



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DESARROLLO DE UN MÉTODO RÁPIDO DE DETECCIÓN DE
STREPTOCOCCUS AGALACTIAE EN MUESTRAS CLÍNICAS
MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR

Autora

Pamela Dayana Calle Mendoza

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DESARROLLO DE UN MÉTODO RÁPIDO DE DETECCIÓN DE
STREPTOCOCCUS AGALACTIAE EN MUESTRAS CLÍNICAS MEDIANTE LA
TÉCNICA DE PCR

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor guía

MSc. Andrea Paola Cordero Arroyo

Autor

Pamela Dayana Calle Mendoza

Año

2017

DECLARACIÓN DEL DOCENTE GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

Andrea Paola Cordero Arroyo
Master en Células Madre y Medicina Regenerativa
CI. 171466982 5

DECLARACIÓN DEL DOCENTE CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Carlos Andrés Bastidas Caldés
Master en Microbiología Avanzada
CI. 020161980 6

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

Declaro haber dirigido científicamente a la estudiante Pamela Dayana Calle Mendoza para la realización de su trabajo experimental de titulación “Desarrollo de un método rápido de detección de *Streptococcus agalactiae* en muestras clínicas mediante la técnica de PCR” en base al método científico. Conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos.

Jeannete Zurita Salinas

Médica Microbióloga

CI. 170307911 9

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”

Pamela Dayana Calle Mendoza

CI. 172074686 4

AGRADECIMIENTOS

A Tata por sus incansables cuidados y atenciones, siempre velando por mi salud y bienestar. A Dianita por su fiel compañía en cada fase de mi camino siempre poniendo una sonrisa en mi rostro. A la Dra. Jeanette Zurita, Yeimy, Juan Carlos, Cecibel, Carolina, Pedro y Sandrita por sus tan valiosos consejos y por ser mi familia durante estos meses. A Andrea Cordero por su constancia. A Priscila, Daniela C., Gabriela, Michelle, Daniela M. y Marcela por su inmensa amistad que sin duda hizo de estos años, una experiencia muy llevadera. A Juan por su tan incomparable amistad y por estar a mi lado durante estos años.

DEDICATORIA

A mis padres Marcia y Andrés, sus enseñanzas, consejos y palabras me han formado como persona y como profesional. Por el apoyo y la confianza que entregan a todos mis proyectos y decisiones, nunca cortando mis alas, pero siempre tomando mi mano a lo largo del camino. A mis hermanos Andrea y Jorge, no hay mejor ejemplo a seguir para mí que el que ustedes ponen ante mis ojos todos los días. Por sus constantes consejos y palabras de aliento cuando el trayecto se ha puesto difícil, pero sobre todo por enseñarme el valor del trabajo bien hecho. Para ustedes, este fruto de mi esfuerzo.

RESUMEN

Streptococcus agalactiae (GBS) es una bacteria beta hemolítica y gram positiva causante de enfermedades invasivas, sepsis y meningitis en neonatos, infantes, mujeres embarazadas y adultos inmunológicamente comprometidos. El método de diagnóstico 'gold standard' consiste en el cultivo de la muestra y posterior identificación morfológica. Los métodos de tratamiento y/o profilaxis utilizados para tratar las infecciones con GBS consisten en la administración de penicilina y ampicilina con clindamicina y eritromicina como tratamientos alternativos en caso de anafilaxis. El presente estudio se enfoca en el desarrollo de un método de detección rápida para *Streptococcus agalactiae* mediante la amplificación por PCR del gen *scpB*, con controles negativos de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, así como el análisis de susceptibilidad a agentes antimicrobianos complementado con la amplificación por PCR de los genes de resistencia *mreA* y *ermB*. Se analizaron 132 muestras provenientes de diferentes tejidos o fluidos de pacientes previamente diagnosticados con infección y/o colonización por GBS tomadas desde el año 2012 hasta el año 2016. Se comprobó la efectividad del gen *scpB* para la identificación de *S. agalactiae* con un porcentaje de sensibilidad del 96%. Además, se determinó que el gen *ermB* se encuentra más relacionado a la resistencia a eritromicina y al fenotipo de resistencia cruzada MLS_B, que el gen *mreA*. A pesar de que los fenotipos de resistencia a eritromicina y clindamicina no presentaron una variación estadísticamente significativa entre sí ($p=0.21$) durante el periodo de tiempo considerado, si se comprobó el inminente incremento en la resistencia presentada por *S. agalactiae* a estos antibióticos. Se concluye entonces que el gen *scpB* puede ser utilizado como factor de detección para GBS independientemente del tipo de muestra que se analice. Igualmente, se recomienda realizar pruebas de susceptibilidad previa la dosificación de eritromicina o clindamicina a pacientes infectados. Dado que la resistencia a estos compuestos se codifica en elementos móviles, se establece que este fenotipo se verá incrementado con el paso del tiempo.

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae (GBS) is a beta hemolytic and gram positive bacteria causing invasive diseases, sepsis and meningitis to neonates, infants, pregnant women and immunologically compromised adults. The 'gold standard' diagnostic method consists on sample culture and subsequent morphologic identification. The treatment and/or prophylactic methods for GBS infections are based on dosage of penicillin and ampicillin or erythromycin and clindamycin as alternative treatments in case of anaphylaxis. This project focuses on the development of a rapid detection method for *Streptococcus agalactiae* by PCR amplification of the *scpB* gene with samples of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* as negative controls, as well as susceptibility analysis to antimicrobials complemented by the PCR amplification of resistance genes *mreA* and *ermB*. 132 samples from different human tissues or fluids belonging to patients previously diagnosed with infection or colonization by GBS from 2012 to 2016, were analyzed. Effectivity of the *scpB* gene for *S. agalactiae* identification was proven with a sensitivity percentage of 96%. Furthermore, it was determined that the *ermB* gene is more related to both the erythromycin resistance and the cross-resistance MLS_B phenotype, than the *mreA* gene. Even though the resistance phenotypes to erythromycin and clindamycin did not show a statistical significance variance ($p=0.21$) within the time considered in this investigation, the undeniable increasing resistance to both antibiotics was well proven. It can therefore be concluded that the *scpB* gene can be used as a detection factor for GBS independently of the sample treated. It is also recommended to run susceptibility tests before an infected patient is dosed with erythromycin or clindamycin. Given that the resistance to these compounds are coded in mobile elements, it can be established that this phenotype will continue to increase with time.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema.....	4
1.3 Objetivo general.....	7
1.4 Objetivos específicos.....	7
1.5 Justificación.....	7
2. Marco teórico.....	10
2.1 <i>Streptococcus agalactiae</i>	10
2.1.1 Generalidades.....	10
2.1.2 Epidemiología.....	11
2.1.3 Transmisión y factores de riesgo	15
2.2 Diagnóstico y tratamiento.....	16
2.2.1 Recolección de muestra.....	16
2.2.2 Métodos diagnósticos.....	17
2.2.2.1 Métodos a base de cultivo.....	17
2.2.2.2 Métodos a base de PCR.....	18
2.2.3 Gen <i>scpB</i> para identificación de <i>Streptococcus agalactiae</i>	19
2.2.4 Tratamiento.....	20
2.3 Sensibilidad a antibióticos.....	21
2.3.1 Situación de riesgo.....	21
2.3.2 Mecanismos moleculares de resistencia a antibióticos.....	23
2.3.2.1 Resistencia intrínseca.....	23
2.3.2.2 Resistencia adquirida.....	24
2.3.3 Fenotipo MLS _B	25
2.3.4 Genes involucrados en la resistencia a antibióticos en <i>Streptococcus agalactiae</i>	27

2.3.4.1 Gen <i>mreA</i>	27
2.3.4.2 Gen <i>ermB</i>	28
3. Diseño del plan experimental.....	28
4. Procedimientos.....	29
4.1 Población y muestra.....	30
4.1.1 Distribución de muestras.....	30
4.1.1.1 Clasificación por año.....	30
4.1.1.2 Clasificación por género y edad.....	30
4.1.1.3 Clasificación por tipo de muestra.....	30
4.2 Materiales y métodos para la obtención de datos.....	31
4.2.1 Descongelamiento de muestras y siembra.....	31
4.2.2 Extracción de DNA total.....	31
4.2.3 Hidratación de primers y preparación de solución de trabajo.....	32
4.2.4 Amplificación de genes por reacción en cadena de la polimerasa y electroforesis.....	32
4.2.4.1 Amplificación del gen de identificación <i>scpB</i>	32
4.2.4.2 Amplificación del gen de resistencia <i>mreA</i>	34
4.2.4.3 Amplificación del gen de resistencia <i>ermB</i>	36
4.2.5 Prueba CAMP.....	37
4.2.6 Análisis de sensibilidad a antibióticos mediante el sistema Vitek® 2 de ©BioMérieux.....	38
4.2.6.1 Preparación de la suspensión.....	38
4.2.6.2 Inoculación.....	38
4.2.6.3 Sellado de tarjetas e incubación.....	39
4.3 Evaluación estadística de los resultados.....	39
4.3.1 Obtención de índices en porcentaje.....	40
4.3.1.1 Índices generales.....	40
4.3.1.2 Índices por año.....	40
4.3.1.3 Incidencia por edad.....	41

4.3.1.4	Incidencia por tipo de muestra.....	41
4.3.1.5	Índice fenotípico total de resistencia a penicilina, ampicilina, eritromicina y clindamicina	42
4.3.1.6	Índice fenotípico total de resistencia a otros agentes antibióticos.....	43
4.3.2	Obtención de muestras con el fenotipo MLS _B	43
4.3.3	Análisis de varianza.....	44
5.	Resultados y discusión.....	44
5.1	Identificación de genes por reacción en cadena de la polimerasa.....	44
5.1.1	Gen de identificación <i>scpB</i>	44
5.1.2	Gen de resistencia <i>mreA</i>	47
5.1.3	Gen de resistencia <i>ermB</i>	49
5.2	Incidencia del gen de identificación <i>scpB</i> por factores cualitativos.....	51
5.2.1	Incidencia del gen <i>scpB</i> por edad.....	51
5.2.2	Incidencia del gen <i>scpB</i> por tipo de muestra.....	53
5.3	Pruebas CAMP.....	55
5.4	Fenotipo de susceptibilidad a antibióticos.....	57
5.4.1	Susceptibilidad a penicilina.....	57
5.4.2	Susceptibilidad a ampicilina.....	59
5.4.3	Susceptibilidad a eritromicina.....	60
5.4.4	Susceptibilidad a clindamicina.....	62
5.4.5	Susceptibilidad a otros agentes antibióticos.....	64
5.5	Fenotipo MLS _B	68
5.6	Incidencia retrospectiva de <i>Streptococcus agalactiae</i> en base al gen de identificación <i>scpB</i>	76
5.7	Incidencia retrospectiva de fenotipos y genotipos de resistencia a eritromicina y clindamicina.....	78

5.7.1 Incidencia retrospectiva de resistencia a eritromicina en relación a los genes <i>mreA</i> y <i>ermB</i>	78
5.7.2 Incidencia retrospectiva de resistencia a clindamicina en relación con el gen <i>ermB</i>	80
6. Conclusiones y recomendaciones.....	84
6.1 Conclusiones.....	84
6.2 Recomendaciones.....	85
Referencias.....	86
Anexos.....	110

Índice de figuras

<i>Figura 1.</i> Incidencia de infecciones tempranas e infecciones tardías causadas por <i>Streptococcus agalactiae</i> en Estados Unidos. 1990-2010.....	12
<i>Figura 2.</i> Índices específicos por edad de bacteriemia causada por <i>Streptococcus agalactiae</i> : Inglaterra, Gales e Irlanda del Norte, 2009.....	13
<i>Figura 3.</i> Interpretación de prueba CAMP para la identificación de <i>Streptococcus agalactiae</i>	18
<i>Figura 4.</i> Incremento en la resistencia a eritromicina y clindamicina desde el año 2001 hasta 2012.....	22
<i>Figura 5.</i> Prueba de zona D para <i>Streptococcus agalactiae</i> . Zona de inhibición en forma de D alrededor del disco de clindamicina con atenuación hacia el disco de eritromicina.	26
<i>Figura 6.</i> Diagrama de proceso del plan experimental para el desarrollo de la investigación planteada.....	29
<i>Figura 7.</i> Ilustración de cassette de Vitek® 2 cargado con diez tarjetas de identificación junto a sus respectivos tubos de suspensión bacteriana.....	39
<i>Figura 8.</i> Productos de PCR con amplificación del gen <i>scpB</i> en gel de agarosa 1% visualizados en transiluminador UV.	45

