióticos utilizados según lo descrito en la obra de Zurita del año 2012. Para ello, se realizó un antibiograma utilizando la cepa multisensible ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*. Todo el procedimiento se lo realizó considerando las recomendaciones del CLSI.

4.7.3.4. Genes para el ensayo de PCR

Como se describió anteriormente, para los controles positivos se utilizaron DNA de bacterias que poseen y amplifican los genes *cfb*, *atr*, *ermB*, proporcionados por el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Referencia Nacional a los Antimicrobianos del INSPI-Quito.

CAPÍTULO IV

5. RESULTADOS

Dentro del cepario del área de: “Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos” (RAM) del Instituto Nacional De Investigación En Salud Pública Quito (INSPI-Q) existe un total de 103 cepas de *Streptococcus agalactiae*, de las cuales solo 57 cumplieron con los criterios de inclusión propuestos en este estudio. Las cepas usadas para esta investigación pertenecen al período comprendido entre el año 2007 al 2016; todas estas cepas fueron preservadas en BHI + Glicerol 20% a una temperatura de -70° C como se muestra en el Anexo 2.

Todas las cepas fueron identificadas mediante el protocolo descrito en el Anexo 1, y fueron aisladas de muestras, procedentes de varias casas de salud del país. En el Anexo 3 se muestra además la base de datos completa de las cepas estudiadas.

La cantidad de cepas identificadas como *Streptococcus agalactiae* remitidas al INSPI a través de los años y, su distribución según el género se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2: Tabla de contingencia de cepas de *Streptococcus agalactiae* en el período desde 2007 a 2016 y porcentajes por género. En la tabla se muestra el número de cepas y el porcentaje que representan dentro de la variable de género, la distribución por rango de años y el total.

Año	Femenino		Masculino		Total	
	Número de cepas	Porcentaje	Número de cepas	Porcentaje	Número de cepas	Porcentaje
2007-2009	5	8,8%	1	1,8%	6	10,5%
2010-2012	17	29,8%	5	8,8%	22	38,6%
2013-2016	16	28,1%	13	22,8%	29	50,9%
Total	38	66,7%	19	33,3%	57	100%

Fuente: Cepas pertenecientes al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI)

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ

La mayor cantidad de cepas pertenecen al género femenino siendo este el 66.67% del total de cepas estudiadas lo que es equivalente a 38 cepas.

Las cepas de *Streptococcus agalactiae*, remitidas al INSPI, fueron aisladas de distintos tipos de muestras biológicas y su distribución se puede observar en la Tabla 3, con un predominio de muestras de orina con el 56.1% (50.9% femenino y 5.3% masculino); seguido por un 17.5% en semen y 15.8% en secreción vaginal.

Tabla 3: Tabla de contingencia de la distribución de cepas de *Streptococcus agalactiae* según tipo de muestra. En la tabla se observa el número de muestras de *Streptococcus agalactiae* que corresponde a cada tipo de muestra y el porcentaje que esto representa.

Tipo de muestra	Número de muestras	Porcentaje de muestras
Herida	1	1,8%
Muestras de genital masculino	3	5,3%
Muestras invasivas	2	3,5%
Orina	32	56,1%
Secreción vaginal	9	15,8%
Semen	10	17,5%
Total	57	100,0%

Fuente: Cepas pertenecientes al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI)

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ

La mayor cantidad de muestras remitidas al INSPI-Q e identificadas como *Streptococcus agalactiae* dentro del género masculino fueron las de semen (n=10), seguidas por las de orina (n=3). Mientras que dentro del género femenino existió mayor número de muestras de orina (n=29) sobre las muestras de secreción vaginal (n=9).

5.1. PRUEBAS FENOTÍPICAS DE IDENTIFICACIÓN

Para la identificación del *Streptococcus agalactiae* se usó pruebas fenotípicas. En el 100% de las cepas estudiadas se observaron cocos Gram positivos al microscopio y tienen la presencia de una beta hemolisina (β -hemólisis), también el 100% de las cepas son incapaces de desdoblar el peróxido de hidrógeno. Así mismo, el 100% de las cepas presentan el factor CAMP y son resistentes a bacitracina.

5.2. PERFILES DE SUSCEPTIBILIDAD

Dentro de este estudio se analizó la sensibilidad a eritromicina (E), clindamicina (DA), levofloxacin (LEV), ciprofloxacina (CIP) (este medicamento se lo investigó con propósitos de epidemiológicos y como alternativa a levofloxacin), penicilina G (P) y cefotaxima (CTX). En el Anexo 7 se muestra la tabla con las mediciones del diámetro de los halos de inhibición que presentaron las cepas estudiadas en los antibiogramas realizados, además que se muestran como observaciones aquellas cepas que tuvieron el test en “D” positivo. Además, en la Figura 1 se pueden observar las imágenes de algunos antibiogramas realizados con diferentes perfiles de resistencias, incluso se muestra un test en “D” positivo.

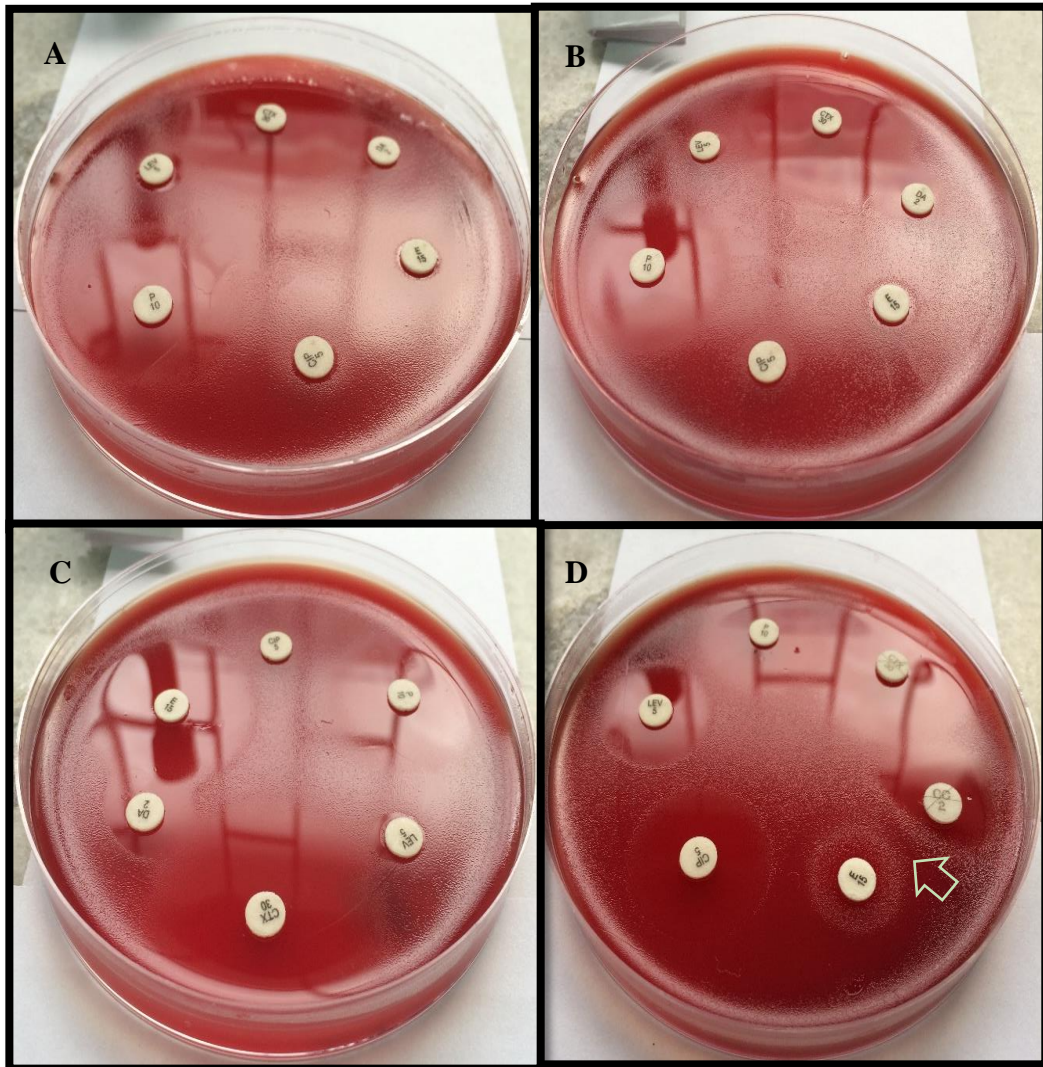


Figura 1: Antibiogramas de algunas de las cepas resistentes a macrólidos y lincosamidas. En la figura se puede observar los antibiogramas de algunas de las cepas de *Streptococcus agalactiae* de este estudio con diferentes patrones de resistencia tanto a macrólidos como a lincosamidas.

A: antibiograma de la cepa GBS058, se muestra la resistencia frente a eritromicina y clindamicina. B: antibiograma de la cepa GBS062 donde se muestra la ausencia de los halos de inhibición (resistencia) frente a eritromicina y clindamicina C: antibiograma de la cepa GBS069 en donde se muestra la sensibilidad hacia la eritromicina, pero la resistencia frente a clindamicina. D: antibiograma de la cepa GBS071 en donde se puede observar claramente la flecha que indica el test en “D” positivo.

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ, 2016

IMÁGENES DE AUTORÍA PROPIA

Por otro lado, los porcentajes de sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia se pueden observar en la Figura 2. Todas las cepas de este estudio fueron sensibles a betalactámicos teniendo un 100% (n=57) de sensibilidad a penicilina y cefotaxima, la sensibilidad a levofloxacin y a ciprofloxacina fue del 82.5% (n=47) y 77.2% (n=44) respectivamente. La sensibilidad a eritromicina y clindamicina fue del 77.2% (n=44) y 71.9% (n=41) y, con una resistencia de 21.1% (n=12) y 28.1% (n=16) respectivamente, presentando varios fenotipos de resistencia a macrólidos y lincosamidas, además se presentó un 1.8% (n=1) de las cepas con sensibilidad intermedia a eritromicina.

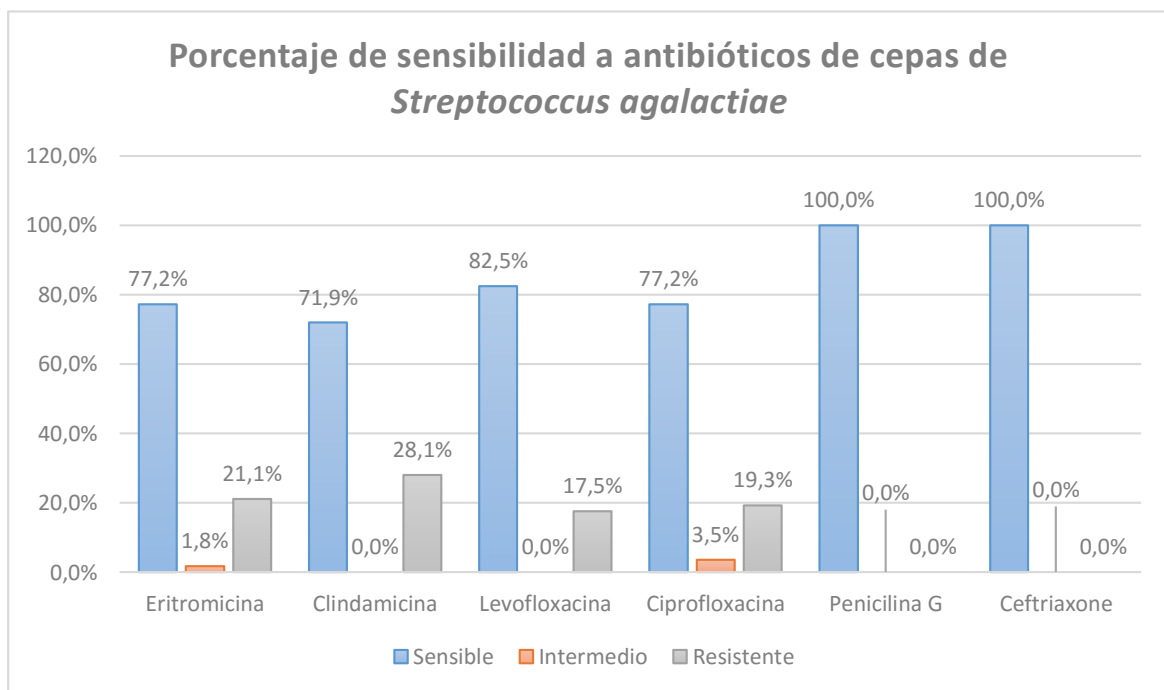


Figura 2: Porcentaje de sensibilidad a antibióticos de las cepas de *Streptococcus agalactiae* estudiadas. En la figura se ven representados los porcentajes de sensibilidad (azul), sensibilidad intermedia (naranja) y resistencia (gris) del total de cepas de *Streptococcus agalactiae* de esta investigación.

Fuente: Cepas pertenecientes al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI)

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ

Las muestras resistentes fueron analizadas por Vitek® 2 (BioMérieux) para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), los resultados se pueden observar en la Tabla 4.

5.3. PRUEBAS GENOTÍPICAS DE IDENTIFICACIÓN

Anteriormente, se mostraron los resultados de las pruebas fenotípicas de identificación. Sin embargo, dentro de este estudio también se realizaron pruebas genotípicas de identificación en las cuales se buscaron los genes: *atr* y *cfb* los cuales amplificaron para el 98.25% (n=56 cepas) de las cepas con un 1.75% (n=1 cepa) de las cepas que no amplificaron para ninguno de los dos genes. Además, los gráficos de los geles revelados de la técnica de PCR específica para estos genes se pueden observar en la Figura 12 y Figura 13.

5.4. DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA TIPO *ermA*, *ermB*, *lnuB*

Para la determinación de los genes de resistencia, fueron analizadas las cepas que presentaban resistencia total o intermedia a clindamicina y/o eritromicina o un test en D positivo. Cabe mencionar que en este estudio no existieron cepas que amplificaron para los genes *lnuB* o *ermA* como lo muestra la Tabla 4. Los gráficos de los geles revelados de la técnica de PCR específica para estos genes se pueden observar en la Figura 14.

Tabla 4: Cepas de *Streptococcus agalactiae* resistentes a macrólidos, lincosamidas y estreptogramidas. En la tabla se observa la interpretación del antibiograma de los discos de eritromicina y clindamicina. Además, se muestran los valores de la concentración mínima inhibitoria de eritromicina, clindamicina y quinupristina/dalfopristina realizada por el equipo Vitek® 2 por el método de microdilución. Así mismo, se ven incluidos los resultados del test en “D”, los genes de resistencia amplificados y el fenotipo que se atribuye.

Código de la cepa	Interpretación discos*		Concentración mínima inhibitoria (MIC)			Test en D ⁺	Gen de resistencia	Fenotipo [†]
	E**	DA**	E**	DA**	Q/D**			
GBS006	R	R	>=8	>=8	<=0,25	N	<i>ermB</i> ⁺⁺	cMLS _B
GBS022	R	R	>=8	>=8		N	<i>ermB</i> ⁺⁺	cMLS _B
GBS023	S	R	<=0,25	4	0,5	N	-	L
GBS025	R	R	>=8	>=8	<=0,25	N	<i>ermB</i> ⁺⁺	cMLS _B
GBS031	S	S	<=0,25	<=0,25	<=0,25		<i>ermB</i> ⁺⁺	SC
GBS032	R	R	>=8	>=8	<=0,25	N	<i>ermB</i> ⁺⁺	cMLS _B
GBS041	I	S	4	>=8	<=0,25	N	-	M
GBS050	S	R	<=0,25	>=8	<=0,25	N	-	L
GBS053	R	R	>=8	2	<=0,25	N	<i>ermB</i> ⁺⁺	cMLS _B
GBS057	S	R	<=0,25	>=8	0,5	N	-	L
GBS058	R	R	>=8	>=8	0,5	N	<i>ermB</i> ⁺⁺	cMLS _B
GBS062	R	R	>=8	>=8	0,5	N	<i>ermB</i> ⁺⁺	cMLS _B
GBS069	S	R	<=0,25	>=8	0,5	N	-	L
GBS071	R	R	>=8	2 ⁺⁺⁺	2	P	<i>ermB</i> ⁺⁺	iMLS _B
GBS073	R	R	>=8	>=8	0,5	N	<i>ermB</i> ⁺⁺	cMLS _B
GBS079	R	R	2	<=0,25 ⁺⁺⁺	<=0,25	P	<i>ermB</i> ⁺⁺	iMLS _B
GBS082	R	R	>=8	>=8	<=0,25	N	<i>ermB</i> ⁺⁺	cMLS _B
GBS083	R	R	2	>=8	<=0,25	N	<i>ermB</i> ⁺⁺	cMLS _B

*Resistente (R), Intermedio (I), Sensible (S). **Eritromicina (E), Clindamicina (DA)

Quinupristina/Dalfopristina (Q/D). [†]Resultado negativo (N), Resultado positivo (P). ⁺⁺*ermB*: erithromycin ribosome metilation type B. ^{††}Fenotipo constitutivo de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (cMLS_B). Fenotipo sin clasificar (SC), Fenotipo resistente por evaluación de la Eritromicina inducible de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (iMLS_B), Fenotipo de resistencia a lincosamidas (L), Fenotipo de resistencia a macrólidos (M). ⁺⁺⁺Presencia de metilasa de tipo inducible determinada por Vitek ® 2. Puntos de corte tomados del CLSI 2015 de: eritromicina: S:<=0.25 I: 0.5 R:>=1, clindamicina: S:<=0.25 I: 0.5 R:>=1, quinupristina/dalfopristina S<=1 I:2 R:>=4

Fuente: Cepas pertenecientes al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI)

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ

Las cepas que se investigaron para resistencia presentan distintos tipos de MLS_B. El 50% (n=9) de las cepas estudiadas presentan un fenotipo de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B de tipo constitutivo (cMLS_B); el 11.1% (n=2) son de tipo inducible (iMLS_B), el 22.2% (n=4) presentan un fenotipo de resistencia a lincosamidas mientras que el 5.6% (n=1) tienen el fenotipo de resistencia a macrólidos y, por último, el 11.1% (n=2) son no clasificables (sin clasificar) ya que no se presenta amplificación de los genes de resistencia estudiados, sin embargo, presentan una resistencia a los antibióticos eritromicina y/o clindamicina.

Dentro de las cepas que amplificaron para el gen *ermB*, el 15.4% (n=2) presentaban el fenotipo de test en “D” positivo que se puede interpretar como la presencia de una enzima metilasa de tipo inducible, mientras que el 76,9% (n=10) de las cepas que presentaban resistencia a eritromicina, clindamicina o ambas, en este caso se puede determinar como la producción de una enzima metilasa de tipo cromosómico. Por otro lado, un 7.7% (n=1) a pesar de que presentó sensibilidad a clindamicina y eritromicina, en el antibiograma se mostró un achatamiento de los halos de inhibición en dichos antibióticos, generando un caso inusual en nuestro estudio por lo que se la sometió a la técnica de PCR de los genes de resistencia, amplificando para el gen *ermB*. Estos datos se muestran en la Figura 3.

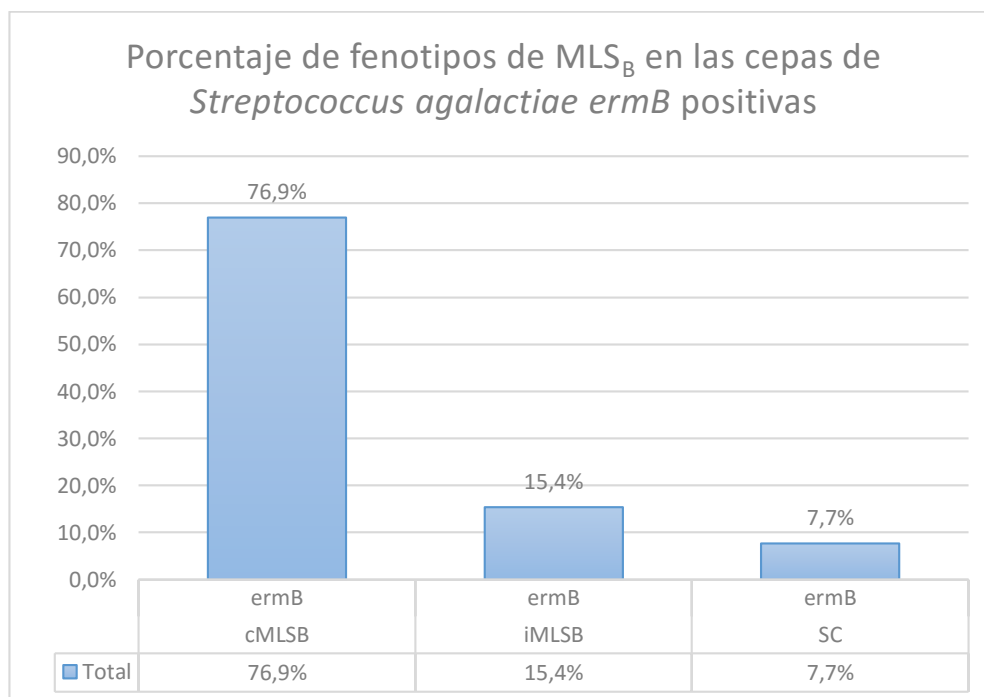


Figura 3: Porcentaje de fenotipos de MLS_B en las cepas de *Streptococcus agalactiae* que amplificaron para el gen *ermB*. La figura muestra los porcentajes de los distintos fenotipos de MLS_B encontrados en las cepas de *Streptococcus agalactiae* que amplificaron para el gen de resistencia *ermB*.

Fuente: Cepas pertenecientes al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI)

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ

5.5. SECUENCIACIÓN DEL GEN *ermB*

Para la secuenciación se purificaron los amplicones según protocolo del Anexo 11 y se envió según el protocolo presente en el Anexo 12. Una vez obtenidas las secuencias, la interpretación de los resultados se la realizó mediante el programa “Geneious” versión 9.1.2.

Los resultados que se obtuvieron fueron que en las muestras GBS022 y GBS071 existen mutaciones, en la posición 222 de una timina por una citosina la cual no modifica el aminoácido codificado que es una Asparagina (N), en la posición 224 se aprecia la mutación de una citosina por una timina causando una modificación en el codón codificado reemplazando a una Treonina (T) por una Isoleucina (I). En la posición 299 de la cepa 22

presenta una mutación de una guanina por una adenina dando lugar al cambio de la codificación de una Serina (S) a una Asparagina (N). La cepa 31 no presenta mutaciones en el gen *ermB*. Todas estas mutaciones puntuales y sus cambios tanto en los ácidos nucleicos como en los aminoácidos que codifican se pueden observar en la Figura 15.

En el Anexo 13 se puede observar la correlación entre algunas de las cepas *ermB* positivas y el tipo de sustitución de aminoácidos encontrados. Cabe mencionar que no todas las cepas que poseían el gen *ermB* fue posible realizar el alineamiento puesto que las secuencias obtenidas presentaron demasiado ruido de fondo que pudo ser producido por una cantidad muy baja del amplicón.

6. DISCUSIÓN

El *Streptococcus agalactiae* o también conocido como estreptococo beta hemolítico del grupo B (GBS) tiene una distribución a nivel mundial, variando su prevalencia según la zona geográfica. En países desarrollados se presenta una prevalencia del 5% al 35% mientras que en países en vías de desarrollo la prevalencia varía de 4% a 20% (Instituto de Salud Pública de Chile, 2012). En Ecuador la prevalencia de este patógeno va desde el 3% (Cantuña, 2012) al 13% (Gómez Ortiz & Ramírez Bazante, 2013), sin embargo, no existen estudios publicados más cercanos que indiquen la prevalencia del *Streptococcus agalactiae* en nuestro país. En este estudio no se pretende dotar de datos de prevalencia del patógeno estudiado puesto que al no tener una población homogénea y al haber estudiado las cepas de un solo laboratorio de Quito, los datos serían erróneos y altamente sesgados.

No obstante, este estudio además de toda la literatura consultada, demuestran que el *Streptococcus agalactiae* continúa siendo un patógeno de alta importancia en embarazadas (Bolukaoto et al., 2015; Villar & Jugo, 2013a) además de que se presenta como una bacteria de alta patogenicidad en neonatos (Díaz Álvarez et al., 2008; Nitschke et al., 2014; Puopolo & Madoff, 2007) y, que no solo son estos los grupos afectados sino que también se ve un aumento de infecciones de tipo no invasivas como en muestras de orina (Crespo-Ortiz et al., 2014; Huber et al., 2011; Sadowy et al., 2010; Ulett et al., 2010).

El género femenino, en este estudio, demostró tener mayor predominio de aislados de *Streptococcus agalactiae* en las muestras obtenidas, con un porcentaje del 66.7% (n=38) de las 57 cepas estudiadas frente a un 33.3% (n=19) del género masculino. La mayoría de las cepas incluidas en esta investigación pertenecieron a casas de salud de la ciudad de Quito.

Las altas tasas de colonización de *Streptococcus agalactiae* han sido reportadas en otros estudios como el perteneciente a G. Ulett (Ulett et al., 2010), otros como en el artículo científico de C. Huber (Huber et al., 2011), y el estudio publicado de M. Crespo, este último autor también denota el aumento de aislados de *Streptococcus agalactiae* en otro tipo de muestras como secreción vaginal, secreciones de genital masculino y muestras invasivas (Crespo-Ortiz et al., 2014). En los resultados de esta investigación se evidenció que la muestra con más predominio fue la de orina con un porcentaje del 56.1%, seguido de semen con un 17.5% y secreción vaginal con un 15.8%. Los datos obtenidos en nuestro estudio se correlacionan con la literatura analizada y que se menciona anteriormente; además, demuestra un desafío y, denota que se debe tomar en cuenta a esta bacteria en casos de infecciones de vías urinarias, y aún más en casos de bacteriurias asintomáticas (Huber et al., 2011) de las cuales es responsable *Streptococcus agalactiae* y que podría desencadenar casos más graves como pielonefritis (Ulett et al., 2010).

Por lo antes mencionado, la identificación adecuada y oportuna de esta bacteria es menester. Por lo mismo, dentro de este estudio se realizaron pruebas de identificación tanto fenotípica y genotípica. Se realizaron pruebas como Gram, Hemólisis, Catalasa, CAMP y Bacitracina que son regularmente las pruebas utilizadas en laboratorios convencionales para la identificación del *Streptococcus agalactiae* (Fernández Olmos et al., 2010), todas las cepas estudiadas demostraron la correlación exacta de los resultados de estas pruebas con los esperados. Todas fueron cocos gram positivos en cadenas, colonias beta hemolíticas. El 100% de las cepas obtuvieron un resultado negativo en la prueba de catalasa, además de un test de CAMP positivo y resistencia a la bacitracina. Estos resultados son notablemente adecuados si se los compara con otras investigaciones en las cuales se utilizan las mismas pruebas de identificación y presentan resultados muy acordes a los esperados. Como por

ejemplo el artículo de M. Díaz presenta la identificación fenotípica de las cepas de *Streptococcus agalactiae* con pruebas como hemólisis en agar sangre de cordero, prueba de sensibilidad a la bacitracina, prueba de catalasa y el test de CAMP, concluyendo que todas sus cepas dieron los resultados esperados (Díaz Álvarez et al., 2008). En otro estudio también se muestra que las pruebas de sensibilidad a la bacitracina, así como la hemólisis en agar sangre, el test de CAMP además de la prueba de catalasa (Crespo-Ortiz et al., 2014) son utilizadas para la identificación de *Streptococcus agalactiae* presentando resultados similares a los de nuestra investigación. Por todo esto, estas pruebas para la identificación fenotípica de esta bacteria continúan siendo hasta la actualidad las más utilizadas.

Esta investigación fue realizada con el fin determinar fenotípicamente los perfiles de resistencia antimicrobiana de las cepas de *Streptococcus agalactiae* utilizadas. Se ha descrito que *Streptococcus agalactiae* se caracteriza por ser sensible a la penicilina (Liébana-Martos et al., 2015; Nasri, Chehrei, & Manavi, 2013), sin embargo, también se ha estudiado el aumento de la resistencia tanto a macrólidos y lincosamidas e incluso a fluoroquinolonas (Castro, Silva et al., 2013; Villar et al., 2014; Villar & Jugo, 2013b).

Dentro de este parámetro, de las 57 cepas que cumplían los criterios que necesitábamos para este estudio, se mostró la resistencia a los antibióticos eritromicina en un 21.1% y a clindamicina en un 28.1%. Estos porcentajes fueron más elevados que los presentados en otro estudio que determina un 5% de resistencia a clindamicina y 11% de resistencia a eritromicina (Nakamura et al., 2011) y aquellos reportados por otro artículo que determina una resistencia a eritromicina del 8.3% y a clindamicina del 4.1% (Liébana-Martos et al., 2015). Por otro lado, los porcentajes obtenidos en esta investigación se acercan a los porcentajes obtenidos por otro estudio que determina 20.7% de resistencia a

clindamicina y un 27.6% a eritromicina (Castro, Silva et al., 2013) así como se asimila al porcentaje de resistencia a eritromicina del 24% (Nasri et al., 2013) no obstante, no se reporta resistencia a clindamicina pues no se probó este antibiótico en dicha investigación. En investigaciones dentro de Latinoamérica se han descrito porcentajes de resistencia a eritromicina de 4.1% (Dutra et al., 2014), 8.9% (Crespo-Ortiz et al., 2014), 11.6% (Oviedo et al., 2013) y 21.43% (Laczeski et al., 2014), nuestro estudio se asemeja a este último. En cuanto a resistencias a clindamicina se han descrito porcentajes de 3% (Dutra et al., 2014), 2.4% (Crespo-Ortiz et al., 2014), 4% (Martínez T et al., 2004) y 5.2% (Faccone et al., 2010), estos porcentajes son notablemente inferiores a los encontrados en nuestra disertación. Aunque estos valores sean tan fluctuantes significan una alarma dentro del tema de resistencias bacterianas y más si estos antibióticos son utilizados como medidas terapéuticas.