<i>Figura 9.</i> Diagrama de amplificación del gen <i>scpB</i>	45
<i>Figura 10.</i> Productos de PCR con amplificación del gen <i>mreA</i> en gel de agarosa al 1% visualizados en trnsiluminador UV.	48
<i>Figura 11.</i> Diagrama de amplifiación del gen <i>mreA</i>	48
<i>Figura 12.</i> Productos de PCR con amplificación del gen <i>ermB</i> en gel de agarosa al 1% visualizados en transiluminador UV.	50
<i>Figura 13.</i> Diagrama de amplificación del gen <i>ermB</i>	50
<i>Figura 14.</i> Distribución del gen <i>scpB</i> por rangos de edad.....	52
<i>Figura 15.</i> Distribución del gen <i>scpB</i> según el tipo de muestra.....	54
<i>Figura 16.</i> Interpretación de pruebas del factor CAMP en agar sangre de cordero.....	56
<i>Figura 17.</i> Diagrama del fenotipo de resistencia de <i>Streptococcus agalactiae</i> a penicilina.....	57
<i>Figura 18.</i> Diagrama del fenotipo de resistencia por parte de GBS a ampicilina.....	59
<i>Figura 19.</i> Diagrama del fenotipo de susceptibilidad de GBS a eritromicina..	61
<i>Figura 20.</i> Diagrama del fenotipo de susceptibilidad por parte de GBS a clindamicina.	63

<i>Figura 21.</i> Fenotipo de susceptibilidad presentado por <i>Streptococcus agalactiae</i> a diferentes agentes antibióticos.	65
<i>Figura 22.</i> Diagrama de distribución del fenotipo MLS entre las muestras analizadas.....	69
<i>Figura 23.</i> Porcentajes de incidencia del gen <i>ermB</i> en muestras fenotípicamente resistentes a eritromicina.	72
<i>Figura 24.</i> Porcentajes de incidencia del gen <i>ermB</i> en muestras fenotípicamente resistentes a clindamicina.	72
<i>Figura 25.</i> Porcentajes de incidencia del gen <i>mreA</i> en muestras fenotípicamente resistentes a eritromicina.	75
<i>Figura 26.</i> Distribución del gen <i>scpB</i> por año.	76
<i>Figura 27.</i> Distribución del fenotipo de susceptibilidad a eritromicina por año.....	78
<i>Figura 28.</i> Distribución del gen <i>mreA</i> por año.....	79
<i>Figura 29.</i> Distribución del gen <i>ermB</i> por año.....	80
<i>Figura 30.</i> Distribución del fenotipo de susceptibilidad a clindamicina por año.....	81

Índice de tablas

Tabla 1: <i>Concentraciones de reactivos y condiciones térmicas utilizadas en el programa de PCR para la amplificación del gen scpB.</i>	33
Tabla 2: <i>Concentraciones de reactivos y condiciones térmicas utilizadas en el programa de PCR para la amplificación del gen mreA.</i>	35
Tabla 3: <i>Concentraciones de reactivos y condiciones térmicas utilizadas en el programa de PCR para la amplificación del gen ermB.</i>	36
Tabla 4: <i>Descripción de grupos de edad generados para análisis estadístico.</i>	41
Tabla 5: <i>Descripción de los grupos por tipo de muestra utilizados en el análisis estadístico.</i>	42
Tabla 6: <i>Número de muestras con identificación para cada compuesto antibiótico.</i>	43
Tabla 7: <i>Genes de resistencia identificados según el fenotipo de resistencia presentado.</i>	69
Tabla 8: <i>Análisis de varianza (ANOVA) de un factor.</i>	82

1. Introducción

1.1 Antecedentes

Streptococcus agalactiae es el nombre científico del *Streptococcus* beta hemolítico del Grupo B que generalmente se abrevia GBS. Es uno de los microorganismos bacterianos asociados con el desarrollo de sepsis y meningitis en infantes y neonatos (Carlin et al., 2009). La primera descripción fue realizada por Nocard y Mollerau en el año de 1887 y relacionaba la bacteria con el desarrollo de mastitis bovina (Barton, Feigin, & Lins, 1973). Basándose en esta descripción, en 1934 los investigadores Rebecca Lancefield y Ronald Hare, pertenecientes al equipo del Instituto Médico del Hospital Rockefeller en Nueva York, presentaron la primera diferenciación serológica utilizando el método de reacciones de precipitina en cepas patogénicas y no patogénicas. Las pruebas fueron desarrolladas en conejos y ratones. Como resultado de la investigación, se estableció una clasificación de seis divisiones serológicas nombradas desde A hasta G respectivamente (Lancefield & Hare, 1935). Sin embargo, no fue hasta 1938 que por primera vez se relacionó a *Streptococcus agalactiae* con enfermedades humanas severas.

En 1973, los investigadores Barton, Feigin y Lins establecieron la asociación del *Streptococcus* beta hemolítico del grupo B con el desarrollo de sepsis neonatal, que en ese año presentaba una tasa de mortalidad del 55% únicamente en Estados Unidos. Durante 1977, Bohnsack pudo comprobar, usando muestras clínicas, que el desarrollo de infecciones tempranas a causa de *Streptococcus agalactiae* podía ser prevenida mediante la administración de antibióticos durante el parto a mujeres que tuvieran riesgo de transmisión vertical. En 1996 el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (ACOG) por sus siglas en inglés, y la Academia de Pediatras (AAP) presentaron recomendaciones oficiales para la realización de profilaxis a base de antibióticos con penicilina durante el parto con el fin de prevenir el fenómeno de transferencia vertical (Dermer, Lee, Eggert, & Few, 2004).

En 1998 nuevos estudios epidemiológicos demostraron la capacidad de las cepas de *Streptococcus agalactiae* para causar endometritis puerperal materna independientemente de su clasificación serológica. Sin embargo, también se determinó que el serotipo tres era el causante más común de la meningitis infantil (Bhushan, Bascom, & Carl, 1998). Durante el siguiente año, el grupo científico de Lachenauer estudió los polisacáridos capsulares tipo específicos (CPS) debido a su capacidad para inhibir el proceso de opsonofagocitosis aumentando la patogenicidad (Lachenauer et al., 1999). En el 2001, estableció una nueva clasificación serológica, con ocho grupos diferentes (I- VIII) y una subclasificación del serotipo I en Ia, Ib y Ia/c (Dermer et al., 2004).

En el 2004, se analizó la resistencia de *Streptococcus agalactiae* en doscientas muestras de *Streptococcus agalactiae* obtenidas de hisopados vaginales de mujeres embarazadas. Como era esperado, el estudio comprobó la susceptibilidad de todas las muestras de a penicilina y vancomicina con cierto grado de resistencia a tetraciclina. Sin embargo, también se encontró que todas las muestras eran resistentes a eritromicina y un 6% presentaba resistencia combinada a eritromicina y clindamicina (Heelan, Hasenbein, & McAdam, 2004). En el mismo año, el grupo científico de Dmitriev publicó un estudio con una propuesta de diagnóstico clínico basado en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen *scpB*, el cual codifica para la peptidasa C5a que actúa como un factor de virulencia (Dmitriev, Suvorov, Shen, & Yang, 2004).

Un año después, Rafael Duarte y sus colaboradores de la Universidad Federal de Rio de Janeiro estudiaron la distribución de los genes relacionados tanto a la resistencia a antibióticos como los relacionados con los factores de virulencias en muestras bovinas y humanas de forma simultánea. Corroborando las investigaciones previas, se confirmó que todas las cepas de *Streptococcus agalactiae* presentaban resistencia a tetraciclina y el 8.5% presentaban resistencia a eritromicina. El análisis molecular llevado a cabo por PCR, demostró que los genes *tet(M)*, *erm(A)* y *mreA* relacionados con la resistencia a

antibióticos y los genes *bca*, *lmb* y *scpB* codificantes para los factores de patogenicidad eran comunes en las cepas de origen humano (Duarte, Bellei, Miranda, Brito, & Teixeira, 2005).

En 2007, se publicó un nuevo estudio que utilizaba el método de PCR a tiempo real para la detección y amplificación de los genes *sip* y *cylE* codificantes para los factores de virulencia: proteína inmunogénica de superficie y Beta Hemoliscina respectivamente (Bergseng, Bevanger, Rygg, & Bergh, 2007). Cuatro años más tarde, se publicó una investigación basada en el análisis de susceptibilidad de *Streptococcus agalactiae* a eritromicina y clindamicina, el cual fue realizado en el territorio australiano bajo la sospecha del incremento de la resistencia a los dos agentes antibióticos, a nivel global. Si bien se encontró muestras que presentaban resistencia a los dos compuestos antibióticos, se estableció que no existía diferencia estadísticamente significativa en el incremento de la resistencia a macrólidos entre 1982- 2001 y 2002- 2006 (Garland et al., 2011).

En 2013 se publicó un estudio combinado de identificación de tipos capsulares, genotipaje y susceptibilidad antimicrobiana en muestras de obtenidas a partir de pacientes en edad reproductiva. El estudio reportó la presencia de cepas pertenecientes a los grupos serológicos Ia, II, III y V y una de las muestras clasificada como no tipificable. Además, se reportó y confirmó la susceptibilidad de todas las muestras analizadas a penicilina, ampicilina, cefepina, cefotaxima, cloranfenicol, levofloxacina y vancomicina pero, al igual que en estudios previos, se reportó cierto grado de resistencia a eritromicina y clindamicina (Otaguiri et al., 2013). Un año más tarde, el grupo científico de Landwehr publicó un estudio sobre la interacción entre *Streptococcus agalactiae* y la respuesta inmune celular innata durante un cuadro clínico de colonización que relevó los procesos iniciales de infección (Landwehr & Henneke, 2014).

En el mismo año, Crespo y colaboradores publicaron un estudio sobre las tendencias emergentes realizado con muestras de *Streptococcus agalactiae* invasivas y no invasivas recopiladas por diecisiete años. Esta investigación

concluyó que las infecciones neonatales causadas por este microorganismo han incrementado considerablemente con el paso del tiempo. Así mismo, se presentó un incremento progresivo en la resistencia a eritromicina y clindamicina además de la aparición de muestras no susceptibles a penicilina (Crespo, Castañeda, Recalde, & Vélez, 2014a).

1.2 Planteamiento del problema

El *Streptococcus agalactiae* es el causante principal de enfermedades invasivas, infecciones y sepsis en neonatos, ancianos y pacientes inmunológicamente comprometidos. A pesar de los avances en los tratamientos y prevención de las infecciones, el desarrollo de enfermedades neonatales, así como el desarrollo sepsis y meningitis a causa de este microorganismo representan un factor preocupante para la salud pública a nivel global. Razón por la cual, la investigación de nuevas técnicas de diagnóstico y terapia es necesario (Nuccitelli, Rinaudo, & Maione, 2015).

Las estadísticas estiman que al menos una de cada cuatro mujeres en estado de gestación es portadora de *Streptococcus agalactiae* en vagina y/o recto. Es por esto, que todas las mujeres gestantes deben someterse a un análisis clínico con el fin de prevenir la transferencia del microorganismo al neonato. Incluso así, se estima que al menos un tercio de los casos clínicos ocurren en neonatos que tienen de 24 a 48 horas de edad. Es importante recalcar que el riesgo mortal a causa de infecciones es dos veces mayor en infantes mayores que en neonatos. A pesar de la existencia de métodos de profilaxis y tratamiento, al menos un 20% de las infecciones totales resultan en muerte. De ese porcentaje, se estima que al menos el 65% de las muertes ocurren en neonatos que pesan menos de 2500 gramos (Kothari et al., 2009). En pacientes adultos, el microorganismo puede generar bacteriemia, presentada en el 0.03% de los casos en mujeres gestadas, infecciones en tejido blando, endocarditis, osteomielitis y neumonía. Sin embargo, en estos casos las infecciones suelen resultar fatales en pacientes inmunodeprimidos, de tercera edad o con antecedentes de diabetes, cáncer y/o

alcoholemia (Centers for Disease Control and Prevention, 2012). En pacientes que superan los sesenta y cinco años de edad, la tasa de mortalidad a causa de infecciones invasivas es mayor en un 10% a la tasa de mortalidad estimada en neonatos (Nuccitelli et al., 2015).

Se estima que anualmente se producen al menos 26 500 infecciones severas únicamente en Estados Unidos (Centers for Disease Control and Prevention, 2016b). Se ha determinado que, en la zona del Reino Unido, comprendida por Gales, Inglaterra e Irlanda del Norte, la tasa de infecciones es de 0.44 por cada mil nacimientos vivos. Cifra que representa un incremento del 19% con respecto a los datos de los casos clínicos presentados en el año 2003 (Group B Strep Support. GBSS, 2015).

En América Latina, por otro lado, estudios realizados en Argentina hasta el año 2004 reportaron una incidencia del 5 al 18% de mujeres embarazadas portadoras. También, se reportaron tasas de colonización del 50 al 70% de neonatos cuando no se habían tomado medidas para la prevención de la transferencia vertical durante el parto. Los datos en Argentina establecieron la tasa infectiva entre 0.3 a 0.6 infantes por cada mil nacimientos vivos. Estas cifras que coinciden con el rango de 0.44 infantes por cada mil nacimientos vivos reportados en la zona de Reino Unido en el año 2015. El índice de mortalidad en Argentina fue establecido en un rango del 5 al 20% de los pacientes infectados, a pesar de que algunos reportes indicaban cifras del 13 al 50% en infantes infectados (Galarza et al., 2004). En Chile, la Guía Perinatal de la Subsecretaría de Salud Pública de la nación implementó la recomendación de un examen de cultivo perianal entre las semanas 35 a 37 del periodo de gestación (Subsecretaría de Salud Pública, 2015).

En Ecuador, una investigación realizada en el año 2008 reportó un 13.15% de colonización por *Streptococcus agalactiae* en muestras vagino-rectales de mujeres embarazadas, con la mayoría de datos positivos encontrados en mujeres menores a los cuarenta años. Esta cifra resultó mayor al dato reportado

en el 2002 en un estudio realizado en la ciudad de Quito, el mismo que indicó un 10% de colonización en mujeres embarazadas a las 38 semanas de gestación (Ortiz & Bazante, 2008). Al igual que en Chile, el Ministerio de Salud Pública de Ecuador recomienda realizar análisis clínicos en mujeres gestantes que se encuentren entre las semanas 35 a 37 de embarazo (Ministerio de Salud Pública de Ecuador, 2015).

A pesar de los progresivos avances en las áreas de microbiología y biología celular, el método de diagnóstico aún consiste en el cultivo de la muestra en medios enriquecidos y pruebas bioquímicas (Group B Strep Support. GBSS, 2015b). Es por esto, es reconocido como '*gold standard*'. Sin embargo, este método requiere de al menos doce horas de incubación a 35°C en equipos libres de contaminación externa, medios selectivos y un alto nivel de conocimiento por parte del analista que está realizando la prueba de detección. Es así, que la prueba de diagnóstico para la bacteria puede tomar un tiempo estimado de uno a tres días (De Paris et al., 2011). La combinación de estos factores hace que el método sea propenso a errores y por ende a entregar resultados falsos negativos o falsos positivos que pueden resultar problemáticos para el paciente o para el feto en caso de que la prueba sea realizada en una mujer embarazada.

El método de profilaxis o tratamiento para pacientes diagnosticados consiste en la dosificación de penicilina o ampicilina seguido de cefalosporinas de primera generación y vancomicina. No existen reportes de resistencia por parte de *Streptococcus agalactiae* a estos antibióticos, pero si se ha reportado la aparición de sensibilidades intermedias y reducciones en las concentraciones mínimas inhibitorias. Para los pacientes infectados que presentan alergia y/o resistencia a penicilina, existe el tratamiento alternativo que consiste en la dosificación de eritromicina o clindamicina (Bolukaoto et al., 2015). Sin embargo, existen varios reportes que indican un aumento progresivo en la resistencia a eritromicina y a clindamicina (Garland et al., 2011) fenómeno que pone en riesgo la efectividad de este tratamiento. El presente proyecto pretende establecer un método de detección rápida y eficaz para *Streptococcus agalactiae*, así como

proponer un posible mejoramiento en el tratamiento establecido para pacientes con cuadros clínicos.

1.3 Objetivo general

Desarrollar un método de detección rápido para *Streptococcus agalactiae* mediante la amplificación del gen *scpB* así mismo como los genes *ermB* y *mreA* codificantes para los factores de resistencia mediante la aplicación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

1.4 Objetivos específicos

- Identificar el gen *scpB* en muestras clínicas de *Streptococcus agalactiae* mediante amplificación específica por PCR.
- Identificar los genes *ermB* y *mreA* codificantes para factores de resistencia en muestras clínicas de *Streptococcus agalactiae* mediante amplificación específica por PCR.
- Establecer una comparación fenotipo/genotipo en relación a la resistencia desarrollada por parte de *Streptococcus agalactiae* a antibióticos.

1.5 Justificación

Se ha de descrito a *Streptococcus agalactiae* como uno de los microorganismos frecuentemente relacionados con el desarrollo de enfermedades invasivas e infecciones severas no solo en neonatos e infantes, sino también en personas adultas y mujeres embarazadas. Los pacientes colonizados no presentan síntomas o molestias, sin embargo, la naturaleza de patógeno oportunista que caracteriza a la bacteria representa un riesgo importante para todos los pacientes portadores asintomáticos.

Se ha podido comprobar que entre el 10 al 35% de mujeres embarazadas son portadoras de este microorganismo, el cual se encuentra presente en la flora bacteriana vaginal y/o rectal. Los infantes que nacen de mujeres colonizadas tienen un alto riesgo de desarrollar una enfermedad invasiva, que puede presentarse como sepsis, meningitis o neumonía, causada por la exposición que el neonato ha tenido al microorganismo durante el embarazo y el parto. Cabe recalcar, que los pacientes adultos colonizados también tienen probabilidad de desarrollar infecciones o enfermedades invasivas a causa de la bacteria (Shabayek, Abdalla, & Abouzeid, 2010). Por lo cual surge la necesidad de establecer un método de detección rápido, efectivo y eficaz que pueda identificar la presencia de *Streptococcus agalactiae* en diferentes tipos de tejidos, fluidos y/o secreciones humanas.

Los métodos de diagnóstico basados en biología molecular son cada vez más utilizados y aceptados a nivel mundial para la identificación de diferentes cuadros clínicos, principalmente aquellos que se han originado a causa de un microorganismo patógeno. Es así que la reacción en cadena de la polimerasa o PCR es una excelente opción para la detección y consecuente diagnóstico de *Streptococcus agalactiae* presentando varias ventajas por sobre el método de diagnóstico a base de cultivo. A diferencia del método en base de cultivo que requiere de disponibilidad de medios selectivos, tiempo de incubación por al menos 12 horas a 35°C en equipos libres de contaminación externa y un alto grado de experiencia y reconocimiento por parte del analista que realiza la prueba diagnóstica, la PCR solo utiliza la identificación de un gen, y en casos especiales, la talla del gen que se ha amplificado, para confirmar la presencia de *Streptococcus agalactiae* independientemente del tipo de muestra se esté analizando.

La PCR debe ser complementado con estudios centrados en los métodos de profilaxis y tratamiento existentes para combatir las infecciones. El método principal de profilaxis para mujeres embarazadas consiste en la dosificación de antibióticos, principalmente penicilina, durante el parto. Los pacientes que se

encuentran colonizados o que han desarrollado una infección también son dosificados con penicilina como primera opción. Una alternativa consiste en la dosificación de eritromicina o clindamicina para pacientes que tienen alergia y/o resistencia a penicilina. Sin embargo, los reportes investigativos sobre el incremento progresivo en la resistencia a los dos compuestos antibióticos representan un riesgo para todos los pacientes colonizados o infectados. La evaluación de los efectos de diferentes compuestos antibióticos sobre *Streptococcus agalactiae* es un importante aporte tanto teórico como práctico para la comunidad científica y médica.

Estas investigaciones posibilitan la identificación de colonias resistentes presentes en el territorio ecuatoriano. Este estudio permite realizar comparaciones con estudios previos, sobre la resistencia de GBS a agentes antibióticos en otras regiones geográficas. También es un aporte para mejorar la eficacia del tratamiento prescrito por los médicos tratantes.

La presente investigación beneficiará ya sea directa o indirectamente a tres grupos diferentes: la comunidad científica global, latino americana y ecuatoriana. La comunidad médica se verá beneficiada por el avance en el método de detección para *Streptococcus agalactiae* así mismo, como el posible perfeccionamiento del método de tratamiento establecido para pacientes colonizados o infectados. Finalmente, se verá beneficiada la comunidad de pacientes colonizados o infectados, independientemente de su género o edad, con un método más seguro, eficiente y sensible para el diagnóstico de GBS en diferentes muestras de origen humano.

2. Marco teórico

2.1 *Streptococcus agalactiae*

2.1.1 Generalidades

Streptococcus agalactiae pertenece al reino bacteria, filo Firmicutes, clase Bacilli, orden Lactobacillales y familia Streptococcaceae (Facklam, 2002). Se caracteriza por ser una bacteria anaerobia facultativa, Gram positiva dispuesta en forma de diplococos. Originalmente fue asociada con la enfermedad de mastitis bovina hasta que fue descrita como patógeno humano en el año de 1930 (Elbaradie, Mahmoud, & Farid, 2009). Es el único especie de estreptococos que contiene el antígeno Lancefield grupo B, razón por la cual, la bacteria también es conocida como Streptococcus beta hemolítico de Grupo B abreviado o GBS (Sendi, Johansson, & Norrby-Teglund, 2008).

Este microorganismo actúa como un patógeno oportunista siendo capaz de causar enfermedades en neonatos, mujeres embarazadas y adultos no gestantes. Fue descrito por primera vez como un factor de impacto en la medicina materno- fetal en la década de 1970 pudiendo manifestarse en cuadros clínicos de meningitis, neumonía, septicemia e infección tanto al tejido blando como al tejido óseo (Burnham & Tyrrell, 2003). Desde entonces, se han reportado más de siete mil quinientos casos de sepsis y meningitis causados por GBS anualmente, generando un gasto de al menos \$350 millones (S Schrag, Fulz-Butts, & Schuchat, 2002). También se ha descrito como bacteria ubicua de los tractos gastrointestinal y genitourinario de adultos sanos, especialmente mujeres (Crespo, Castañeda, Recalde, & Vélez, 2014b).

Originalmente, se identificaron nueve serotipos de GBS: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII utilizando la precipitación capilar basada en antígenos capsulares como principal método para la diferenciación serológica. Sin embargo, en 2007 se presentó un reporte para la introducción de un décimo serotipo (IX) (Slotved,

Kong, Lambertsen, Sauer, & Gilbert, 2007). Cada serotipo descrito es antigénica y estructuralmente único (Johri et al., 2013).

2.1.2 Epidemiología

A pesar de que *Streptococcus agalactiae* afecta principalmente a neonatos y/o infantes, las infecciones y enfermedades causadas por esta bacteria también pueden desarrollarse en personas adultas independientemente de su género o grupo de edad (Centers for Disease Control and Prevention, 2016a). Sin embargo, cuando se trata de neonatos, esta bacteria puede generar infección temprana e infección tardía. Se conoce como infección temprana al desarrollo de sepsis que ocurre durante los primeros seis días de vida, mientras que la infección tardía hace referencia a las infecciones que se desarrollan entre los siete y noventa días de vida del neonato (Madhi et al., 2013).