Dentro de nuestro país son pocos los estudios publicados con respecto a *Streptococcus agalactiae* y menos son aquellos que realizan pruebas de sensibilidad antibiótica. Existen datos de un trabajo de investigación escrito por N. Aguilar en el año 2015 de la ciudad de Guayaquil, donde muestra que el porcentaje de resistencia a clindamicina de las cepas de *Streptococcus agalactiae* de su estudio fue del 48.5% (Aguilar, 2015), porcentaje que es mayor al que nosotros reportamos en nuestro estudio que es de 28.1%. Sin embargo, aquel trabajo no presenta datos de resistencia a macrólidos. Estos datos demuestran que existen resistencias a los antimicrobianos por parte de la bacteria estudiada y que deberían ampliarse más las investigaciones para determinar los porcentajes de resistencia que presenta *Streptococcus agalactiae* tanto a macrólidos y lincosamidas dentro de Ecuador.

Dentro del estudio de identificación genotípica, se empleó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la determinación de la presencia de los genes *atr* y *cfb* que se amplificaron en el 98.25% de las cepas identificadas. Esto concuerda con algunos estudios que muestran que el gen *cfb* podría no amplificarse ya que podría estar mutado o definitivamente no presente (Kong et al., 2002). De todas las cepas investigadas en nuestro estudio (n=57), solo 1 cepa no obtuvo amplificación de los genes de identificación a pesar de tener un test de CAMP positivo y las demás pruebas fenotípicas de identificación acorde a lo esperado para el *Streptococcus agalactiae*. Este caso podría deberse a la mutación del gen *cfb* como se mencionó antes, sin embargo, el gen *atr* también estuvo ausente en esta cepa por lo que se podría esperar que la cepa no corresponda a un *Streptococcus agalactiae* sino tal vez a otra cepa que contiene el gen mutado del factor CAMP y por eso lo expresa fenotípicamente pero no de forma molecular (Gase, Ferretti, Primeaux, & Mcshan, 1999).

Tomando en cuenta solo a las cepas que presentaron algún tipo de resistencia a antibióticos, fueron 18. Todas ellas, como se informó con anterioridad, fueron testeadas a través de la técnica de PCR para la búsqueda de los genes de resistencia *ermA*, *ermB*, *lnuB*. El gen de total predominio fue el *ermB* ya que no se obtuvieron cepas positivas para los genes *ermA* y *lnuB*.

La presencia del gen *ermB* está relacionada con la alta resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B y es el gen más comúnmente encontrado en las cepas de *Streptococcus agalactiae* (Bolukaoto et al., 2015; Castro, Silva et al., 2013; Gosiewski et al., 2012; Nakamura et al., 2011), aunque en otros estudios revisados previamente también se ha mostrado la presencia de combinaciones de genes *ermA+ermB* o *ermA+mefA/E*

(Nakamura et al., 2011) o bien la presencia de *ermB+lnuB*, la presencia de solo el gen *ermB* concuerda con algunos artículos como se indica anteriormente y con nuestros hallazgos.

En el *Streptococcus agalactiae*, la resistencia generada por el gen *ermB* es mediada por las enzimas metilasas que codifica este gen para así dimetilar al residuo de adenina de la posición 2058 del 23S-rARN (Ding et al., 2012), dada esta modificación los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B son incapaces de unirse a su sitio de acción. El gen *ermB* puede estar transportado por dos tipos de transposones o en plásmidos (Okitsu et al., 2005), por lo que la transferencia horizontal puede darse, de hecho *Streptococcus agalactiae* no es la única bacteria que puede tener el gen de resistencia *ermB*, ya que se ha reportado también en *Streptococcus pneumoniae* (Okitsu et al., 2005), en *Staphylococcus aureus* (Ding et al., 2012), en *Enterococcus spp.* (Villar & Jugo, 2013b), etc.

Algo notable fue la cepa GBS031, la cual presentó un leve achatamiento en los halos de inhibición tanto para eritromicina como para clindamicina, pero la cepa se presentó sensible para ambos antibióticos, por lo que se buscó la presencia de genes de resistencia, la cepa obtuvo una amplificación del gen *ermB*. El amplicón de esta cepa se envió para su secuenciación, mas no presentó mutaciones dentro del gen *ermB*. Este tipo de casos de cepas sensibles pero que amplifican para este gen de resistencia se ha visto en otros estudios como el publicado por Z. Ding quien menciona que si se presentan mutaciones en las regiones promotoras del gen resulta en una falla dentro de la estructura secundaria de las enzimas produciendo metilasas no funcionales (Ding et al., 2012). Por tanto, esta podría ser la razón de la sensibilidad de esta cepa a pesar de amplificar para el gen de resistencia *ermB*

En este estudio también se trató de mostrar la presencia de otro gen de resistencia de la familia *erm*, que fue el gen *ermA*. El gen *ermA* tiene la misma forma de acción que el gen *ermB*, por pertenecer a la misma familia. También presenta una metilación en el sitio 2058 del 23S-rARN, lo que imposibilita a los antibióticos macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B unirse al sitio de acción (Laczeski et al., 2014).

Se probaron varias cepas resistentes a macrólidos y lincosamidas de nuestro estudio, pero ninguna obtuvo la amplificación de *ermA*, a su vez, se probaron cepas resistentes de *Enterococcus spp.*, ninguna de ellas amplificó para este gen. Otros autores como Z. Ding presentan primers diferentes a los utilizados en este estudio para la búsqueda de este gen (F: 5'-ATGAACCAGAAAAACCCTAAA-3', R:5'-GGCTTAGTGAAACAATTTGTAAC-3'), obteniendo un amplicón de 732pb (Ding et al., 2012; Dutra et al., 2014). Es posible que, por los resultados obtenidos en nuestro estudio, los primers utilizados probablemente no son específicos y no reconocieron el gen de resistencia *ermA*. Por lo que, para determinar la posible presencia del gen se debería diseñar y sintetizar otros primers.

Otro de los genes de resistencia que se buscó en este estudio fue el gen *lnuB*. Este gen tiene la capacidad de inactivar a las lincosamidas ya que codifica enzimas nucleotidil-transferasas que inactivan a estos antibióticos (Facone et al., 2010). Este gen es altamente asociado al fenotipo L que se caracteriza por la sensibilidad a eritromicina y la resistencia a clindamicina (Villar et al., 2014). En nuestro estudio existieron cepas que presentaron este fenotipo, sin embargo, ninguna de estas amplificó para el gen *lnuB*. Y aunque se ha reportado la presencia de este gen en cepas en Latinoamérica (Arana et al., 2014) podría tratarse de otro gen de la familia *lnu* como puede ser el gen *lnuA* (Arana et al., 2014; Faccone et al.,

2010; Instituto de Salud Pública de Chile, 2012). O bien los primers de este estudio fueron poco específicos.

7. CONCLUSIONES

El 100% de las 57 cepas remitidas de *Streptococcus agalactiae* al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Quito de octubre 2007 a marzo 2016 son fenotípicamente cocos Gram positivos, beta hemolíticos, catalasa negativa, con presencia del factor CAMP y resistentes a la bacitracina.

El 98.25% de cepas remitidas desde 2007 a 2016 de *Streptococcus agalactiae* al INSPI-Q amplificaron para los genes de identificación *atr* y *cfb*.

El gen *ermB* tiene la mayor expresión dentro de las cepas estudiadas que presentaron resistencia a eritromicina y/o clindamicina.

No se encontró la presencia de los genes *ermA*, *lnuB* las cepas resistentes a eritromicina y/o clindamicina de *Streptococcus agalactiae* remitidas al INSPI-Q en el período de estudio.

Las cepas que tienen resistencia a macrólidos y lincosamidas y, no presentan amplificación para los genes *ermA* o *ermB* se concluye que dicha resistencia puede ser causada por otros genes de la familia *erm*.

Las cepas que tienen resistencias a lincosamidas y no amplificaron para el gen *lnuB*, se cree que puede ser causado por otros genes de la familia de los *lnu*.

El 100% de las cepas son sensibles a los antibióticos de la familia de los beta-lactámicos. Sin embargo, se presentó una resistencia de 21.1% a macrólidos y 28.1% a lincosamidas.

Las mutaciones presentadas en las cepas 22 y 71 no causan ineficiencia en la acción del gen *ermB*.

De las cepas que presentaron resistencia a lincosamidas, macrólidos u ambos son causadas por una metilasa codificada por el gen *ermB*, el 75% son MLS_B cromosómico y el 16.67% son de tipo inducibles.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda el seguimiento del *Streptococcus agalactiae* en muestras de orina ya que los datos de nuestro estudio, así como la literatura consultada muestra un aumento de infecciones de tracto urinario por este patógeno, además de estudios de susceptibilidad sea por difusión de disco o concentración inhibitoria mínima (MIC).

Con los resultados obtenidos en este estudio, se recomienda que se investigación de las distintas familias del gen *erm* en cepas que presentes resistencias a lincosamidas y macrólidos también la investigación de la familia *Inu* en cepas que presenten resistencias a solo a lincosamidas además la búsqueda en genes de la familia *mef* en cepas que presenten resistencia solo a macrólidos.

Igualmente, para poder completar este estudio se debería realizar una investigación sobre los serotipos capsulares que se encuentran distribuidos en nuestro país ya que lastimosamente los trabajos sobre este tema son escasos.

Por otro lado, se recomienda, la investigación de genes de resistencia en las cepas que no fueron resistentes a macrólidos y lincosamidas ya que podrían existir mutaciones de las secuencias de los genes amplificados y determinarse una falla en la función de los mecanismos de resistencia.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abarzúa, F., Arias, A., García, P., Ralph, C., Cerda, J., Riedel, I., & Gárate, C. (2011). Aumento de resistencia de *Streptococcus agalactiae* vaginal-anal en el tercer trimestre de gestación a eritromicina y clindamicina al cabo de una década de tamizaje universal. *Revista Chilena de Infectología*, 28(4), 334–337. <http://doi.org/10.4067/S0716-10182011000500005>
- Adwan, K. (2014). Fast DNA isolation and PCR protocols for detection of methicillin-resistant staphylococci. *Folia Microbiologica*, 59, 5–8. <http://doi.org/10.1007/s12223-013-0259-1>
- Aguilar, N. (2015). Determinación de *Streptococcus agalactiae* en muestras de hisopado vaginal, rectal en embarazadas de 34 a 39 semanas de gestación en APROFE 2013. Universidad de Guayaquil.
- Aguinaga, A., & Chiclayo, A. De. (2006). Evaluación comparativa de Agar Sangre de Carnero y Agar Sangre Humana en el aislamiento de *Streptococcus* beta hemolíticos de pacientes con faringitis del Hospital.
- Alfa, M. J., Sepehri, S., De Gagne, P., Helawa, M., Sandhu, G., & Harding, G. K. M. (2010). Real-time PCR assay provides reliable assessment of intrapartum carriage of group B *Streptococcus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), 3095–3099. <http://doi.org/10.1128/JCM.00594-10>
- Andre Schorner, M. (2014). Detection of Group B *Streptococcus agalactiae* from Anorectal and Vaginal Screening Tests. *Clinical Microbiology: Open Access*, 03(05), 3–6.

<http://doi.org/10.4172/2327-5073.1000169>

Arana, D. M., Rojo-Bezares, B., Torres, C., & Alós, J. I. (2014). First clinical isolate in Europe of clindamycin-resistant group B *Streptococcus* mediated by the *Inu(B)* gene. *Revista Española de Quimioterapia : Publicación Oficial de La Sociedad Española de Quimioterapia*, 27(2), 106–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24940891>

Bartholomew, J., & Mittwer, T. (1952). The gram stain. *Bacteriological Reviews*, 16, 1–29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC180726/>

BD Diagnostics. (2014). *BD GeneOhm™ StrepB*.

Becton Dickinson and Company. (2010). *BD Directigen™ Meningitis Individual Tests*.

Berg, B. R., Houseman, J. L., Garrasi, M. A., Young, C. L., & Newton, D. W. (2013). Culture-Based Method with Performance Comparable to That of PCR-Based Methods for Detection of Group B *Streptococcus* in Screening Samples from Pregnant Women. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(4), 1253–1255. <http://doi.org/10.1128/JCM.02780-12>

BioMérieux. (2016a). Agar GRANADA, para el screening de estreptococos del Grupo B (SGB). Retrieved from http://www.biomerieux.es/servlet/srt/bio/spain/dynPage?open=SPN_CLN_PRD&doc=SPN_CLN_PRD_G_PRD_CLN_93&pubparams.sform=3&lang=es#

BioMérieux. (2016b). *chromID™ Strepto B*. Retrieved from <http://www.biomerieux-diagnostics.com/chromid-strepto-b>

- Bio-Rad. (2012). Chromogenic Media - Bio-Rad. Retrieved from http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/cdg/literature/16051_B_Chromogenic_Media.pdf
- Bolívar, A. M., Rojas, A., & García-Lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple : parámetros críticos y protocolo de estandarización (PCR and PCR-Multiplex : critical parameters and standardization protocol) Resumen Introducción. *Avan Biomed.*, 3(1), 25–33.
- Bolukaoto, J. Y., Monyama, C. M., Chukwu, M. O., Lekala, S. M., Nchabeleng, M., Maloba, M. R. B., ... Moyo, S. R. (2015). Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women in Garankuwa, South Africa. *BMC Research Notes*, 8, 364. <http://doi.org/10.1186/s13104-015-1328-0>
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, T. (2014). *Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología médica* (26a ed.). Mc Graw Hill Education.
- Cabero, L., & Saldivar, D. (2008). *Obstetricia Y Medicina Materno Fetal*. Ed. Médica Panamericana. Retrieved from [http://books.google.com.gt/books?id=AGh8rK1MmOsC&printsec=frontcover&dq=perinatologia+sepsis+neonatal&hl=es&sa=X&ei=_YxaUaS2Ee-p4APKmIGQCA&sqi=2&redir_esc=y#v=onepage&q=perinatologia sepsis neonatal&f=false](http://books.google.com.gt/books?id=AGh8rK1MmOsC&printsec=frontcover&dq=perinatologia+sepsis+neonatal&hl=es&sa=X&ei=_YxaUaS2Ee-p4APKmIGQCA&sqi=2&redir_esc=y#v=onepage&q=perinatologia+sepsis+neonatal&f=false)
- Cantuña, P. (2012). Factores asociados a la colonización de *Streptococcus agalactiae* en mujeres en labor de parto en el Hospital Enrique Garcés de la ciudad de Quito. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Capocefalo, M., Ridley, E. V., & Tranfield, E. Y. (2016). Molecular Microbial Diagnostic Methods. *Molecular Microbial Diagnostic Methods*. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12->

416999-9.00009-5

Castro, Silva, N., Vianna Souza, A. R., Da Silva, L. G., Corrêa, A. B. de A., Fernandes, F. G., Oliveira, I. C. M., ... Benchetrit, L. C. (2013). Distribution of serotypes and evaluation of antimicrobial susceptibility among human and bovine *Streptococcus agalactiae* strains isolated in Brazil between 1980 and 2006. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 17(2), 131–136. <http://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.09.006>

Centers for Disease Control and Prevention. (2010). Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. *Mmwr*, 59(No. RR-10), 1–32. <http://doi.org/10.1097/01.EDE.0000032431.83648.8D>

Centers for Disease Control and Prevention. (2016). Group B Strep (GBS). Retrieved from <http://www.cdc.gov/groupbstrep/clinicians/clinical-overview.html>

Cercenado, E. (2009). conceptos generales (I), 7(I), 214–217. <http://doi.org/10.7868/S0132344X16010059>

CHROMagar. (2015). StrepB. *Microbiología Clínica*.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard— Ninth Edition*. Clinical and Laboratory Standards Institute (9th ed., Vol. 32).

Crespo-Ortiz, M. del P., Castañeda-Ramirez, C. R., Recalde-Bolaños, M., & Vélez-Londoño, J. D. (2014). Emerging trends in invasive and noninvasive isolates of *Streptococcus agalactiae* in a Latin American hospital: a 17-year study. *BMC Infectious Diseases*, 14, 428. <http://doi.org/10.1186/1471-2334-14-428>

- Cruz, O. M., Doren, V. A., Tapia, I. J. L., & Abarzúa, C. F. (2008). Sepsis neonatal por *Streptococcus* Grupo B. *Revista Chilena de Pediatría*. <http://doi.org/10.4067/S0370-41062008000500003>
- Dagnew, A. F., Cunnington, M. C., Dube, Q., Edwards, M. S., French, N., Heyderman, R. S., ... Clemens, S. A. C. (2012). Variation in reported neonatal group B streptococcal disease incidence in developing countries. *Clinical Infectious Diseases*, 55(1), 91–102. <http://doi.org/10.1093/cid/cis395>
- De la rosa, M., & De Cueto Lopez, M. (n.d.). *Streptococcus agalactiae*, Control Calidad SEIMC.
- de Quadros, ciro. (2004). *Vacunas: prevención de enfermedades y protección de la salud*. (Ciro A. de Quadros, Ed.).
- De-Paris, F., Machado, A. B. M. P., Gheno, T. C., Ascoli, B. M., Oliveira, K. R. P. De, & Barth, A. L. (2011). Group B *Streptococcus* detection: comparison of PCR assay and culture as a screening method for pregnant women. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases : An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 15(4), 323–327. [http://doi.org/10.1016/S1413-8670\(11\)70199-4](http://doi.org/10.1016/S1413-8670(11)70199-4)
- Di Bartolomeo, S., Gentile, M., Priore, G., Valle, S., & Di Bella, A. (2005). *Streptococcus agalactiae* en embarazadas. Prevalencia en el Hospital Nacional Alejandro Posadas. *Revista Argentina de Microbiología*, 37(3), 142–144.
- Díaz Álvarez, M., Claver Isás, D., & Pérez Amarillo, J. (2008). Infecciones por *Streptococcus agalactiae* en un servicio de neonatología abierto. *Rev Cubana Pediatr*, 80(4).

Retrieved

from

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&npid=S0034-75312008000400002&nlng=es&nnrm=iso&ntlng=es

- Dickinson Meneses, F. O., & Ortega Rodríguez, M. (2013). Meningitis por estreptococo β -hemolítico del grupo B en lactantes Meningitis in breast-fed infants caused by Group B β -hemolytic *streptococcus*. *Revista Cubana de Pediatría*, 85(1), 66–75.
- Ding, Z. F., Zhang, H., Tang, W., Tong, C. Y., Li, R. T., Chen, L. X., ... Cui, Y. D. (2012). Methylase genes-mediated erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in China. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 67(3), 170–179.
- Dutra, V. G., Alves, V. M. N., Olendzki, A. N., Dias, C. a G., de Bastos, A. F. a, Santos, G. O., ... Fracalanza, S. E. L. (2014). *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. *BMC Infectious Diseases*, 14(June), 323. <http://doi.org/10.1186/1471-2334-14-323>
- Emaneyni, M., Mirsalehian, A., Beigvierdi, R., Fooladi, A., Asadi, F., Jabalameli, F., & Taherikalani, M. (2014). High Incidence of Macrolide and Tetracycline Resistance among *Streptococcus agalactiae* strains isolated from Clinical Samples in Tehran, Iran. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2), 157–161.
- Faccione, D., Ialonardi, F., Abel, S., Machain, M., Errecalde, L., Littvik, A., ... Corso, A. (2010). Multiple-clones of *Streptococcus agalactiae* harbouring *lnuB* gene. *Journal of Infection in Developing Countries*, 4(9), 580–582. <http://doi.org/10.3855/jidc.941>
- Farley, M. M. (2001). Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin.Infect.Dis.*, 33(1058-4838 (Print)), 556–561. <http://doi.org/10.1086/322696>

- Fernández Olmos, A., García de la Fuente, C., Saéz Nieto, J. A., & Valdezate Ramos, S. (2010). *Metodos de Identificacion Bacteriana En El Laboratorio De Microbiología*. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Fiolo, K., Zanardi, C. E., Salvadego, M., Bertuzzo, C. S., Amaral, E., Calil, R., & Levy, C. E. (2012). Taxa de infecção e sorotipos de *Streptococcus agalactiae* em amostras de recém-nascidos infectados na cidade de Campinas (SP), Brasil. *Revista Brasileira de Ginecologia E Obstetrícia*, 34(12), 544–549. <http://doi.org/10.1590/S0100-72032012001200003>
- Florindo, C., Gomes, J. P., Rato, M. G., Bernardino, L., Spellerberg, B., Santos-Sanches, I., & Borrego, M. J. (2011). Molecular epidemiology of group B streptococcal meningitis in children beyond the neonatal period from Angola. *Journal of Medical Microbiology*, 60(9), 1276–1280. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.031674-0>
- Food and Drug Administration. (2011). *510(k) Substantial Equivalence Determination Decision Summary Instrument Only*. *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 510). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- García, D. alejandro., Mojica, M. E., Méndez, I. A., Pachón, D. P., Prieto, A. C., & Al., E. (2011). Prevalencia del *Streptococcus agalactiae* en maternas usuarias del Hospital Militar Central. Bogotá, (Colombia) año 2010. *Revista Colombiana de Obstetricia Y Ginecología*, v.62 n.4(4), 302–307. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74342011000400002&lng=es&nrm=iso
- Gase, K., Ferretti, J. J., Primeaux, C., & Mcshan, W. M. (1999). Identification, cloning, and

- expression of the CAMP factor gene (cfa) of group A streptococci. *Infection and Immunity*, 67(9), 4725–4731.
- Godoy, D. T., Carvalho-Castro, G. A., Leal, C. A. G., Pereira, U. P., Leite, R. C., & Figueiredo, H. C. P. (2013). Genetic diversity and new genotyping scheme for fish pathogenic *Streptococcus agalactiae*. *Letters in Applied Microbiology*, 57(6), 476–483. <http://doi.org/10.1111/lam.12138>
- Gómez Ortiz, L., & Ramírez Bazante, V. (2013). Prevalencia de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus agalactiae*, en pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra, año 2008.
- González, M. a., Caraballo, M. a., Guerrero, S. a., & Montenegro, S. O. (2006). Sepsis neonatal y prematuridad. *Rev Postgrado Via Cátedra de Medicina*, 160, 22–28. Retrieved from http://kinesio.med.unne.edu.ar/revista/revista160/6_160.htm
- Gosiewski, T., Brzychczy-Wloch, M., & Heczko, P. B. (2012). The application of multiplex PCR to detect seven different DNA targets in group B streptococci. *Folia Microbiologica*, 57(3), 163–167. <http://doi.org/10.1007/s12223-012-0108-7>
- Huber, C. A., McOdimba, F., Pflueger, V., Daubenberger, C. A., & Revathi, G. (2011). Characterization of invasive and colonizing isolates of *Streptococcus agalactiae* in East African adults. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(10), 3652–3655. <http://doi.org/10.1128/JCM.01288-11>
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2012). Boletín ISP, Vol.2, No.10. Junio 2012., 2(10), 1–20.

- Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2013). *Anuario de Estadísticas Vitales: Nacimientos y Defunciones 2013. Ecuador En Cifras*. <http://doi.org/2-930229-80-2>
- Jiménez Tobón, A. G., & Vélez Hoyos, A. (2015). Tinción de Gram de tejido: alcances y limitaciones. *ReserchGate*, 7(December), 557–573.
- Jiménez-Escrig, A., Gobernado, I., & Sánchez-Herranz, A. (2012). Secuenciación de genoma completo: Un salto cualitativo en los estudios genéticos. *Revista de Neurologia*, 54(11), 692–698.
- Ke, D., Ménard, C., Picard, F. J., Boissinot, M., Ouellette, M., Roy, P. H., & Bergeron, M. G. (2000). Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci. *Clin.Chem.*, 46(0009-9147 (Print)), 324–331.
- Kirch, W. (2008). *Encyclopedia of Public Health. 2 Vol.* (vol. 2). Springer Science & Business Media. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=eSPK7-CHw7oC&pgis=1>
- Koneman, E., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color.* (E. Koneman, Ed.). Ed. Médica Panamericana. <http://doi.org/9500608952,9789500608954>
- Kong, F., Gowan, S., Martin, D., James, G., & Gilbert, G. L. (2002). Serotype Identification of Group B Streptococci by PCR and Sequencing Serotype Identification of Group B Streptococci by PCR and Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1), 216–226. <http://doi.org/10.1128/JCM.40.1.216>
- Laczeski, M., Novosak, M., Quiroga, M., & Vergara, M. (2014). Primer estudio molecular

- de *Streptococcus agalactiae* serotipo V en Misiones, Argentina. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología*, 34(4), 132–139.
- Lara, M., García, D., & Barreales, A. (2013). Identificación rápida de cocos grampositivos en cadena en hemocultivos mediante técnicas de aglutinación de látex. *Rev Esp Quimioter*, 26, 76–77.
- Liébana-Martos, M. D. C., Cabrera-Alavargonzalez, J., Rodríguez-Granger, J., Miranda-Casas, C., Sampedro-Martínez, A., Gutiérrez-Fernández, J., ... Navarro-Marí, J. M. (2015). Serotypes and antibiotic resistance patterns in beta-hemolytic *Streptococcus agalactiae* isolates in colonized mothers and newborns with invasive disease. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 33(2), 84–88. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.02.023>
- Lopardo, H. a, Vidal, P., Jeric, P., Paganini, H., Facklam, R. R., Centron, D., ... Elliott, J. (2003). Six-Month Multicenter Study on Invasive Infections Due to Group B Streptococci in Argentina Six-Month Multicenter Study on Invasive Infections Due to Group B Streptococci in Argentina. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(10), 4688–4694. <http://doi.org/10.1128/JCM.41.10.4688>
- Lorkowski, S., & Cullen, P. M. (2006). *Analysing Gene Expression, A Handbook of Methods: Possibilities and Pitfalls*. John Wiley & Sons.
- Lucena, S., Arocha Piñango, C. L., & Guerrero, B. (2007). Fibronectina. Estructura y funciones asociadas a la hemostasia. Revisión. *Investigacion Clinica*, 48(2), 249–262.
- Macrogen. (2010). Macrogen Single Pass Sequencing Sample Submission Guide, 2009(0).

- Martínez T, M. A., Ovalle S, A., Durán T, C., Reid S, I., Urriola J, G., Garay G, B., & Cifuentes D, M. (2004). Serotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *Streptococcus agalactiae*. *Revista Médica de Chile*, 132(5), 549–555. <http://doi.org/10.4067/S0034-98872004000500003>
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. Componente Normativo Materno (2008). Retrieved from <http://www.prenatal.tv/lecturas/ecuador/2>. Componente Normativo Materno CONASA.pdf
- Moon, A. F., Gaudu, P., & Pedersen, L. C. (2014). Structural characterization of the virulence factor nuclease A from *Streptococcus agalactiae*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 70(11), 2937–2949. <http://doi.org/10.1107/S1399004714019725>
- Munari, F. M., De-Paris, F., Salton, G. D., Lora, P. S., Giovanella, P., Machado, A. B. M. P., ... Laurino, J. P. (2012). A combined enrichment/polymerase chain reaction based method for the routine screening of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 43(1), 253–260. <http://doi.org/10.1590/S1517-838220120001000029>
- Murray, P. R., Tenover, M. C., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenoer, P. C., & Rupp, M. E. (2007). *Manual of clinical microbiology*. American Society for Microbiology; 9th Edition edition (9 May 2007).
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Tenover, M. C. (2014). *Microbiología Médica* (7th ed.). Elsevier.
- Nakamura, P. A. M., Schuab, R. B. B., Neves, F. P. G., Pereira, C. F. A., Paula, G. R. de, &

- Barros, R. R. (2011). Antimicrobial resistance profiles and genetic characterisation of macrolide resistant isolates of *Streptococcus agalactiae*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(March), 119–122.
- Nasri, K., Chehrei, A., & Manavi, M. S. (2013). Evaluation of vaginal group B streptococcal culture results after digital vaginal examination and its pattern of antibiotic resistance in pregnant women. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 11(12), 999–1004. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3941399&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Nitschke, H., Slickers, P., Müller, E., Ehricht, R., & Monecke, S. (2014). DNA microarray-based typing of *Streptococcus agalactiae* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(11), 3933–3943. <http://doi.org/10.1128/JCM.02411-14>
- Nuccitelli, A., Rinaudo, C. D., & Maione, D. (2015). Group B *Streptococcus* vaccine: state of the art. *Therapeutic Advances in Vaccines*, 3(3), 76–90. <http://doi.org/10.1177/2051013615579869>
- Okitsu, N., Kaieda, S., Yano, H., Nakano, R., Hosaka, Y., Okamoto, R., ... Inoue, M. (2005). Characterization of ermB Gene Transposition by Tn 1545 and Tn 917 in Macrolide-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates. *J Clin Microbiol.*, 43(1), 168–173. <http://doi.org/10.1128/JCM.43.1.168>
- Organización Mundial de la Salud. (2015). Recomendaciones de la OMS para la prevención y el tratamiento de las infecciones maternas en el periparto. *WHO*, 16(01), 1–5.
- Organización Mundial de Salud. (2015). *Resistencia a los antimicrobianos*. Organización

Mundial de Salud. World Health Organization. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>

Oviedo, P., Pegels, E., Laczeski, M., Quiroga, M., & Vergara, M. (2013). Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. First study in a province of Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology*, *44*(1), 253–258. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000030>

Oyanguren, B., Navas, E., Quereda, C., Corral, I., Esteban, L., Guillána, M., ... Alonso Cánovasa, A. (2015). Afectación del sistema nervioso central en la infección invasiva por, 158–162. <http://doi.org/10.1016/j.nrl.2013.12.002>