Los primeros lineamientos para la prevención del desarrollo de enfermedades perinatales causados por *Streptococcus agalactiae* fueron presentados en 1996. La primera consistía en la realizar exámenes clínicos para la detección prenatal de colonización por este microorganismo y en caso de obtener resultados positivos hacer una profilaxis intra-parto. La segunda recomendación consistía en administrar el método de profilaxis intra-parto únicamente a mujeres que presentaran uno o varios factores de riesgo obstétrico durante las fases culminantes del embarazo (Stephanie Schrag & Verani, 2013).

Desde la implementación de estas recomendaciones, los índices de incidencia de las infecciones tempranas invasivas causadas por *S. agalactiae* se redujeron considerablemente. Sin embargo, la aplicación del método de profilaxis intra-parto no tuvo ningún efecto en la incidencia de infecciones tardías causadas (Figura 1) (Stephanie Schrag & Verani, 2013).

El método de profilaxis intra-parto ha sido clave en la reducción del desarrollo de infecciones tempranas en neonatos de 1.8 por cada mil nacimientos (1990) a

0.35 por cada mil nacimientos vivos (2003). Incidencia que no se ha sido alterada considerablemente desde entonces (Lin et al., 2011).

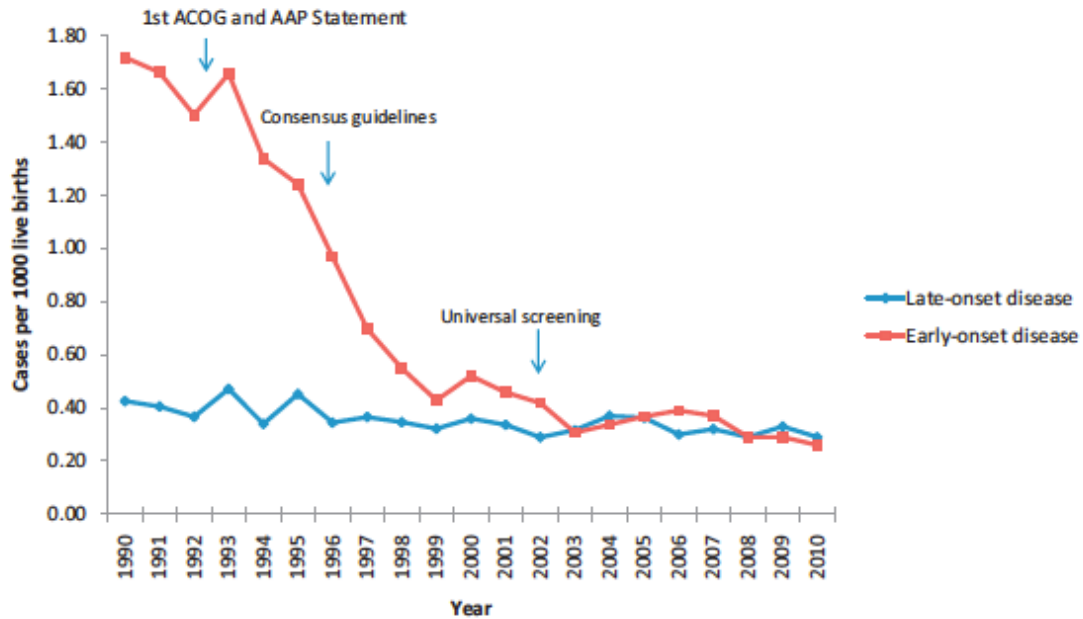


Figura 1. Incidencia de infecciones tempranas e infecciones tardías causadas por *Streptococcus agalactiae* en Estados Unidos. 1990 -2010.

Tomado de Schrag, S. Verani, J., 2013

Al igual que otras bacterias de la flora vaginal, *Streptococcus agalactiae* puede causar infecciones mientras el bebé aún se encuentra en el vientre y por lo tanto provocar el nacimiento de un niño muerto. Debido a que puede habitar en el líquido amniótico y de ahí trasladarse dentro de los pulmones y/o al torrente sanguíneo del feto causando su muerte. Sin embargo, esto es poco común cuando existen infecciones por el microorganismos en cuestión dado a que la muerte fetal es más frecuentemente causada por otros factores como defectos genéticos o problemas ginecológicos (Steer, McCartney, Bedford-Russell, & Cox, 2012).

Se estima que aproximadamente un 50% de la población femenina se encuentra colonizada por *S. agalactiae*, aunque también se la puede encontrar en el tracto

gastrointestinal. Se ha descrito a esta bacteria como un colonizador asintomático de la uretra tanto en hombres como en mujeres (Johri et al., 2013).

La incidencia de infecciones causadas por *Streptococcus agalactiae* en personas adultas es significativamente menor a la incidencia de infecciones desarrolladas en neonatos por el microorganismo en cuestión. Estas infecciones generalmente solo ocurren cuando el paciente presenta un cuadro clínico correspondiente a diabetes, cáncer o inmunosupresión. En la región de Irlanda del Norte, estudios hasta el 2009 reportan una incidencia de 9.90 casos por cada cien mil habitantes mayores a los setenta y cinco años de edad (Figura 2) (Health Protection Agency, 2010).

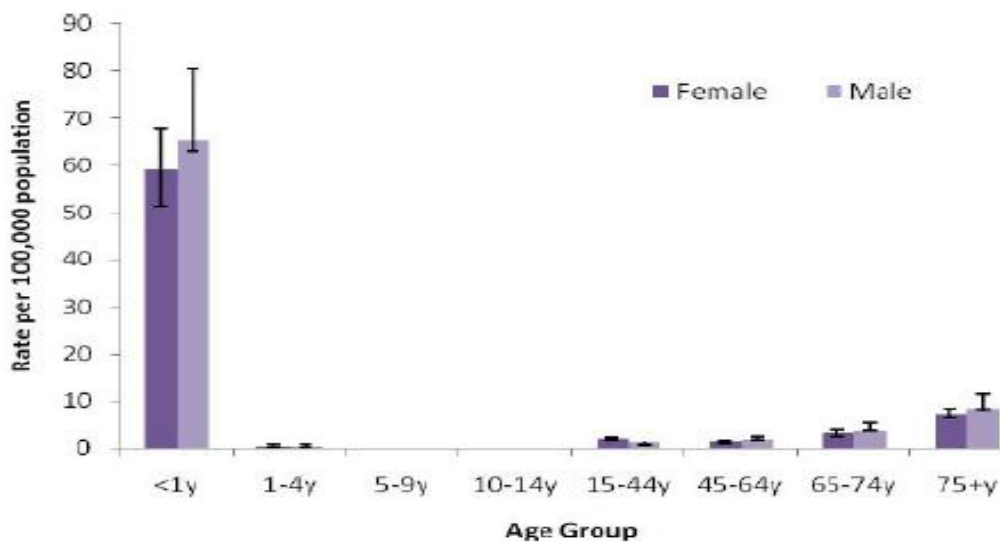


Figura 2. Índices específicos por edad de bacteriemia causada por *Streptococcus agalactiae*: Inglaterra, Gales e Irlanda del Norte, 2009.

Tomado de Health Protection Agency, 2010

A principios de la década de los noventa, tres estudios de vigilancia llevados a cabo en Estados Unidos reportaron un incremento de 2.4 a 4.4 casos por cada cien mil habitantes en la incidencia de enfermedades causadas por GBS invasivo en relación a las dos décadas previas. Tres años después, también se reportaron incrementos en la incidencia de enfermedades en hospitales. Los datos iniciales

se concentraban en 0.53 por cada mil admisiones en los años de 1993 a 1994 con un incremento a 0.96 por cada mil admisiones en los años de 1999 a 2000. Los casos de bacteriemia también se vieron incrementados de 0.15 a 0.42 casos por cada mil admisiones en el mismo periodo de tiempo considerado en el estudio previo (Blancas et al., 2004).

En el caso de adultos no gestantes, entre los años 1990 y 2007 la incidencia de enfermedades causadas por el microorganismo se vio duplicada pasando de 3.6 por cada cien mil personas en 1990 a 7.3 por cada cien mil personas en 2007.

Los cuadros clínicos más comunes causados por la bacteria en pacientes adultos no gestantes hasta 2009 fueron: bacteriemia sin foco infeccioso con un índice del 39.3% de los casos totales, infecciones de tejido blando e infecciones dérmicas el 25.6% seguido por neumonía con el 12.6% (Skoff et al., 2008).

En países sub-desarrollados como China y Brasil, se reconoció a *Streptococcus agalactiae* como un factor principal en el desarrollo de enfermedades neonatales durante la década de 1970. Este con el consiguiente método de tratamiento para pacientes infectados lograron reducir la tasa de mortalidad del 20 o 50% al 5%. Aunque también se ha reportado un incremento en la incidencia, de 3.5 por cada 100 000 habitantes en el año de 1999 a 5.0 por cada 100 000 habitantes en el año 2005, de las enfermedades invasivas causadas por *Streptococcus agalactiae* en adultos mayores a sesenta y cinco años de edad (Phares et al., 2008). Sin embargo, en países en vías de desarrollo como India y Brasil el patrón de infecciones causadas por *Streptococcus agalactiae* no es clara ni se ha sido correctamente descrita, por lo que es necesario estudiar la distribución, incidencia y prevalencia de las enfermedades causadas por *Streptococcus agalactiae* con el fin de establecer un plan de intervención en contra de las mismas (Johri et al., 2013).

2.1.3 Transmisión y factores de riesgo

El *Streptococcus* beta hemolítico del grupo B es una bacteria comúnmente encontrada en hombres y mujeres de todas las edades. Las personas que se encuentran colonizadas por GBS son llamadas portadoras y se refiere al estado en el que la bacteria se encuentra en el organismo sin causar ningún tipo de enfermedad, síntomas o infección. La colonización por *Streptococcus agalactiae* puede darse de forma intermitente siendo más frecuente en el tracto gastrointestinal y el tracto génito-urinario tanto en hombres como en mujeres, aunque el tracto genital femenino es más comúnmente colonizado (Shaw, Mason, & Scoular, 2003). Dado a que *Streptococcus agalactiae* generalmente se encuentra en vagina y/o recto de mujeres colonizadas, una de las formas de transmisión puede ser el contacto sexual. Sin embargo, *Streptococcus agalactiae* no causa síntomas ni afecciones por lo que no es considerado como una enfermedad de transmisión sexual sobre todo porque su incidencia es del 13 al 17% en adultos que no han tenido relaciones sexuales (Manning et al., 2004).

Cuando se trata de una infección temprana, *Streptococcus agalactiae* es transmitido de madre a bebé durante las fases de labor de parto y parto. Por otro lado, si se trata de una infección tardía, la bacteria puede provenir de un foco infeccioso diferente al canal de parto. Puede darse el caso de que una madre no diagnosticada sea la causa para el desarrollo de una infección tardía en el bebé. En estos casos la determinación del foco infeccioso es difícilmente encontrado e incluso puede suceder que se mantenga desconocido (Centers for Disease Control and Prevention, 2016a).

Actualmente existen seis condiciones o factores de riesgo que se encuentran involucrados en una mayor predisposición para el desarrollo de una infección temprana en infantes:

- Madre previamente tuvo un bebé que desarrolló una infección con la bacteria.

- Diagnóstico clínico positivo para la presencia de *Streptococcus agalactiae* en la orina como en el hisopado rectal de la madre durante el embarazo.
- Madre que presenta fiebre superior a 37.8°C durante la labor de parto.
- Labor de parto o ruptura del saco embrionario previa la finalización de la semana treinta y siete de gestación.
- Ruptura del saco embrionario al menos 18 horas previo el parto (Steer et al., 2012).