Paterson, D. L., & Kim, B. (2009). *Antimicrobial Drug Resistance*. <http://doi.org/10.1007/978-1-60327-595-8>

Perez, L. R. R., Caierão, J., Antunes, A. L. S., & d'Azevedo, P. A. (2007). Use of the D test method to detect inducible clindamycin resistance in coagulase negative staphylococci (CoNS). *The Brazilian Journal of Infectious Diseases : An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, *11*(2), 186–8. <http://doi.org/10.1590/S1413-86702007000200002>

Poisson, D.-M., Evrard, M.-L., Freneaux, C., Vivés, M.-I., & Mesnard, L. (2011). Evaluation of CHROMagar StrepB agar, an aerobic chromogenic medium for prepartum vaginal/rectal Group B *Streptococcus* screening. *Journal of Microbiological Methods*, *84*, 490–291. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.01.014>

Promega Corporation. (2014). Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. *Vacuum*, 1–12. <http://doi.org/A9282>

- Puopolo, K. M., & Madoff, L. C. (2007). Type IV neonatal early-onset group B streptococcal disease in a United States hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(4), 1360–1362. <http://doi.org/10.1128/JCM.02487-06>
- Reece, E. A., & Hobbins, J. C. (2010). *Obstetricia clinica / Clinical Obstetrics*. Ed. Médica Panamericana. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=RS11QMxGgA8C&pgis=1>
- Regali, N., Pegels, E., Oviedo, P., Quiroga, M., & Vergara, M. (2010). Estudio comparativo de sangre de diversos orígenes para el aislamiento e identificación de *Streptococcus agalactiae*, 14–18.
- Reza Reguero, T. M. (2014). La secuenciación del ADN: consideraciones históricas y técnicas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XVI(1), 5–8.
- Sadowy, E., Matynia, B., & Hryniewicz, W. (2010). Population structure, virulence factors and resistance determinants of invasive, non-invasive and colonizing *Streptococcus agalactiae* in Poland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(9), 1907–1914. <http://doi.org/10.1093/jac/dkq230>
- Salvador, R., CS, T., & JRE, M. (2012). Inflammatory responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*: effects of vaccination and yeast diet supplement . *Diseases of Aquatic Organisms*, 98(3), 235–241. Retrieved from <http://www.int-res.com/abstracts/dao/v98/n3/p235-241/>
- Société Francaise de Microbiologie. (2013). Comité de l'antibiogramme de la Societé Française de Microbiologie Recommandations 2013. *Comité De L'Antibio*, 2012(en 2012).

- Stevens, D., & Kaplan, E. (2009). *Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis*. (D. L. Stevens & E. L. Kaplan, Eds.) (illustrate). Oxford University Press, 2000. <http://doi.org/10.1007/978-0-387-09843-2>
- Steward, C. D., Raney, P. M., Morrell, A. K., Williams, P. P., Mcdougal, L. K., Jevitt, L., ... Mcgowan, J. E. (2005). Testing for Induction of Clindamycin Resistance in Erythromycin-Resistant Isolates of *Staphylococcus aureus* Testing for Induction of Clindamycin Resistance in Erythromycin-Resistant Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4), 1716–1721. <http://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1716>
- Stoll, B. J., Hansen, N. I., Sánchez, P. J., Faix, R. G., Poindexter, B. B., Van Meurs, K. P., ... Higgins, R. D. (2011). Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and *E. coli* disease continues. *Pediatrics*, 127(5), 817–26. <http://doi.org/10.1542/peds.2010-2217>
- Swedish University of Agricultural Sciences. (2015). VetBact. Retrieved June 7, 2016, from <http://www.vetbact.org/vetbact/?artid=16>
- Tenorio, T., & Viteri, M. (2009). *Prevalencia de Streptococcus agalactiae* en mujeres gestantes entre 35-37 semanas. Universidad del Azuay.
- Tibbs, C., & Creighton, J. (2013). comparison of four commercial chromogenic media and blood agar for the isolation and preliminary identification of *Streptococcus agalactiae* from vaginal swabs, (1), 2–5.
- Turnidge, J., & Paterson, D. L. (2007). Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 391–408.

<http://doi.org/10.1128/CMR.00047-06>

Ulett, G. C., Webb, R. I., Ulett, K. B., Cui, X., Benjamin, W. H., Crowley, M., & Schembri, M. a. (2010). Group B Streptococcus (GBS) urinary tract infection involves binding of GBS to bladder uroepithelium and potent but GBS-specific induction of interleukin 1alpha. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(6), 866–870. <http://doi.org/10.1086/650696>

Villar, H. E., & Jugo, M. B. (2013a). [Emergence of high-level resistance to gentamicin and streptomycin in *Streptococcus agalactiae* in Buenos Aires, Argentina]. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 26(May 2016), 112–115.

Villar, H. E., & Jugo, M. B. (2013b). Emergencia de *Streptococcus agalactiae* con resistencia de alto nivel a gentamicina y estreptomycin en Buenos Aires, Argentina. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 26(2), 112–115.

Villar, H. E., Jugo, M. B., Estevez, R., & Baserni, M. N. (2014). Elevada prevalencia de *Streptococcus agalactiae* resistente a eritromicina , clindamicina y fluoroquinolonas High prevalence of resistance to erythromycin , clindamycin and fluoroquinolones in *Streptococcus agalactiae*. *Rev. Panam. Infectol*, 16(3), 137–141.

Villegas, V. E., Sánchez, M. C., & Chuaire, L. (2009). Reacción en cadena de la polimerasa y diagnóstico molecular. *Colombia Medica*, 40(3), 347–352.

Viracachá, N., Barajas, C., & Báez, M. (2011). Enfermedad neonatal temprana por *streptococcus agalactiae* en una unidad de recién nacidos, factores de riesgo materno-fetales asociados a severidad y mortalidad. *Revista Ciencias de La Salud*, 9(3), 39–46.

Weston, E. J., Pondo, T., Lewis, M. M., Martell-cleary, P., Morin, C., Jewell, B., ... Schrag, S. J. (2012). The Burden of Invasive Early-Onset Neonatal Sepsis in the United States, 2005–2008. *Pediatr Infect Dis J.*, 30(11), 937–941.
<http://doi.org/10.1097/INF.0b013e318223bad2>.The

Zurita, J. (2012). Resistencia Bacteriana en el Ecuador.

10.ANEXOS

Anexo 1: Identificación de *Streptococcus agalactiae*

Procedimiento:

- Día uno
 - Sembrar las cepas en agar base sangre de cordero realizando un estriado adecuado para obtener cepas aisladas y puras. Figura 10
 - Incubar las cajas Petri a una temperatura de 35° a 37°C durante 18 a 24 horas en una cámara con un ambiente de CO₂ al 5%.

- Día dos
 - Revisar que las colonias que posean una beta hemólisis se encuentren aisladas y puras; de no estarlo realizar una resiembra en otra caja de agar base sangre de cordero.
 - A las colonias beta hemolítica se les realizará la prueba de catalasa. Esta prueba se la realiza inoculando la colonia con un asa estéril en una gota de peróxido de hidrógeno. Un resultado positivo será la producción de burbujas.
 - Las colonias que posean un resultado negativo en la prueba de catalasa se procederá a:
 - Sembrarlas en un el agar base sangre de cordero para posteriormente colocar el disco de bacitracina de 0.04U.

- Inocular una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de manera que se forme una línea vertical en la caja de agar sangre de cordero. Posteriormente, sembrar la colonia a identificar formando una línea perpendicular a la cepa ATCC con una separación de 3 a 4mm (Murray et al., 2007).
 - Incubar estas cajas Petri a una temperatura de 35° a 37°C durante 18 a 24 horas en una cámara con un ambiente de CO₂ al 5%.
- Día tres
 - Revisar la prueba de sensibilidad a la bacitracina de 0.04U. La bacteria *Streptococcus agalactiae* mostrará resistencia hacia este antibiótico, por lo que no se evidenciará un halo de inhibición.
 - Verificar la formación del factor CAMP (hemólisis en forma de flecha) de la cepa de *Streptococcus agalactiae* frente a la cepa de *Staphylococcus aureus*.
 - Registrar de manera escrita (base de datos en Excel) y fotográfica los resultados obtenidos. ANEXO
 - Las cepas que posean tanto la resistencia a la bacitracina como un factor de CAMP positivo se procederá a:
 - Preservarlas en los criotubos como se indica en el Anexo 2.
 - Realizar el respectivo antibiograma como lo indica el Anexo 3.

Anexo 2: Preservación en criotubos

Procedimiento de preparación del caldo BHI + glicerol al 20%

Para la elaboración de este medio se debe preparar el caldo de infusión cerebro-corazón, BHI por sus siglas en inglés (Brain-Heart Infusion) de acuerdo a las especificaciones del fabricante con la modificación de que se agregará glicerol para obtener una concentración final del 20% de este componente. Es así que si se necesita preparar 100ml de esta solución se deberá colocar en una botella para esterilización con tapa rosca:

Tabla 5: Cantidades usadas para realización de crioviales. La tabla muestra las cantidades necesarias de cada reactivo para la preparación de 100ml de caldo BHI + glicerol al 20%.

Reactivo	Cantidad
BHI	3.7 gr
Agua destilada	80 ml
Glicerol	20 ml

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ

- Mezclar bien todos los componentes y llevar a ebullición para disolverlos completamente.
- Dispensar 1.5ml de medio en los criotubos y dejarlos semitapados.
- Esterilizar los tubos durante 15 minutos a una temperatura de 120°C y con 15 libras de presión, se utiliza una cinta testigo como control de esterilidad.

Anexo 3: Tabla 6: Tabla de recolección de datos de las muestras de *Streptococcus agalactiae* estudiadas. La tabla muestra los diferentes datos que se obtuvieron de las cepas de *Streptococcus agalactiae* incluidas en este estudio.

Código	Muestra	Fecha registro	Procedencia	Género	Edad	Hemólisis	Catalasa	Gram	CAMP	Bacitracina
GBS001	Secreción vaginal	09/09/2015	QUITO	F	38 a	B	N	CGP	P	Resistente
GBS003	Semen	01/08/2011	QUITO	M	44 a	B	N	CGP	P	Resistente
GBS004	Herida	03/09/2015	QUITO	M	38 a	B	N	CGP	P	Resistente
GBS005	Sangre	03/09/2015	QUITO	M	38 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS006	Semen	01/11/2011	QUITO	M	34 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS007	Semen	01/08/2011	QUITO	M	40 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS009	Secreción vaginal	01/12/2011	QUITO	F	53 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS010	Secreción vaginal	01/08/2011	PUYO	F	51 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS011	Orina	01/07/2011	QUITO	F	21a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS014	Orina	01/09/2011	QUITO	M	22 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS016	Orina	09/11/2010	QUITO	F	25 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS018	Orina	08/03/2012	QUITO	F	54 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS021	Orina	19/09/2012	QUITO	F	24 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS022	Orina	08/02/2011	QUITO	F	34 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS023	Orina	24/02/2012	QUITO	F	37 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS024	Orina	04/05/2012	QUITO	F	24 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS025	Orina	17/05/2010	QUITO	F	59 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS029	Orina	03/05/2012	QUITO	F	54 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS031	Orina	03/05/2012	QUITO	F	36 m	β	N	CGP	P	Resistente

GBS032	Secreción de pene	26/01/2016	QUITO	M	28 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS033	Secreción vaginal	05/06/2009	QUITO	F	25 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS034	Orina	18/12/2009	QUITO	F	26 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS036	Orina	18/12/2009	QUITO	F	18 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS037	Semen	25/04/2014	QUITO	M	26 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS041	Orina	13/05/2013	QUITO	F	35 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS042	Orina	23/04/2012	QUITO	F	20 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS043	Orina	24/07/2013	QUITO	F	22 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS045	Orina	20/09/2013	QUITO	F	24 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS046	Orina	20/09/2013	QUITO	F	23 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS047	Orina	11/04/2012	QUITO	F	39 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS048	Semen	05/01/2014	QUITO	M	54 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS050	Semen	09/01/2014	QUITO	M	18 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS051	Semen	06/08/2012	QUITO	M	97 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS053	Orina	05/10/2012	QUITO	F	12 m	β	N	CGP	P	Resistente
GBS054	Orina	05/10/2012	QUITO	F	20 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS055	Orina	05/10/2012	QUITO	F	92 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS057	Úlceras de glande	30/10/2007	QUITO	M	40 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS058	Orina	08/08/2013	QUITO	F	45 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS060	Orina	28/02/2014	QUITO	M	67 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS063	Lavado prepucial	13/06/2014	QUITO	M	45 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS066	Orina	02/07/2009	QUITO	F	29 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS067	Orina	19/10/2007	QUITO	F	22 a	β	N	CGP	P	Resistente

GBS068	Orina	17/06/2009	QUITO	F	26 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS069	Semen	05/02/2016	QUITO	M	33 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS071	Orina	10/02/2016	QUITO	M	22a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS072	Secreción vaginal	06/02/2016	QUITO	F	35 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS073	Líquido peritoneal	06/02/2016	QUITO	M	70 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS074	Semen	12/02/2016	QUITO	M	44 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS075	Secreción vaginal	12/02/2016	QUITO	F	38 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS076	Orina	22/02/2016	QUITO	F	34 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS077	Secreción vaginal	25/02/2016	QUITO	F	35 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS078	Orina	25/02/2016	QUITO	F	13 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS079	Orina	24/02/2016	QUITO	F	33 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS080	Secreción vaginal	27/02/2016	QUITO	F	24 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS082	Semen	10/03/2016	QUITO	M	34 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS083	Secreción vaginal	18/03/2016	QUITO	F	42 a	β	N	CGP	P	Resistente
GBS084	Orina	22/03/2016	QUITO	F	24 a	β	N	CGP	P	Resistente

F: femenino. M: masculino. N: negativo. CGP: cocos Gram positivos. P: positivo

Fuente: Cepas pertenecientes al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI)

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ

Anexo 4: Protocolo del antibiograma (método de difusión de discos)

- Día uno
 - De las colonias previamente identificadas, tomar con el asa y colocar en un tubo estéril con solución salina al 0.9% y ajustar hasta una escala del 0.5 McFarland con la ayuda de un turbidímetro.
 - Con un hisopo estéril se lo empapa con la solución obtenida se lo escurre en los bordes del tubo se procede a estriar en por toda la caja en 3 direcciones (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012).
 - Dejar que se sequen las cajas por alrededor de unos 10-15 minutos, sin sobrepasar este tiempo.
 - Colocar los discos de antibióticos (P, CTX, E, DA, CIP, LEV) de la siguiente manera (tomando en cuenta la disposición de los discos de eritromicina y clindamicina como lo determina el Anexo 5):

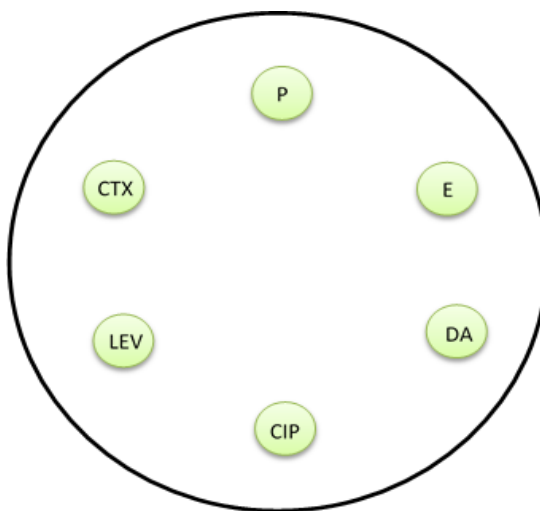


Figura 4: Posicionamiento de discos. La figura muestra la disposición de los discos de antibióticos utilizados para la realización del antibiograma.