En el caso de las infecciones tardías, los factores de riesgo pueden variar dependiendo del periodo de gestación en el que se efectúa el parto. Cabe recalcar, que los patrones de patogenicidad son diferentes en el caso de infecciones tempranas e infecciones tardías, por lo que estos deben ser estudiados de forma independiente (Berardi et al., 2012)

2.2 Diagnóstico y tratamiento

2.2.1 Recolección de muestra

El muestreo para todos los métodos de diagnóstico se hace mediante hisopado en la región de infección, generalmente vagina y recto. Durante el año 2002, la guía del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (*Centers for Disease Control and Prevention*) presentó de forma detallada la manera en la que el hisopado debía ser realizado, especificando que se debe ser desde la parte baja de la vagina hacia el esfínter anal (Ahmadzia & Heine, 2014). El muestreo es realizado por un médico especialista, aunque se ha comprobado que el muestreo realizado por pacientes tiene un alto grado de similaridad con las muestras obtenidas por los médicos especialistas con un 98.4% de sensibilidad (Ayra, Cryan, O'Sullivan, Greene, & Higgins, 2008).

Si existe la sospecha de que el neonato se encuentra infectado, la muestra se toma del torrente sanguíneo o del líquido cefalorraquídeo para proceder con el

análisis de turbidez, tinción Gram y cultivo de la muestra para posterior análisis con pruebas bioquímicas. (Mayo Clinic, 2016).

2.2.2 Métodos diagnósticos

El diagnóstico se basa en el método de cultivo o por PCR a tiempo real (qPCR). Sin embargo, los métodos a base de qPCR no se encuentran disponibles en todos los hospitales. Razón por la cual se ha establecido al método de cultivo como “*gold standard*” (Hordnes, Stray- Pedersen, Øian, & Brigsten, 2007).

2.2.2.1 Métodos a base de cultivo

El “*gold standard*” se realiza un cultivo de la muestra en medios enriquecidos como agar de cordero o Agar Columbia- Colistina- Nalidixina (CNA). Después se identifica como *Streptococcus agalactiae* en base a la morfología, coloración y/o tinción Gram (American Association for Clinical Chemistry, 2015). Este método generalmente demora un de 24 a 49 horas (American Pregnancy Association, 2017).

2.2.2.1.1 Prueba CAMP

Este método detecta una proteína extracelular denominada “Factor CAMP” que es producida por *Streptococcus agalactiae*. El Factor CAMP es difusible, termodinámicamente estable e impulsa la hemólisis de eritrocitos producidos por *Staphylococcus aureus*. La proteína del factor CAMP actúa de forma sinérgica con la beta hemolisina producida por *Staphylococcus aureus* induciendo la hemólisis de las células sanguíneas bovinas o de cordero (Pokhrel, 2015).

Para realizar la prueba, una cepa hemolítica de *Staphylococcus aureus* se coloca en el medio del agar en disposición de una línea recta. Perpendicularmente a esta cepa se coloca la muestra que se está probando. Se interpreta como un resultado positivo cuando en el plato de cultivo se ha generado una hemólisis en

forma de flecha en la conjuntura de crecimiento entre la cepa de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. Si la muestra no corresponde a *Streptococcus agalactiae*, no se genera un incremento hemolítico y consecuentemente no se genera una flecha en la conjuntura de los dos cultivos (Rao, 2009) (Figura 3)

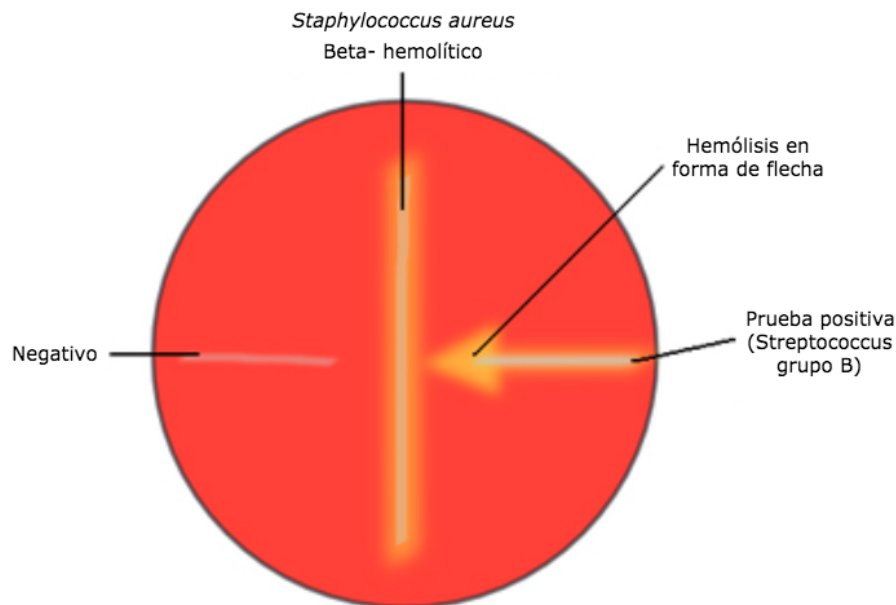


Figura 3. Interpretación de prueba CAMP para la identificación de *Streptococcus agalactiae*.

Adaptado de Rao, S., 2009

2.2.2.2 Métodos a base de PCR

Los métodos basados en PCR a tiempo real no son específicos para el diagnóstico de *Streptococcus agalactiae*, sino que son utilizados para la detección de múltiples cuadros clínicos. Uno de estos ellos es LightCycler® de ©Roche Molecular Systems, Inc. Este equipo cuenta con varios sistemas para la identificación de genes, nivel de expresión, variaciones genéticas e identificación de SNPs. Un estudio demostró que la combinación de LightCycler® con el instrumento MagNa Pure Compact® utilizado para la purificación de ácidos

nucleicos es un aceptable para la detección de *S. agalactiae* en muestras de hisopado vágino-rectal tomadas por médicos especialistas (Uhl et al., 2005).

El mecanismo Xpert® de Cepheid. Es eficiente para la detección de *Streptococcus* beta hemolítico de grupo B en muestras de hisopados vaginales y rectales con una sensibilidad del 98.5% y una especificidad del 99.6% (Helali, Nguyen, Ly, Giovangrandi, & Trinquart, 2009). También es eficiente para muestras de líquido amniótico proveniente de mujeres con ruptura de membrana prematura con una sensibilidad reportada del 92.3% y especificidad del 84.6% (Bourgeois et al., 2013).

Recientemente se ha probado el método de ARIES® de Luminex® para el diagnóstico de *Streptococcus agalactiae*. El cual usa qPCR a partir de cultivos enriquecidos en caldo LIM de *Streptococcus agalactiae* de hisopados vágino-rectales de mujeres en estado de gestación (Luminex Corporation, 2017).

2.2.3 Gen *scpB* para identificación de *Streptococcus agalactiae*

El gen *scpB* codifica para la proteína de superficie C5a peptidasa. Esta es una proteasa que actúa como un factor de virulencia multifuncional (Burnham & Tyrrell, 2003).

Se ha identificado que el gen *scpB* no es específico de un solo serotipo de *Streptococcus agalactiae*, sino que se encuentra presente en todos los tipos independientemente del serotipo en el que se ha sido clasificado. La proteína C5a peptidasa actúa durante el proceso infeccioso mediante inactivando la quimiotoxina de los neutrófilos (Burnham & Tyrrell, 2003). Esta característica ha hecho que el gen *scpB* sea ideal para la identificación directa de *Streptococcus agalactiae* por sobre los métodos que utilizan el gen codificante para 16S rRNA que poseen todos los microorganismos bacterianos. A pesar de que el gen codificante para la región 16S rRNA y la región de espacio intergénico 16S-23S también son utilizadas para la identificación directa por reacción en cadena de la

polimerasa, de varias especies de bacterias, el alto grado de homología entre los operones ribosomales entre especies puede conllevar a la obtención de falsos positivos (Dmitriev et al., 2004).

Por esta razón, el gen *scpB* se ha utilizado en varios estudios de identificación de *Streptococcus agalactiae* ya sea en comparación con otros genes de la bacteria o en comparación con el método de cultivo determinado como “*gold standard*”. En 2010, el estudio del grupo de Sarah Shabayek reportó que el método de amplificación del gen *scpB* por reacción en cadena de la polimerasa tenía un 100% de sensibilidad en comparación con el método tradicional de cultivo. Además, reportó una especificidad del 93.75% el cual era superior al 92.85% reportado para el método de amplificación del gen *cfb* (Shabayek et al., 2010). En 2016, un estudio demostró la superioridad del gen *scpB* por sobre los genes 16S rRNA, *cfb* y *atr* con un 95.21% y un 92.61% de especificidad y eficiencia respectivamente (Mousavi, Hosseini, Mashouf, & Arabestani, 2016).

2.2.4 Tratamiento

Se ha demostrado que el tratamiento temprano en base a profilaxis con antibióticos puede reducir considerablemente los índices de morbilidad y mortalidad (Larsen & Sever, 2008). Por esta razón la profilaxis intra-parto es recomendada para mujeres embarazadas con el fin de reducir la transferencia vertical del microorganismo hacia el neonato (Garland et al., 2011).

Los antibióticos del grupo de betaláctamicos, específicamente, penicilina y ampicilina son los más utilizados para el tratamiento de las infecciones, seguidos por cefalosporinas de primera generación y en ciertas ocasiones, vancomicina. En caso de que el paciente presentara algún tipo de reacción alérgica o anafilaxis a la penicilina, se administran macrólidos y lincosamidas, en especial, eritromicina y clindamicina (Bolukaoto et al., 2015). La penicilina, ampicilina, eritromicina o clindamicina en la profilaxis solo funcionan si son administradas durante el parto. Si su administración es realizada en etapas más tempranas del

embarazo, la bacteria puede volver a proliferar haciendo que el tratamiento sea inútil (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2015).

El tratamiento durante el parto con antibióticos puede prevenir el desarrollo de infecciones tempranas en neonatos. Sin embargo, este método de profilaxis no puede prevenir el desarrollo de infecciones tardías en infantes (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2015).

2.3 Sensibilidad a antibióticos

2.3.1 Situación de riesgo

El incremento en la utilización del método de profilaxis intra- parto ha sido motivo de preocupación debido a los recientes reportes sobre el desarrollo de resistencia a agentes antimicrobianos por parte del microorganismo en cuestión (Verani, McGee, & Schrag, 2010). A pesar de que aún se considera a la penicilina y ampicilina como el tratamiento idóneo para prevenir las infecciones, en 2008 en Japón se describió el primer reporte de reducción en las concentraciones inhibitorias mínimas de susceptibilidad a penicilina, y consecuentemente ampicilina (Kimura et al., 2008).

Adicionalmente recientes estudios a nivel mundial reportan un incremento progresivo en la resistencia, de *Streptococcus agalactiae*, a eritromicina y clindamicina (Figura 4), antibióticos que se utilizan como tratamiento alternativo (Garland et al., 2011).

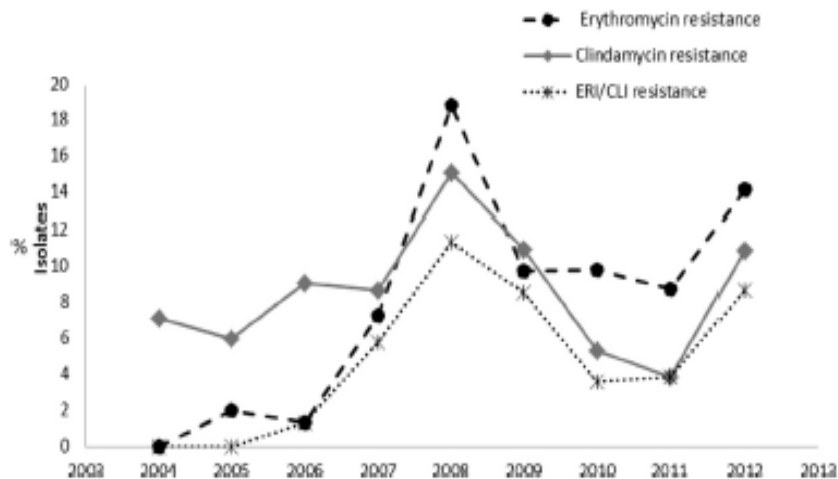


Figura 4. Incremento en la resistencia a eritromicina y clindamicina desde el año 2001 hasta 2012.

Tomado de Crespo, M., Castañeda, C., Recalde, M., & Vélez, 2014

La eritromicina es un antibiótico del grupo de los macrólidos y se caracteriza por contener un anillo de lactona al que se unen varios azúcares. Su mecanismo de acción consiste en el enlace a la subunidad ribosomal 50s. El enlace ocurre en un sitio cercano a la peptidiltransferasa inhibiendo los procesos de translocación, formación de enlaces peptídicos y liberación del oligopeptidil- tRNA durante la síntesis de proteínas en la bacteria (O' Connor, 2004). A pesar de que se describe como bacteriostáticos puede tener efecto bactericida en altas concentraciones. Varios microorganismos han desarrollado resistencia a la eritromicina y otros compuestos macrólidos, generando mutaciones de uno o varios nucleótidos del sitio de unión del antibiótico (Jelić & Antolović, 2016).

Por otro lado, la clindamicina es un antibiótico del grupo de las lincosamidas y se caracteriza por estar formada a base de compuestos semi naturales que tienen un aminoácido y un residuo de prolina unidos a un anillo galactosídico por medio de un enlace peptídico. Es un derivado semi sintético de la lincomicina con una leve modificación estructural que incrementa significativamente la afinidad por el sitio de unión bacteriano (Canu & Leclercq, 2009).

A diferencia de la eritromicina, la clindamicina tiene la capacidad de alcanzar el centro de la peptidil-tRNA causando la completa disociación del mismo con dos, tres o cuatro residuos aminoacídicos (Tenson, Lovmar, & Ehrenberg, 2003). Los microorganismos con resistencia a clindamicina utilizan la modificación del compuesto antibiótico (Morar, Bhullar, Hughes, Junop, & Wright, 2009).

2.3.2 Mecanismos moleculares de resistencia a antibióticos

La capacidad de los microorganismos para utilizar diferentes estrategias con el fin de reducir o anular completamente el efecto de los agentes antibióticos se encuentra codificada genéticamente.

2.3.2.1 Resistencia intrínseca

Es la resistencia a agentes antibióticos que se encuentra codificada y consecuentemente expresada por todos o por la gran mayoría de microorganismos pertenecientes a una misma especie. Describe la capacidad de diferentes bacterias para resistir a uno o varios grupos de compuestos antimicrobianos. Esta característica que comúnmente se denomina “insensibilidad” debido a que ocurre en microorganismos bacterianos que jamás han sido susceptibles a un grupo de antibióticos en particular (Breslin et al., 2011).

La resistencia intrínseca de una bacteria hacia un grupo de antibióticos puede ocurrir por cuatro fenómenos:

- Ausencia total o parcial de afinidad entre la diana y el agente antibiótico
- Incapacidad del compuesto antibiótico para ingresar en la célula bacteriana. Frecuentemente asociado con la permeabilidad de la membrana celular, mientras más flexible sea la membrana externa de la bacteria, más permeable es la misma. Se ha estimado que el péptidoglicano de las bacterias Gram positivas otorga un alto nivel de

permeabilidad y es accesible a moléculas que tienen un tamaño variable entre 30 y 57 kDa.

- Extrusión del compuesto antimicrobiano por complejos exportadores activos, también denominados como bombas de eflujo, los genes codificadores para este mecanismo se encuentran presentes en los cromosomas de todos los organismos vivos. Esto incluye a aquellos que son incapaces de producir antibióticos, por lo que se ha planteado que las bombas de eflujo cumplen más funciones a parte de la resistencia a antibióticos. Pueden ser sustrato específicas y exportar una sola molécula o pueden abarcar un espectro amplio y exportar varias moléculas estructuralmente diferentes.
- Producción innata por parte de la bacteria de compuestos inhibidores del agente microbiano (Cox & Wright, 2013).

2.3.2.2 Resistencia adquirida

Las bacterias reaccionan de forma distinta cuando se encuentran expuestas de forma continua a los compuestos antimicrobianos. La resistencia adquirida de una bacteria es dependiente tanto de la especie como de la combinación de agentes antimicrobianos a la que se encuentra expuesta (Anderson, 2004). Se efectúa por mutaciones en genes cromosómicos o por transferencia horizontal de genes ya sea en plásmidos, transposones o integrones (Breslin et al., 2011).

La resistencia a agentes antimicrobianos que se han generado por mutaciones en uno o varios genes localizados en el cromosoma del microorganismo se denomina resistencia cromosomal (Zhang, 2010). Sus mecanismos son:

- Modificaciones de la pared o membrana celular que impide que el antibiótico alcance la diana.
- Desarrollo de eflujos de resistencia continuos desde la célula bacteriana.
- Modificación enzimática del compuesto antibiótico.
- Degradación parcial o total del agente antimicrobiano.

- Adquisición y desarrollo de rutas metabólicas alternativas a las que normalmente afecta el agente antimicrobiano.
- Modificación de las dianas del compuesto antibiótico.
- Sobreproducción de las enzimas que se ven afectadas por el agente antimicrobiano (Van Hoek et al., 2011).

Se denomina transferencia horizontal de genes al proceso mediante el cual bacterias intercambian material genético. Durante este proceso, se puede dar el traspaso de genes de resistencia a antibióticos. Varios genes de resistencia se encuentran localizados en plásmidos, transposones e integrones, elementos que actúan como vectores cuando son transferidos de una bacteria a otra independientemente de las especies que realicen la transferencia. El fenómeno de transferencia horizontal de genes se puede llevar a cabo por cualquiera de los tres mecanismos ya sea transformación, transducción o conjugación (Breslin et al., 2011).

2.3.3 Fenotipo MLS_B

Los antibióticos de los grupos de macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B tienen diferentes estructuras químicas, sin embargo, se encuentran dentro de una misma clasificación que se denomina MLS_B o MLS debido a que inhiben la síntesis de proteínas como mecanismo de acción. Además la resistencia a estos grupos puede generarse de forma cruzada por la modificación de la diana que es la porción 23S rRNA del ribosoma (Malbruny, Werno, Murdoch, Leclercq, & Cattoir, 2011).

El fenotipo MLS_B tiene diferentes formas de expresión según la susceptibilidad que presenta la bacteria que se está analizando y puede ser constitutivo (cMLS) o inducible (iMLS). Al realizar pruebas de susceptibilidad a antibióticos en agar selectivo, los discos de eritromicina y clindamicina se colocan en proximidad. Se considera que la resistencia es cMLS cuando la muestra presenta resistencia tanto a eritromicina como a clindamicina mientras que el fenotipo iMLS se

presenta como susceptibilidad a clindamicina y resistencia a eritromicina (Sasirekha et al., 2014).

Cuando las muestras de *Streptococcus agalactiae* presentan resistencia a eritromicina y susceptibilidad a clindamicina, la prueba se completa con el análisis de la zona D. Si la muestra de presenta el fenotipo MLS inducible, se generará un halo de resistencia alrededor del disco de clindamicina en forma de D con la zona de inhibición atenuada en dirección al disco de eritromicina (Figura 5). El análisis de la zona D confirma que la cepa de presenta el fenotipo iMLS, es decir que tiene resistencia inducible a clindamicina, por lo que el suministro de este antibiótico resultara ineficiente para el tratamiento de la infección. (Heelan et al., 2004).

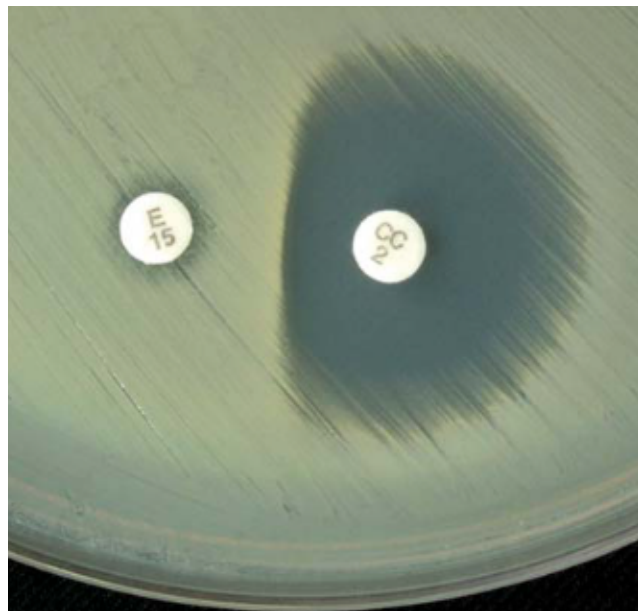


Figura 5. Prueba de zona D para *Streptococcus agalactiae*. Zona de inhibición en forma de D alrededor del disco de clindamicina con atenuación hacia el disco de eritromicina

Tomado de Abarzúa et al., 2011

Si las cepas presentan resistencia a eritromicina y susceptibilidad a clindamicina, pero no se genera ningún tipo de atenuación en la zona de inhibición de eritromicina, se considera que la muestra presenta el fenotipo M comúnmente

asociado con un mecanismo de eflujo de resistencia. Por otro lado, se considera que las cepas presentan el fenotipo L si son resistentes a clindamicina y susceptibles a eritromicina (Bolukaoto et al., 2015).

2.3.4 Genes involucrados en la resistencia a antibióticos en *Streptococcus agalactiae*.

2.3.4.1 Gen *mreA*

El gen *mreA* fue por descrito por primera vez debido a una cepa de *Streptococcus agalactiae* que presentaba resistencia a macrólidos de catorce, quince y dieciséis átomos. La cepa estudiada no contenía genes del tipo *emf* ni *erm* por lo que la totalidad de su DNA genómico fue extraído y clonado en λ Zap II. El vector pAES63 albergando el DNA genómico del microorganismo fue introducido en *Escherichia coli*. El resultado de esta experimentación fue la obtención de *Escherichia coli* resistente a eritromicina, azitromicina y espiramicina. Fue así que se determinó al gen *mreA* como codificante para un mecanismo de eflujo de resistencia a macrólidos en *Streptococcus agalactiae*. En este estudio también se describió que el gen *mreA* era distinto al gen *Mef* descrito en *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*, y al gen *MsrA* descrito en *Staphylococcus aureus* (Clancy, Dib-Haji, Petitpas, & Yuan, 1997).

Sin embargo, en el año 2001 un estudio describió que el gen *mreA* no era codificante para una bomba de eflujo de resistencia, sino que el mismo cumplía funciones fisiológicas en las rutas metabólicas de *Streptococcus agalactiae* y fue descrito como un gen “housekeeping” codificador para flavoquinasa (Clarebout, Villers, & Leclercq, 2001). Esto llevó a que se utilice el gen *mreA* como control interno para estudios en *Streptococcus agalactiae* (Fitoussi et al., 2001).

A lo largo de los siguientes años, el gen *mreA* ha sido evaluado como gen de resistencia a macrólidos. Sin embargo, varios estudios han reportado la presencia del gen *mreA* en muestras de *Streptococcus agalactiae* sensibles a

eritromicina (Duarte et al., 2005). Uno de los estudios más recientes también estudia al gen *mreA* como codificante para bomba de eflujo a macrólidos y no reporta que el gen sea “housekeeping” como había sido descrito previamente (Oday, Neihaya, & Munim, 2015).

2.3.4.2 Gen *ermB*

La resistencia a macrólidos como la eritromicina y el fenotipo de resistencia cruzada MLS_B se encuentra estrechamente ligado a la presencia del gen *ermB* (Garland et al., 2011). Este gen pertenece al grupo de genes ‘erm’ descritos como genes de resistencia a macrólidos. El gen *ermB* es el más común en *Streptococcus agalactiae* y codifica para la metilasa 23S rRNA que es una proteína responsable del proceso de metilación de los receptores ribosomales que actúan como receptores tanto de eritromicina como de clindamicina (Oday et al., 2015).