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ

- Incubar una temperatura de 35° a 37°C durante 18 a 24 horas en una cámara con un ambiente de CO₂ al 5%.
- Día dos:
 - Medir el diámetro de los halos de inhibición.
 - Verificar la presencia del fenotipo de test en D como lo muestra el Anexo 5.
 - Registrar los datos obtenidos.

Anexo 5: Observación Test en D

Fundamento:

Existen algunas cepas de bacterias gram positivas que contienen genes que codifican la resistencia a antibióticos de las familias de macrólidos, lincosamidas y estreptogramidas del tipo B conocidas como MLS_B. La resistencia a los antibióticos de tipo macrólidos como lo es la eritromicina, puede ocurrir por la alteración del ribosoma debido al gen *erm*, (erythromycin ribosome methylase) por sus siglas en inglés. Esta modificación del blanco altera al sitio 23S del rRNA (usualmente donde se unen los antibióticos de tipo MLS_B) y puede conferir una resistencia cruzada. La expresión de este fenotipo puede ser constitutiva (MLS_{Bc}) o bien, inducible (MLS_{Bi}). La diferencia fenotípicamente se puede demostrar cuando es de forma constitutiva por la resistencia a todos los antibióticos del grupo MLS_B; mientras que, si es inducible, la resistencia se da solo frente a macrólidos de 14 o 15 átomos (Perez et al., 2007; Steward et al., 2005).

Procedimiento:

- Realizar el antibiograma según el procedimiento determinado en el Anexo 3.
- Al momento de disponer los discos de eritromicina (15µg) y clindamicina (2µg) colocarlos con una separación de 12mm medido de borde a borde para permitir el espacio de la zona D (Centers for Disease Control and Prevention, 2010).
- Incubar la caja a una temperatura entre 35° a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ durante 20-24 horas.
- Al siguiente día se podrá observar el resultado:

- Positivo: si no existe halo de inhibición en el disco de eritromicina (resistente) y a su vez, se muestra un halo en forma de “D” en la zona de inhibición del disco de clindamicina en la parte que se encuentra junto al disco de eritromicina. Este resultado indica la inducción de resistencia a clindamicina por la difusión del antibiótico eritromicina y se presume que la cepa es resistente a la clindamicina.
 - Negativo: si no se observa la forma en “D” en el halo de inhibición del disco de clindamicina.
- Registrar el resultado en la base de datos.

Anexo 6: Algoritmo recomendado para la profilaxis de pacientes embarazadas y la prevención de las enfermedades de inicio temprano (EOS) por GBS

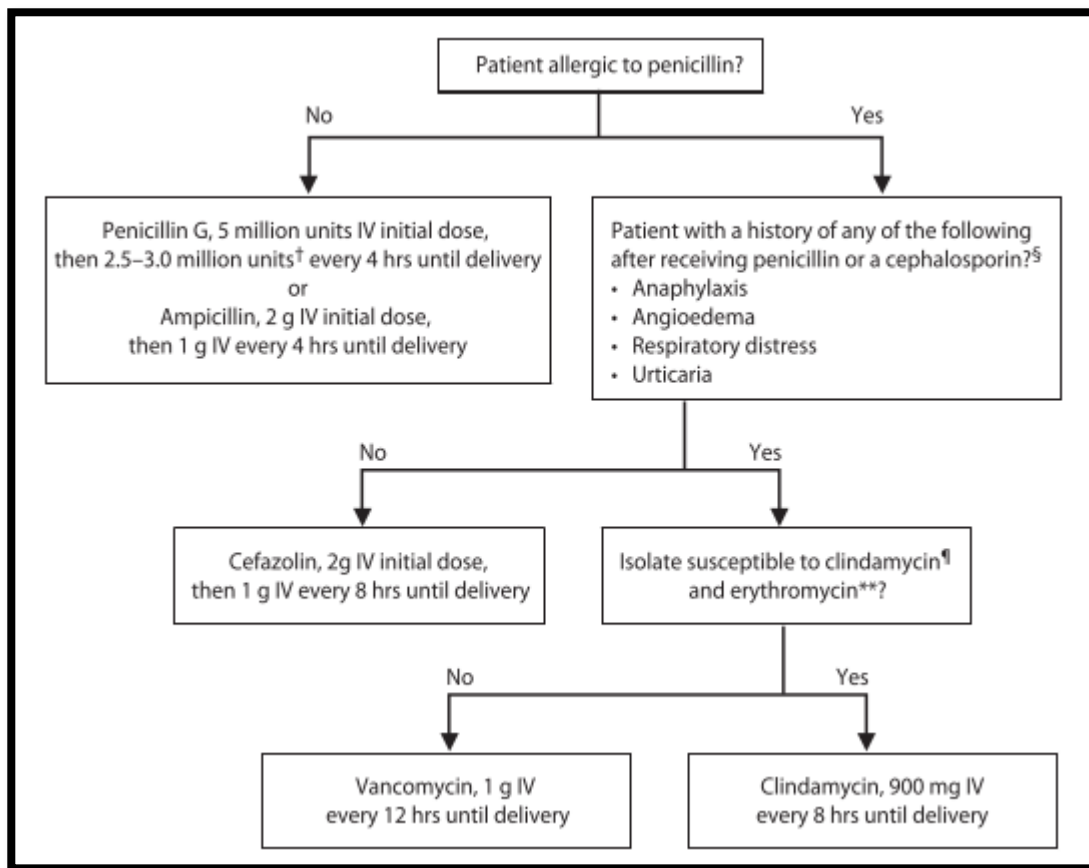


Figura 5: Algoritmo recomendado para la profilaxis de pacientes embarazadas. La figura presenta el algoritmo que recomienda el CLSI para la profilaxis antibiótica de las pacientes embarazadas.

Abreviaciones: IV=intravenoso. *agentes de amplio espectro que pueden ser necesarios para el tratamiento en la corioamnionitis por GBS. † Dosis que van entre 2.5 a 3 millones de unidades que son aceptables en administración de cada 4 horas seguida de la dosis inicial. §Los pacientes con historial de anafilaxis, angiodemas, estrés respiratorio o urticaria después de la administración de penicilina o cefalosporinas, tienen un alto riesgo de presentar anafilaxis por lo que no deben recibir penicilina, ampicilina, cefazolina. ¶Si las facilidades son las adecuadas, probar la sensibilidad a eritromicina y clindamicina. **La resistencia a eritromicina es usual pero no siempre está ligada a resistencia hacia la clindamicina, por lo que si un aislado es resistente a eritromicina puede dar resistencia inducida a clindamicina así parezca susceptible a ésta.

Fuente: (Centers for Disease Control and Prevention, 2010, p. 21)

Anexo 7: Tabla 7: Diámetros de los halos de inhibición de los antibióticos utilizados de los antibiogramas de las cepas de *Streptococcus agalactiae*. La tabla muestra las mediciones del diámetro de los halos de inhibición de las cepas estudiadas y a su vez, exhibe aquellas cepas que presentan un test en “D” positivo.

Código de la cepa	Diámetro de los halos de inhibición (mm)						Observaciones
	E	DA	LEV	CIP	P	CTX	
GBS 001	26	25	21	22	24	32	
GBS 003	25	23	22	23	24	30	
GBS 004	25	21	22	24	24	28	
GBS 005	28	24	22	24	24	30	
GBS 006	6	6	6	6	26	32	
GBS 007	30	25	25	25	25	34	
GBS 009	26	26	24	25	24	30	
GBS 010	26	24	25	25	26	32	
GBS 011	25	21	24	24	24	31	
GBS 014	26	24	21	22	24	30	
GBS 016	27	25	20	19	26	36	
GBS 018	28	26	20	22	24	32	
GBS 021	25	21	22	24	24	30	
GBS 022	6	6	22	22	26	34	
GBS 023	25	6	22	25	26	32	
GBS 024	23	22	22	24	24	30	
GBS 025	6	6	6	6	26	32	
GBS 029	30	26	6	6	28	31	
GBS 031	26	26	20	22	27	28	
GBS 032	6	6	6	6	25	36	
GBS 033	26	22	22	24	26	30	
GBS 034	28	26	20	23	25	30	
GBS 036	24	22	22	22	26	30	
GBS 037	31	26	22	25	28	34	
GBS 041	16	25	20	22	27	34	
GBS 042	26	24	21	23	25	31	
GBS 043	26	23	23	22	28	34	
GBS 045	25	24	22	21	24	31	
GBS 046	27	24	25	24	25	32	
GBS 047	23	21	19	18	25	27	
GBS 048	28	25	25	27	29	36	
GBS 050	27	11	12	6	25	34	
GBS 051	30	28	23	23	26	34	
GBS 053	6	6	6	6	28	35	
GBS 054	26	24	22	25	25	30	
GBS 055	29	25	23	24	24	30	
GBS 057	28	12	21	27	26	33	

GBS 058	6	6	6	6	27	34	
GBS 060	27	26	22	25	27	33	
GBS 062	6	6	6	6	28	35	
GBS 063	26	25	22	25	25	32	
GBS 067	26	23	21	23	24	28	
GBS 068	30	26	20	23	27	37	
GBS 069	28	11	6	6	25	34	
GBS 071	6	6	20	22	24	30	test en D positivo
GBS 072	30	26	20	25	25	32	
GBS 073	6	10	24	25	26	32	
GBS 074	27	24	22	22	25	34	
GBS 075	26	24	23	26	26	34	
GBS 076	27	24	23	24	26	36	
GBS 077	25	24	21	25	24	32	
GBS 078	26	25	6	6	24	31	
GBS 079	10	6	21	26	26	32	test en D positivo
GBS 080	25	24	21	23	24	30	
GBS 082	6	6	22	27	26	32	
GBS 083	11	6	22	25	25	34	
GBS 084	31	30	23	24	28	36	

E: eritromicina, DA: clindamicina, LEV; levofloxacin, CIP: ciprofloxacina, P: penicilina G, CTX: cefotaxima.

Puntos de corte tomados del CLSI 2015 de: eritromicina: S: ≥ 21 ; I: 16-20; R: ≤ 15 . Clindamicina: S: ≥ 19 ;

I: 16-18; R: ≤ 15 . Levofloxacin: S: ≥ 17 , I: 14-16, R: ≤ 13 . Ciprofloxacina: S: ≥ 21 ; I: 16-20; R: ≤ 15 .

Penicilina G: S: ≥ 24 . Cefotaxima: S: ≥ 24

Fuente: Cepas pertenecientes al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI)

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ

Anexo 8: Protocolo de extracción de DNA

- Realizar una suspensión bacteriana turbia o bien cargada colocando una buena asada de la bacteria en un tubo tipo eppendorf de 1.5ml adecuadamente rotulado que contenga por lo menos 500uL de agua bidestilada.
- En un termobloque, colocar los tubos eppendorf con las suspensiones bacterianas y configurarlo a una temperatura de 100°C y con una agitación constante de 1000 rpm durante 10 minutos.
- Dejar enfriar los tubos.
- Centrifugar los tubos durante 1 minuto a 14000 rpm.
- Cuidadosamente, sacar los tubos de la centrífuga y pasar el sobrenadante (contiene el DNA) a un nuevo tubo eppendorf bien rotulado utilizando una pipeta.
- Desechar el pellet.
- Almacenar a -20°C.

(Adwan, 2014; Capocéfalo, Ridley, & Tranfield, 2016)

Anexo 9: Protocolo de PCR para genes *cfb*, *atr*

- Preparar los materiales y reactivos necesarios para la realización de la PCR. Someter a fuente de luz UV, la cámara de flujo laminar en la cual se trabajará, así como los materiales a utilizar. La preparación de los reactivos se realiza como se muestra en la

- Tabla 8: MasterMix para la detección del *gen* de identificación *cfb* y la Tabla 9: MasterMix para la detección del *gen* de identificación *atr*.

- Para el DNA bacteriano:
 - Se puede preparar una suspensión bacteriana turbia en tubos tipo eppendorf que contengan agua de tipo molecular con un volumen de 500uL.
 - O, el DNA previamente extraído según el protocolo mencionado en el Anexo 8.

- Mezclar los reactivos necesarios para preparar la MasterMix dependiendo del número de reacciones a utilizar como muestra la Tabla 8: MasterMix para la detección del *gen* de identificación *cfb* y la Tabla 9: MasterMix para la detección del *gen* de identificación *atr*

- Dispensar el volumen adecuado en los tubos de reacción.

- Seguido, colocar 1uL del DNA bacteriano en los tubos de reacción para llegar al volumen final de 25uL.

Tabla 8: MasterMix para la detección del gen de identificación *cfb*. La tabla muestra las cantidades necesarias para la realización de la PCR del gen *cfb* para un total de 57 reacciones.

PCR para identificación de <i>Streptococcus agalactiae</i> (<i>cfb</i>)				
			Número de reacciones: 57	
			Volumen final: 25uL	
Reactivos	Concentración inicial	Concentración de trabajo	Volumen por reacción (uL)	Volumen en Master Mix (uL)
GoTaq MASTER MIX	2X	0.88uM	11	627
<i>cfb</i>-F	10uM	0.4uM	1	57
<i>cfb</i>-R	10uM	0.4uM	1	57
Agua molecular	--	--	11	627
Volumen Total	--	--	24	
DNA			1	

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ

Tabla 9: MasterMix para la detección del gen de identificación *atr*. La tabla muestra las cantidades necesarias para la realización de la PCR del gen *atr* para un total de 57 reacciones

PCR para identificación de <i>Streptococcus agalactiae</i> (<i>atr</i>)				
			Número de reacciones: 57	
			Volumen final: 25uL	
Reactivos	Concentración inicial	Concentración de trabajo	Volumen por reacción (uL)	Volumen en Master Mix (uL)
GoTaq MASTER MIX	2X	0.88uM	11	627
<i>atr</i>-F	10uM	0.4uM	1	57
<i>atr</i>-R	10uM	0.4uM	1	57
Agua molecular	--	--	11	627
Volumen Total	--	--	24	
DNA			1	

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ

- Colocar los tubos de reacción en el termociclador siguiendo las siguientes condiciones:

Tabla 10: Condiciones para termociclado genes *cfb* y *atr*. La tabla muestra las condiciones necesarias para el termociclado de los genes *cfb* y *atr* tanto para la denaturación, hibridación, elongación.

Condiciones para termociclado genes <i>cfb</i> y <i>atr</i>		
Temperatura (°C)		Tiempo
94		1 minuto
94] 35 ciclos	1 minuto
54		45 segundos
72		1 minuto
72		10 minutos

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ

Anexo 10: Protocolo de PCR para genes *ermA*, *ermB*, *lnuB*

- Preparar los materiales y reactivos necesarios para la realización de la PCR. Someter a fuente de luz UV, la cámara de flujo laminar en la cual se trabajará, así como los materiales a utilizar. La preparación de los reactivos se realiza como se muestra en la Tabla 11: MasterMix para la detección del gen de resistencia *ermA* así como la Tabla 12: MasterMix para la detección del gen de resistencia *ermB* y la Tabla 13: MasterMix para la detección del gen de resistencia *lnuB*.
- Para el DNA bacteriano:
 - Se puede preparar una suspensión bacteriana turbia en tubos tipo eppendorf que contengan agua de tipo molecular con un volumen de 500uL.
 - O, el DNA previamente extraído según el protocolo mencionado en el Anexo 8.
- Mezclar los reactivos necesarios para preparar la MasterMix dependiendo del número de reacciones a utilizar como muestra la Tabla 11: MasterMix para la detección del gen de resistencia *ermA*, así como la Tabla 12: MasterMix para la detección del gen de resistencia *ermB* y la Tabla 13: MasterMix para la detección del gen de resistencia *lnuB*.
- Dispensar el volumen adecuado en los tubos de reacción.
- Seguido, colocar 1uL del DNA bacteriano en los tubos de reacción para llegar al volumen final de 25uL.

Tabla 11: MasterMix para la detección del gen de resistencia *ermA*. La tabla muestra las cantidades necesarias para la realización de la PCR del gen *ermA* para un total de 18 reacciones

PCR de resistencia de <i>Streptococcus agalactiae</i> (<i>ermA</i>)				
			Número de reacciones: 18	
			Volumen final: 25uL	
Reactivos	Concentración inicial	Concentración de trabajo	Volumen por reacción (uL)	Volumen en Master Mix (uL)
GoTaq MASTER MIX	2X	0.88uM	11	198
<i>ermA</i> -F	10uM	0.4uM	1	18
<i>ermA</i> -R	10uM	0.4uM	1	18
Agua molecular	--	--	11	198
Volumen Total	--	--	24	
DNA			1	

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ

Tabla 12: MasterMix para la detección del gen de resistencia *ermB*. La tabla muestra las cantidades necesarias para la realización de la PCR del gen *ermB* para un total de 18 reacciones

PCR de resistencia de <i>Streptococcus agalactiae</i> (<i>ermB</i>)				
			Número de reacciones: 18	
			Volumen final: 25uL	
Reactivos	Concentración inicial	Concentración de trabajo	Volumen por reacción (uL)	Volumen en Master Mix (uL)
GoTaq MASTER MIX	2X	0.88uM	11	198
<i>ermB</i> -F	10uM	0.4uM	1	18
<i>ermB</i> -R	10uM	0.4uM	1	18
Agua molecular	--	--	11	198
Volumen Total	--	--	24	
DNA			1	

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ

Tabla 13: MasterMix para la detección del gen de resistencia *lnuB*. La tabla muestra las cantidades necesarias para la realización de la PCR del gen *lnuB* para un total de 18 reacciones

PCR de resistencia de <i>Streptococcus agalactiae</i> (<i>lnuB</i>)				
			Número de reacciones: 18	
			Volumen final: 25uL	
Reactivos	Concentración inicial	Concentración de trabajo	Volumen por reacción (uL)	Volumen en Master Mix (uL)
GoTaq MASTER MIX	2X	0.88uM	11	198
<i>lnuB</i> -F	10uM	0.4uM	1	18
<i>lnuB</i> -R	10uM	0.4uM	1	18
Agua molecular	--	--	11	198
Volumen Total	--	--	24	
DNA			1	

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ

- Colocar los tubos de reacción en el termociclador siguiendo las siguientes condiciones:

Tabla 14: Condiciones para termociclado genes *ermA* y *ermB*. La tabla muestra las condiciones necesarias para el termociclado de los genes *ermA* y *ermB* tanto para la denaturación, hibridación, elongación.

Condiciones para termociclado genes <i>ermA</i> y <i>ermB</i>			
Temperatura (°C)			Tiempo
94			1 minuto
94	} 35 ciclos		1 minuto
52			45 segundos
72			1 minuto
72			10 minutos

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ

Tabla 15: Condiciones para termociclado gen *lnuB*. La tabla muestra las condiciones necesarias para el termociclado del gen *lnuB* tanto para la denaturación, hibridación, elongación.

Condiciones para termociclado gen <i>lnuB</i>			
Temperatura (°C)			Tiempo
94			5 minuto
94	} 35 ciclos		45 segundos
54			45 segundos
72			1 minuto
72			5 minutos

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ

Anexo 11: Protocolo de purificación mediante la utilización del Kit de purificación Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega

- Añadir 375 ml de etanol al 95% al contenido del frasco de “Membrane Wash”.
- Colocar en un tubo tipo eppendorf, volúmenes iguales del amplicón y de la solución “Membrane Binding”, en este caso 20uL del amplicón + 20uL de solución “Membrane Binding”.
- Colocar el volumen total de cada muestra (40uL) a una columna que se encontrará dispuesta en un tubo colector de 1.5ml. Se debe incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
- Centrifugar los tubos durante 1 minuto a 14 000 rpm. Decantar el residuo del tubo colector de cada muestra.
- Añadir 700uL de la solución “Membrane Wash” a la columna de cada muestra.
- Centrifugar por 1 minuto a 14 000 rpm. Decantar el residuo del tubo colector de cada muestra.
- Colocar 500uL de “Membrane Wash” en cada columna.
- Centrifugar por 5 minutos a 14 000 rpm. Decantar el residuo del tubo colector de cada muestra.
- Centrifugar por 1 minuto más a 14 000rpm para evaporar todo el etanol de residuo.
- Transferir las columnas a tubos eppendorf de 1.5ml debidamente rotulados.
- Añadir 50uL de “Free nuclease water”, en la columna sin tocar la membrana con la punta de la pipeta. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
- Centrifugar durante 1minuto a 14 000 rpm.
- Desprender la columna y el sobrenadante es el DNA purificado, el cual se deberá almacenar a una temperatura de +4°C o -20°C.

(Promega Corporation, 2014)

Anexo 12: Protocolo de preparación y envío de muestras para secuenciación a la empresa MACROGEN

- Crear un documento en EXCEL-97, el cual será la base de datos que contendrá los códigos rotulados en los tubos transportadores del producto de PCR amplificado y purificado según el protocolo del Anexo 11, además se ingresarán las secuencias de los primers Forward y Reverse de cada gen.
- Ingresar a la página web de la empresa MACROGEN en el link: http://dna.macrogen.com/eng/order/ces/std/s_new_step1.jsp donde se podrá llenar el formulario destinado para el tipo de orden.
- Importar la base de datos creada en Excel-97.
- Revisar que el contenido sea el correcto, tanto en número de muestras para la secuenciación, los primers, las secuencias en la opción Revisar que muestra la página.
- La empresa FEDEX es la encargada de realizar el del paquete de muestras el cual debe contener los amplicones purificados colocados en tubos de 1.5ml como ya se mencionó antes. Además, los tubos deben ser rotulados con la codificación de cada muestra y el gen en la tapa del tubo; cabe mencionar que los tubos deberán estar sellados con parafilm. En el paquete se colocará la orden generada impresa.
(Macrogen, 2010)
- La siguiente imagen es la orden de envío de los productos de la PCR del gen *ermB* amplificados en este estudio:

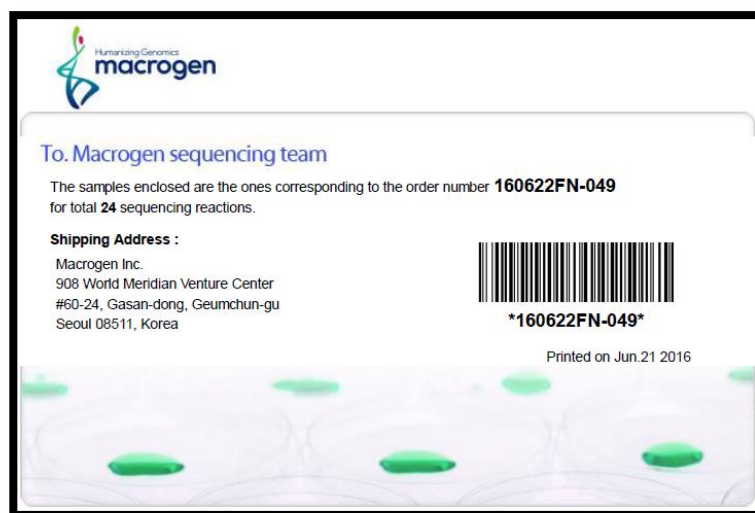


Figura 6: Orden de envío. La figura muestra la orden de envío a Macrogen para la secuenciación del gen *ermB* de las cepas de *Streptococcus agalactiae* que amplificaron el gen antes mencionado.

Anexo 13: Tabla 16: Correlación entre el perfil de resistencia de cepas de *Streptococcus agalactiae* que amplificaron el gen *ermB* con el tipo de sustitución de aminoácidos encontrados. La tabla muestra la correlación entre las dos metodologías utilizadas para la realización de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana con la secuenciación del gen *ermB* de las cepas de *Streptococcus agalactiae* y la sustitución de aminoácidos encontrados.

Código de la cepa	Tipo de muestra	Pruebas de susceptibilidad				Secuenciación de DNA	
		Diámetro del halo de inhibición (mm)		MIC (µg/mL)		Sustitución de aminoácido	
		E	DA	E	DA	Thr 224→Ile	Ser 229→Asn
GBS022	Orina	6	6	>=8	>=8	+	+
GBS031	Orina	26	26	<=0,25	<=0,25	-	-
GBS032	Muestra de órgano genital masculino	6	6	>=8	>=8	-	-
GBS053	Orina	6	6	>=8	2	-	-
GBS058	Orina	6	6	>=8	>=8	-	-
GBS062	Orina	6	6	>=8	>=8	-	-
GBS071	Orina	6	6	>=8	2	+	-

E: eritromicina, DA: clindamicina. MIC: concentración mínima inhibitoria. Puntos de corte CLSI 2015 Thr:

Treonina, Ile: isoleucina. Ser: serina. Asn: asparagina. +: presencia. -: ausencia.

Fuente: Cepas pertenecientes al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI)

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ

11.FIGURAS

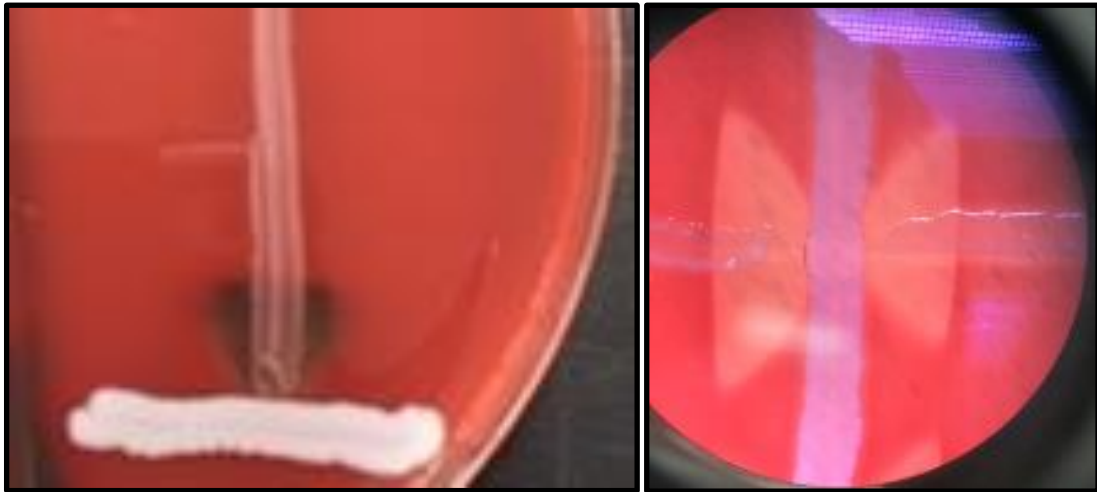


Figura 7: Resultado positivo del test de CAMP. La figura muestra los resultados positivos del test de CAMP de algunas de las cepas de *Streptococcus agalactiae* de este estudio.

Se observa la forma característica de “flecha” que produce la hemólisis de la bacteria *Streptococcus agalactiae* frente a la bacteria *Staphylococcus aureus*.

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ, 2016

IMÁGENES DE AUTORÍA PROPIA



Figura 8: Prueba de sensibilidad hacia la bacitracina de baja carga. La figura presenta la ausencia del halo de inhibición del *Streptococcus agalactiae* frente al disco de Bacitracina de 0.04U.

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ, 2016

IMÁGENES DE AUTORÍA PROPIA

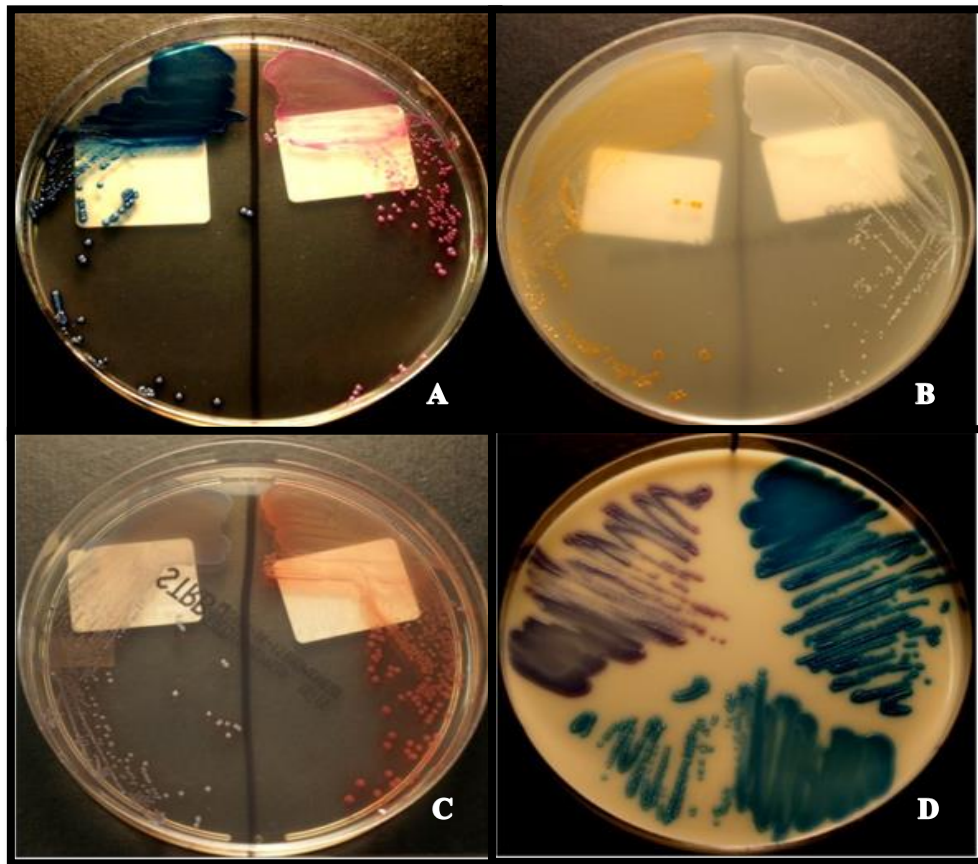


Figura 9: Diferentes agares cromogénicos disponibles. En la figura se observan los colores de los diferentes medios disponibles en el mercado

A: CHROMagar™ StrepB izquierda crecimiento de *Enterococcus spp.*, derecha crecimiento de *Streptococcus* grupo B. **B:** BioMérieux Granada agar a la izquierda colonias de *Streptococcus* grupo B, a la derecha colonias no inhibidas de otra bacteria diferente al estreptococo del grupo B. **C:** BioMérieux ChromID a la izquierda colonias de *Enterococcus spp.*, a la derecha colonias de estreptococo del grupo B. **D:** Bio-Rad StrepB SELECT las colonias en color lavanda son colonias de otro tipo de bacterias diferentes al *Streptococcus* grupo B, en azul (diferentes tonalidades) se muestran las colonias del estreptococo grupo B.