Es por esta razón que la resistencia a eritromicina, así mismo como la resistencia cruzada a clindamicina de forma inducible (iMLS) en *Streptococcus agalactiae* ha sido principalmente relacionada con la presencia del gen *ermB* por varios autores (Lu et al., 2014).

3. Diseño del plan experimental

El desarrollo de la investigación planteada consiste en cuatro fases experimentales divididas en: identificación molecular por PCR del gen de detección *scpB*, identificación molecular por PCR del gen de resistencia *mreA*, identificación molecular por PCR del gen de resistencia *ermB* y análisis de susceptibilidad a antibióticos mediante el sistema Vitek 2 de Biomériux® (Figura 6).

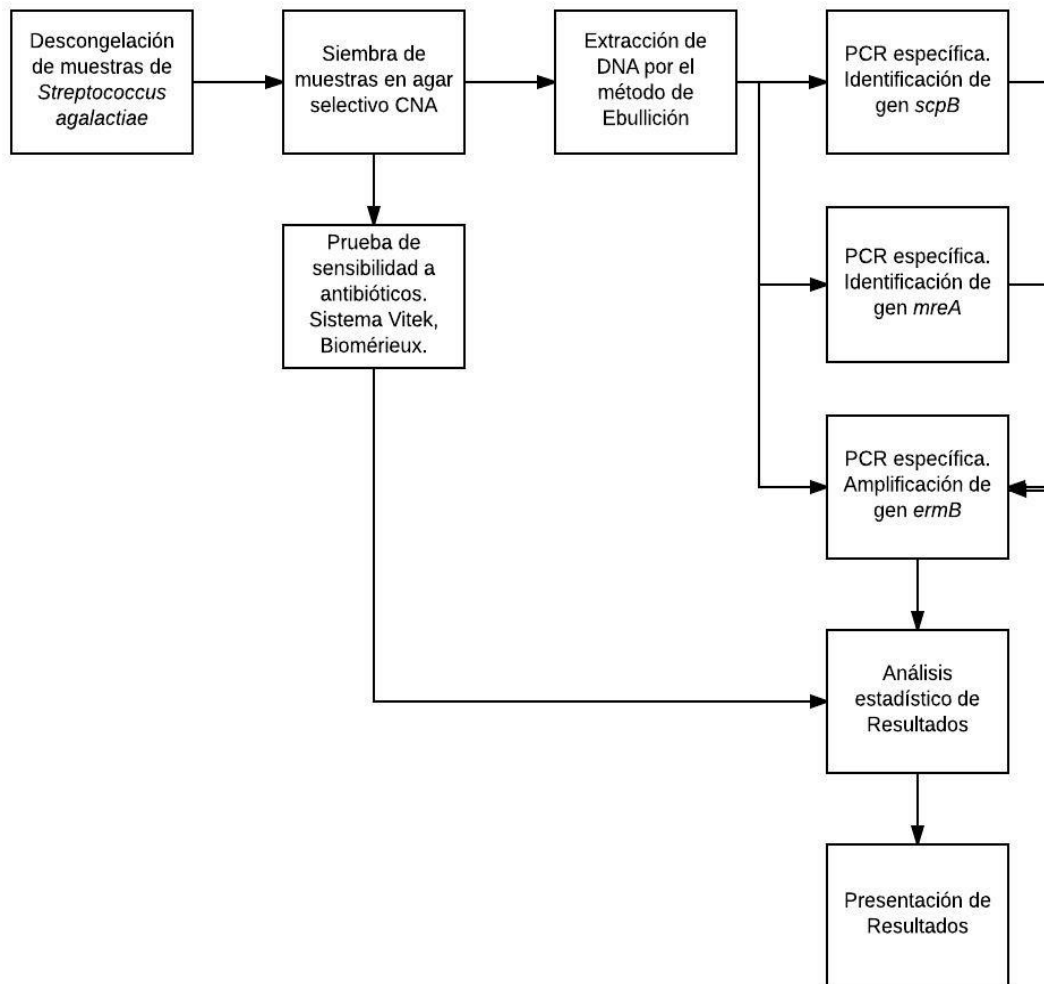


Figura 6. Diagrama de proceso del plan experimental para el desarrollo de la investigación planteada.

4. Procedimientos

La presente investigación se realizó en las instalaciones de Zurita & Zurita Laboratorios, ubicadas en la Av. La Prensa y Manuel Valdiviezo en la parroquia de la Concepción en la ciudad de Quito, Ecuador.

4.1 Población y muestra

Se analizó un total de 132 muestras de *Streptococcus agalactiae* correspondientes a pacientes previamente diagnosticados con colonización y/o infección desde el año 2012 hasta 2016 (Anexo 3).

4.1.1 Distribución de muestras

4.1.1.1 Clasificación por año

De las ciento treinta y dos muestras analizadas:

- Seis corresponden al año 2012
- Veinte y dos corresponden al año 2013
- Treinta y seis corresponden al año 2014
- Treinta y dos corresponden al año 2015
- Treinta y seis corresponden al año 2016

4.1.1.2 Clasificación por género y edad

De las ciento treinta y dos muestras analizadas, ciento once corresponden a mujeres, veinte corresponden a hombres y existe una muestra sin identificación de género. La edad mínima, de los pacientes fue de cuatro años de edad y la máxima de ochenta y ocho años.

4.1.1.3 Clasificación por tipo de muestra

De las ciento treinta y dos muestras analizadas:

- Ochenta y nueve fueron de secreción vaginal
- Veinte fueron de orina
- Cuatro fueron de líquido seminal
- Tres fueron de secreción uretral
- Tres fueron de secreción peneana

- Dos fueron de amígdala
- Dos fueron de secreción de glánde

Los restantes corresponden a una sola muestra de absceso de pierna, herida quirúrgica, hisopado rectal, lesión de pierna, secreción de prepucio, secreción de seno, secreción rinofaríngea, tejido blando y una muestra sin identificación de origen (Anexo 3).

4.2 Materiales y métodos para la obtención de datos

4.2.1 Descongelamiento de muestras y siembra

Los viales con las muestras almacenadas a -4°C fueron descongeladas mediante exposición a temperatura ambiente por diez minutos. Acabado este tiempo, se tomaron $10\mu\text{L}$ de cada muestra con un asa de siembra estéril y calibrada y fueron sembrados en agar selectivo CNA por el método de estriado simple. Se dejaron incubar por 24 horas a 35°C .

Las muestras que no mostraron crecimiento bacteriano, fueron colocadas en caldo TSB e incubadas por 24 horas a 35°C , para estimular el crecimiento. Transcurrido el tiempo, se tomaron $10\mu\text{L}$ del caldo TSB con un asa estéril calibrada y se sembraron en CNA. Las cuales fueron incubadas nuevamente por 24 horas a 35°C .

4.2.2 Extracción de DNA total

El DNA total de cada muestra se extrajo por el método de ebullición. El cual consistió en tomar la muestra sembrada en el agar CNA y suspenderla en 1mL de agua destilada estéril en un tubo eppendorf de 1.5mL estéril. La primera solución se sometió a rotación en vórtex por dos segundos y seguidamente fue colocada en centrifugación a 14 000rpm por un minuto. Del resultante, se desechó el sobrenadante y se conservó el pellet.

El pellet fue resuspendido en 1mL de agua destilada estéril y mezclado por pipeteo durante dos segundos. La segunda solución fue de nuevo sometida a rotación en vórtex por dos segundos seguido de una nueva centrifugación a 14000rpm por un minuto. Del resultante de la segunda centrifugación, se desechó el sobrenadante y se conservó el pellet. Este fue resuspendido en 300 μ L de agua destilada estéril y mezclado por pipeteo durante dos segundos. Tras la mezcla, la tercera solución fue colocada en la plancha de calentamiento a 96°C por diez minutos.

Terminado este tiempo, la solución fue sometida a centrifugación a 14 000rpm por 10 minutos. Del resultante, el sobrenadante, conteniendo el DNA, fue recuperado por pipeteo y transferido a un nuevo tubo eppendorf estéril de 2mL y almacenado a -20°C.

4.2.3 Hidratación de primers y preparación de solución de trabajo

Los primers liofilizados de ©Invitrogen 100Mm fueron hidratados con agua Milli-Q® con el volumen indicado por la casa comercial. Los viales fueron mezclados mediante centrifugación y almacenados a -20°C.

Para la solución de trabajo se diluyeron 10 μ L de la solución madre de primers en 90 μ L de agua estéril y se almacenó a -4°C.

4.2.4 Amplificación de genes por reacción en cadena de la polimerasa y electroforesis

4.2.4.1 Amplificación del gen de identificación *scpB*

4.2.4.1.1 Programa de PCR

El gen fue amplificado mediante PCR a tiempo final con el programa y las condiciones detallados en Tabla 1. Para la amplificación se utilizó GoTaq®

Green Master Mix de ©Promega Corporation y el equipo termociclador CFX96™ Real Time System de BioRad®. Para el control positivo se utilizó una muestra con previa amplificación del mismo gen. Los controles negativos consistieron en una muestra de *Staphylococcus aureus*, una muestra de *Escherichia coli* y una muestra sin DNA molde cuyo volumen en reacción fue compensado con agua estéril.

El conjunto de primers utilizados para la amplificación del gen fueron scpB-F: Forward, 5' -ACAACGGAAGGCGCTACTGTTC- 3' y scpB-R: Reverse, 5' -ACCTGGTGTGTTGACCTGAACTA- 3' (Dmitriev et al., 2004).

Tabla 1.

Concentraciones de reactivos y condiciones térmicas utilizadas en el programa de PCR para la amplificación del gen scpB.

Reactivos PCR	Concentración	Perfil térmico		
Buffer pH 8.5	2X	Desnaturalización inicial	94°C	5min
MgCl ₂	3mM	35 ciclos		
Primer Forward	0.5µM	Desnaturalización	94°C	1min
Primer Reverse	0.5µM	Hibridación	52°C	1min
dNTPs	400µM c/u	Extensión	72°C	1min
Taq Polimerasa	1.5U/Rx			
DNA molde	3ng/Rx	Extensión final	72°C	1.5min
Agua	8.5µL/Rx	Tiempo total de corrida	3:01:00	
Volumen final	25µL	Finalización	4°C	∞

Adaptado de: Dmitriev, Suvorov, Shen & Yang, 2004.

Terminado el programa de PCR, el producto fue almacenado a -4°C por 24 horas.

4.2.4.1.2 Programa de electroforesis

Se prepararon geles de agarosa al 1%, con UltraPure™ Agarose de Invitrogen™, en una solución de TBE 1X (UltraPure™ TBE Buffer de Invitrogen™). Cada gel contenía 4µL de SYBR™ Safe DNA Gel Stain de Invitrogen™.

El primer pocillo del gel fue cargado con 2µL del marcador de peso molecular TrackIt™ 100bp DNA Ladder de Invitrogen™. Los pocillos siguientes fueron cargados con 8µL de cada producto de PCR. El programa de electroforesis se realizó a 120V y 400Ah durante 30 minutos. El gel fue visualizado en un transiluminador UV.

4.2.4.2 Amplificación del gen de resistencia *mreA*

4.2.4.2.1 Programa de PCR

El gen fue amplificado mediante PCR a tiempo final con el programa y las condiciones especificadas en Tabla 2. Para la amplificación de este gen se utilizó GoTaq® Green Master Mix de ©Promega Corporation y el equipo termociclador Gene Amp® PCR System 9700 de ©Applied Biosystems. Para el control positivo se utilizó una muestra previamente amplificada para el gen *mreA* y para el control negativo se utilizó una reacción sin DNA molde cuyo volumen fue reemplazado por agua estéril.

El conjunto de primers utilizados para la amplificación del gen fueron *mreA*-F: Forward 5'- AGACACCTCGTCTAACCTTCGCTC- 3' y *mreA*-R: Reverse 5'- TTCAGTTACTACCATGCCACAGG- 3' (Duarte et al., 2005).

Tabla 2.