Fuente: (Tibbs & Creighton, 2013, p. 53)



Figura 10: Técnica de estriado en placa. La figura muestra el patrón típico de estriación y un ejemplo de placa estriada por este método

Fuente: (Brooks et al., 2014, p. 75)

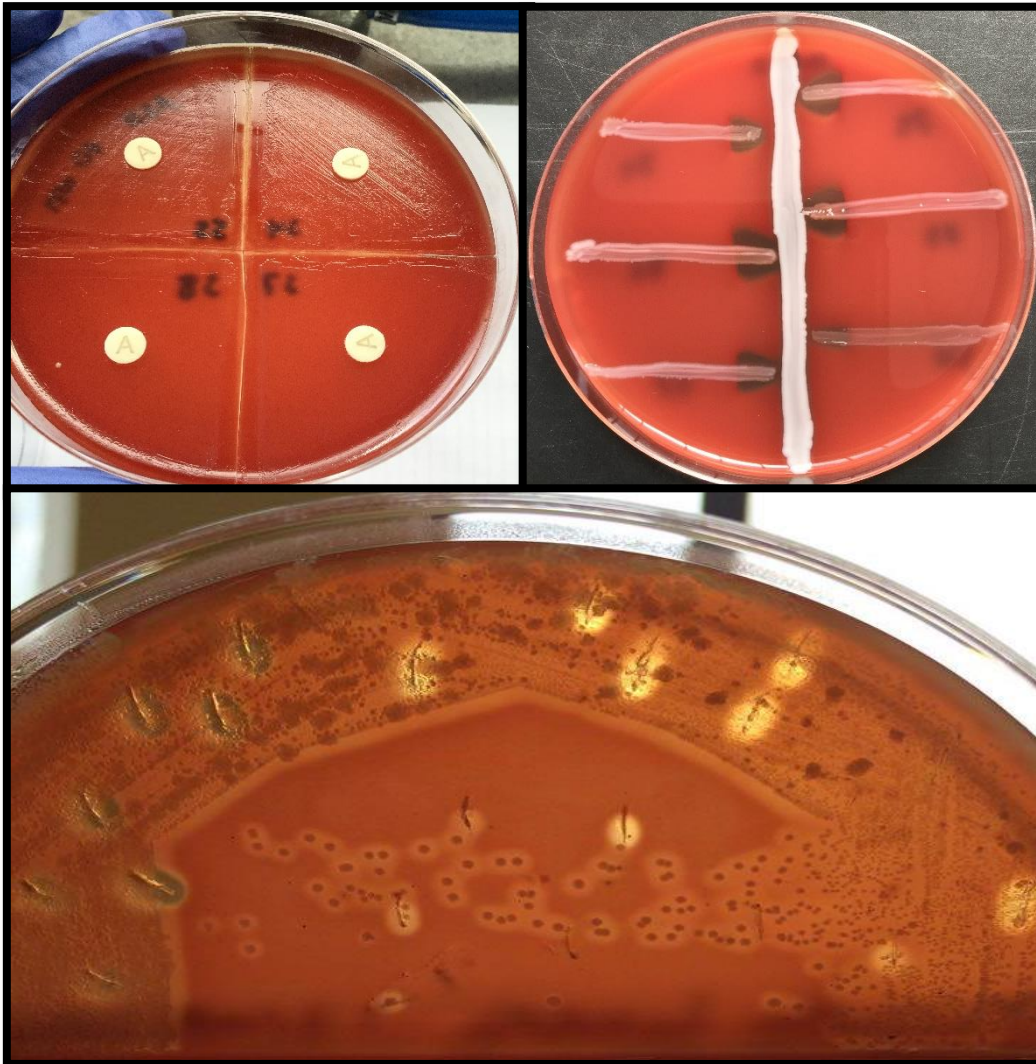


Figura 11: Pruebas fenotípicas de algunas de las cepas de *Streptococcus agalactiae*. La figura presenta algunas imágenes de las distintas pruebas fenotípicas que se realiza para la identificación de *Streptococcus agalactiae*

A: Prueba de sensibilidad a la bacitracina, no se presenta halos de inhibición. B: Test de CAMP se muestra la forma de flecha característica de un resultado positivo. C: β -hemólisis en agar sangre de cordero.

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ, 2016

IMÁGENES DE AUTORÍA PROPIA

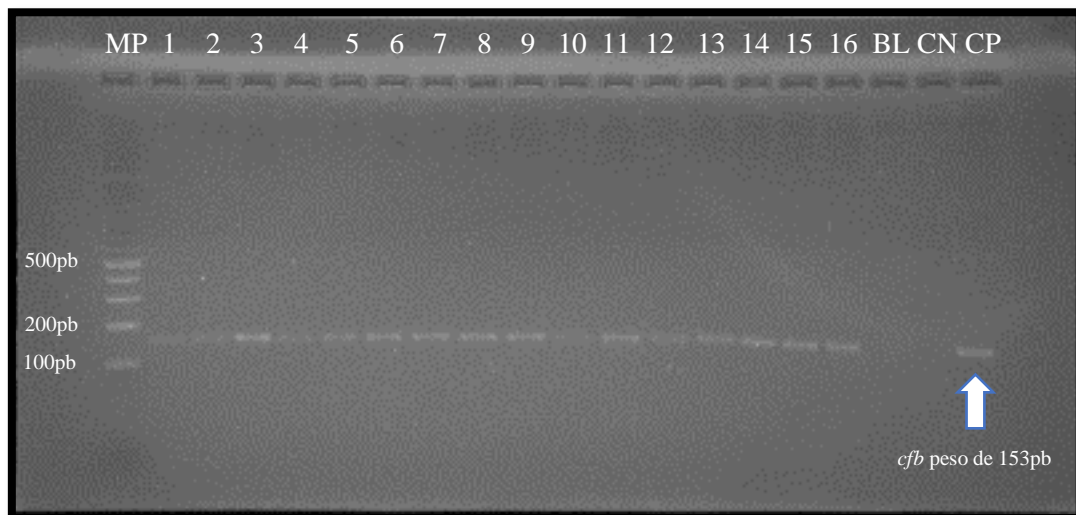


Figura 12: Gel de productos de la PCR para el gen *cfb*. La figura muestra los productos de la PCR en una corrida electroforética de 50 minutos a 80 voltios en un gel de 60ml de agarosa al 2%. Las bandas son la amplificación del gen *cfb* con un peso específico de 153pb.

MP: marcador de peso molecular de 100pb. Carriles 1-16: Cepas de *Streptococcus agalactiae*. BL: Blanco. CN: control negativo (cepa de *Enterococcus spp.*). CP: control positivo (cepa conocida de *Streptococcus agalactiae*)

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ, 2016

IMAGEN DE AUTORÍA PROPIA

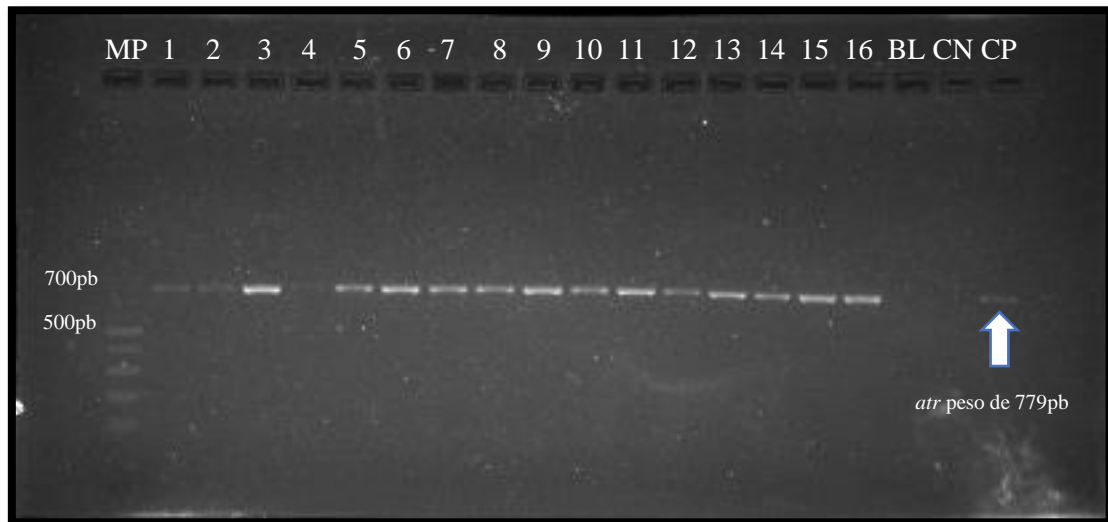


Figura 13: Gel de PCR para el gen *atr*, La figura muestra los productos de la PCR en una corrida electroforética de 50 minutos a 80 voltios en un gel de 60ml de agarosa al 2%. Las bandas son la amplificación del gen *atr* con un peso específico de 779pb.

MP: marcador de peso molecular de 100pb. Carriles 1-16: Cepas de *Streptococcus agalactiae*. BL: Blanco. CN: control negativo (cepa de *Enterococcus spp.*). CP: control positivo (cepa conocida de *Streptococcus agalactiae*).

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ, 2016

IMAGEN DE AUTORÍA PROPIA



Figura 14: Gel de amplificación del gen *ermB*. La figura muestra los productos de la PCR en una corrida electroforética de 50 minutos a 80 voltios en un gel de 60ml de agarosa al 2%. Las bandas son la amplificación del gen *ermB* con un peso específico de 639pb.

MP: marcador de peso molecular de 100pb. Carriles 1-14: Cepas de *Streptococcus agalactiae* resistentes a macrólidos y lincosamidas. BL: Blanco. CN: control negativo (cepa sensible de *Streptococcus agalactiae*.). CP: control positivo (cepa salvaje resistente de *Enterococcus spp.*).

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ, 2016

IMAGEN DE AUTORÍA PROPIA

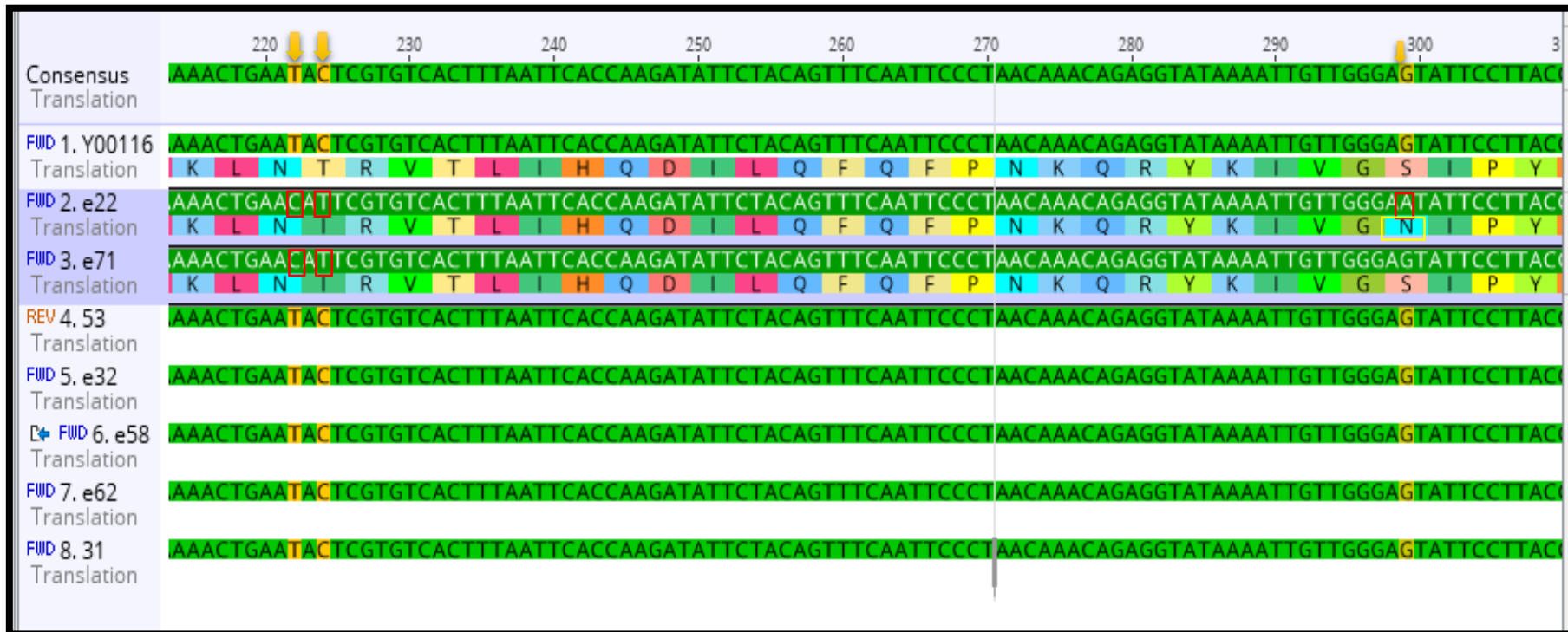


Figura 15: Secuenciación del gen *ermB*. La figura muestra la imagen de la interpretación de la secuenciación del gen *ermB* de algunas cepas de *Streptococcus agalactiae* que amplificaron para el mencionado gen

Las flechas (color naranja) muestran la posición de las mutaciones. Los recuadros (borde rojo) muestran el cambio de las bases nitrogenadas. Los recuadros (borde amarillo) muestran los aminoácidos codificados. A: adenina, C: citosina, T: timina, G: guanina. T: treonina, I: isoleucina, S: serina, N: asparagina.

ELABORADO POR: V. CASTRILLÓN Y W. MUÑOZ, 2016

IMAGEN DE AUTORÍA PROPIA