Concentraciones de reactivos y condiciones térmicas utilizadas en el programa de PCR para la amplificación del gen mreA.

Reactivos PCR	Concentración	Perfil térmico		
		Buffer pH 8.5	2X	Desnaturalización inicial
MgCl ₂	3mM	25 ciclos		
Primer Forward	0.5µM	Desnaturalización	94°C	1min
Primer Reverse	0.5µM	Hibridación	53°C	1min
dNTPs	400µM c/u	Extensión	72°C	1min
Taq Polimerasa	1.5U/Rx			
DNA molde	3ng/Rx	Extensión final	72°C	5min
Agua	8.5µL/Rx	Tiempo total de corrida	01:49:00	
Volumen final	25µL	Finalización	4°C	∞

Adaptado de: Duarte, Bellei, Miranda, Brito & Teixeira, 2005.

Terminado el programa de PCR, el producto fue almacenado a -4°C por 24 horas.

4.2.4.2.2 Programa de electroforesis

Se utilizó gel de agarosa al 1% preparado con UltraPure™ Agarose de Invitrogen™ en una solución con TBE 1X (UltraPure™ TBE Buffer de Invitrogen™). Los geles preparados contenían 4µL de SYBR™ Safe DNA Gel Stain de Invitrogen™.

El primer pocillo del gel fue cargado con 2µL del marcador de peso molecular TrackIt™ 100bp DNA Ladder de Invitrogen™. Los pocillos siguientes fueron cargados con 8µL de cada producto de PCR. El programa de electroforesis se realizó a 120V, 400Ah durante 30 minutos. El gel fue visualizado en un transiluminador UV.

4.2.4.3 Amplificación del gen de resistencia *ermB*

4.2.4.3.1 Programa de PCR

El gen *ermB* fue amplificado por PCR a tiempo final con el programa de reacción y las condiciones especificadas en la Tabla 3. Para llevar a cabo la amplificación se utilizó GoTaq® Green Master Mix de ©Promega Corporation y el equipo termociclador CFX96™ Real Time System de BioRad®. Se utilizó una muestra previamente amplificada para el mismo gen como control positivo mientras que el control negativo consistió de una reacción de PCR sin DNA molde, cuyo volumen fue reemplazado por agua estéril.

Los primers utilizados para la amplificación fueron *ermB*- F: Forward 5'-GAAAAGGTACTCAACCAAATA- '3 y *ermB*- R: Reverse 5'-AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC- 3' (Duarte et al., 2005).

Tabla 3.

*Concentraciones de reactivos y condiciones térmicas utilizadas en el programa de PCR para la amplificación del gen *ermB*.*

Reactivos PCR	Concentración	Perfil térmico		
		Buffer pH 8.5	2X	Desnaturalización inicial
MgCl ₂	3mM	35 ciclos		
Primer Forward	0.5µM	Desnaturalización	93°C	1min
Primer Reverse	0.5µM	Hibridación	52°C	1min
dNTPs	400µM c/u	Extensión	72°C	1min
Taq Polimerasa	1.5U/Rx			
DNA molde	3ng/Rx	Extensión final	72°C	5min
Agua	8.5µL/Rx	Tiempo total de corrida	02:28:00	
Volumen final	25µL	Finalización	4°C	∞

Una vez terminado el programa de PCR, los productos recuperados fueron almacenados a -4°C durante 24 horas.

4.2.4.3.2 Programa de electroforesis

Se elaboraron geles de agarosa al 1% utilizando UltraPure™ Agarose de Invitrogen™ en una solución de TBE 1X (UltraPure™ TBE Buffer de Invitrogen™). Los geles contenían 4 μL de SYBR™Safe DNA Gel Stain de Invitrogen™.

El primer pocillo del gel fue cargado con 2 μL del marcador de peso molecular TrackIt™ 100bp DNA Ladder de Invitrogen™. Los pocillos siguientes fueron cargados con 8 μL de cada producto de PCR. El programa de electroforesis se llevó a cabo a 125V, 400Ah durante 55 minutos. El gel fue visualizado en un transiluminador UV.

4.2.5 Prueba CAMP

Previa a la prueba de susceptibilidad a antibióticos realizada por el sistema Vitek® de ©BioMérieux, las muestras con crecimiento inespecífico fueron sometidas a la prueba de identificación para *Streptococcus agalactiae* basada en el factor CAMP. Las colonias morfológicamente diferentes, fueron aisladas y sembradas en agar CNA e incubadas por 24 horas a 12°C .

Se sembró una cepa de *Staphylococcus aureus* hemolítica en agar sangre de cordero en forma lineal. Las muestras de prueba fueron sembradas en el mismo agar de forma lineal perpendicular a la cepa de *Staphylococcus aureus*. Las placas fueron incubadas a 35°C durante 24 horas.

Se determinó como resultado positivo y confirmación de *Streptococcus agalactiae*, a las muestras que habían formado una hemólisis en forma de flecha en el sitio de unión entre la cepa de prueba y la cepa de *Staphylococcus aureus*.

4.2.6 Análisis de sensibilidad a antibióticos mediante el sistema Vitek® 2 de ©BioMérieux

Las muestras fueron sembradas en agar CNA e incubadas por 24 horas a 35°C.

4.2.6.1 Preparación de la suspensión

Las colonias se transfirieron desde el agar CNA a 3mL de solución salina estéril en un tubo de prueba. La densidad de la suspensión se ajustó a la indicada por las guías del equipo, entre de 0.50 a 0.63 en la escala de McFarland (Pincus, 2006).

4.2.6.2 Inoculación

Las tarjetas de identificación se inocularon con la suspensión bacteriana utilizando el aparato de aspiración integrado del equipo. El tubo de prueba se colocó en un rack o cassette especial con la tarjeta de identificación correspondiente en el espacio vecino. El tubo de transferencia se colocó en el tubo de suspensión correspondiente (Figura 7). Los cassettes se transfirieron a la cámara de succión del equipo donde la suspensión bacteriana es transportada, a través del tubo de transferencia, hacia los micro-compartmentos que llenan los pocillos de prueba (Pincus, 2006).



Figura 7. Ilustración de cassette de Vitek® 2 cargado con diez tarjetas de identificación junto sus respectivos tubos de suspensión bacteriana.

Tomado de Pincus, D., 2006

4.2.6.3 Sellado de tarjetas e incubación

Las tarjetas inoculadas pasaron por un mecanismo que corta el tubo de transferencia y sella la tarjeta previa a la colocación en el carrusel de incubación. El carrusel incuba todas las tarjetas a $35.5^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$. Cada tarjeta es removida de la incubadora en carrusel una vez cada 15 minutos y transferida al sistema óptico del equipo para la lectura de resultados. Los datos son recolectados en intervalos de 15 minutos durante todo el periodo de incubación (Pincus, 2006). Los resultados entregados por la lectura del equipo fueron impresos en hojas individuales y transferidos a la base de datos del proyecto.

4.3 Evaluación estadística de los resultados

Para el análisis estadístico se utilizó Microsoft® Excel 15.32 ©2017 versión para MacOS Sierra versión 10.12.4.

4.3.1 Obtención de índices en porcentaje

4.3.1.1 Índices generales

Los índices generales de presencia o ausencia de los genes identificados se obtuvieron utilizando la función 'COUNT.IF' con las condiciones de 'negativo' y 'positivo' de forma separada. Los valores obtenidos fueron divididos para el total de muestras (n=132) y multiplicados por cien. Los resultados fueron colocados en gráficos de pastel simple con una sola cifra decimal.

La contabilización de fenotipos de resistencia a eritromicina y clindamicina se realizaron de forma independiente mediante la utilización de filtros en base a los fenotipos 'sensible' o 'resistente' con los casos de resistencia intermedia contabilizados con el total del fenotipo resistente. Del total de muestras bajo la descripción 'resistente' se utilizó un segundo criterio de filtro para la presencia de los genes *mreA* y *ermB* de forma independiente. El total de muestras que cumplieron con las condiciones de los dos filtros fue dividido para el número total de muestras que cumplieran el fenotipo de resistencia a los agentes antibióticos: eritromicina (n=37) y clindamicina (n=38) y multiplicados por cien. Los resultados fueron colocados en gráficos de pastel simples con una sola cifra decimal.

4.3.1.2 Índices por año

Las incidencias de los genotipos por año se obtuvieron mediante la separación de las muestras en base al año en el que fueron tomadas. Se utilizó la función 'COUNT.IF' con las condiciones 'positivo' y 'negativo' para los tres genes identificados. Los totales fueron divididos para el total de muestras obtenidas por año (ver inciso 4.1.1.2) y multiplicados por cien. Los resultados fueron colocados en gráficos de barras simples con una sola cifra decimal.

La obtención de los porcentajes de incidencia para los fenotipos de sensibilidad o resistencia por año se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito

anteriormente con la diferencia de las condiciones para la función 'COUNT.IF' que en este caso fueron 'sensible' o 'resistente'. Las muestras con fenotipos de resistencia intermedia fueron contabilizadas bajo la descripción de resistentes.

4.3.1.3 Incidencia por edad

Para obtener la incidencia por edad se formaron cinco grupos de edades en base al número de muestras contenidas en cada clasificación (Tabla 4)

Tabla 4.

Descripción de grupos de edad generados para análisis estadístico.

Grupo de edad (años)	Número de muestras por grupo
4 a 20	18
21 a 30	39
31 a 40	32
41 a 60	28
61 a 88	15

Según cada clasificación se utilizó la función 'COUNT.IF' con las condiciones 'positivo' o 'negativo' para la presencia del gen *scpB*. El total de resultados obtenidos bajo cada condición fue colocado en un solo gráfico de barras simple.

4.3.1.4 Incidencia por tipo de muestra

La obtención de la incidencia por tipo de muestra se realizó mediante la formación de cuatro grupos en base a los tres grupos predominantes de muestras (Tabla 5) y los restantes (ver inciso 4.1.1.3) clasificados en un solo grupo bajo la descripción 'otros'.

Tabla 5.

Descripción de los grupos por tipo de muestra utilizados en el análisis estadístico.

Tipo de muestra	Número de muestras por grupo
Secreción vaginal	89
Orina	20
Líquido seminal	4
Otros	19

Para cada clasificación se utilizó la función 'COUNT.IF' con las condiciones 'positivo' o 'negativo' para la presencia del gen *scpB*. El total de resultados obtenidos fueron colocado en un gráfico de barras simple.

4.3.1.5 Índice fenotípico total de resistencia a penicilina, ampicilina, eritromicina y clindamicina

Para la obtención de porcentajes según el fenotipo de resistencia a los cuatro antibióticos principales se utilizó la función 'COUNT.IF' bajo las condiciones 'sensible', 'resistente' o 'intermedio'.

En el caso de penicilina y ampicilina, los resultados totales obtenidos bajo cada condición fueron divididos para el número total de muestras (n=132) con las muestras que no contaban con identificación para el antibiótico (Tabla 6) colocadas bajo la descripción 'sin información' y multiplicados por cien.

En el caso de la eritromicina y la clindamicina, los resultados obtenidos bajo cada condición fueron divididos para el número de muestras que si contaban con identificación para los dos compuestos antibióticos (Tabla 6) y multiplicados por cien. Esta distinción se realizó debido a que los genes identificados están involucrados con la resistencia a eritromicina y clindamicina.

Tabla 6.

Número de muestras con identificación para cada compuesto antibiótico.

Agente antibiótico	Número de muestras con identificación
Penicilina	117
Ampicilina	128
Eritromicina	129
Clindamicina	129

Los porcentajes obtenidos en los cuatro casos fueron colocados en gráficos de pastel simples de forma independiente y con una sola cifra decimal.

4.3.1.6 Índice fenotípico total de resistencia a otros agentes antibióticos

Los porcentajes de resistencia fenotípica a los agentes antibióticos adicionales identificados por el sistema Vitek® 2 (ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, quinupristina/dalfopristina, linezolid, vancomicina, tetraciclina, tigeciclina y nitrofurantoína) fueron obtenidos mediante la función 'COUNT.IF' con las condiciones 'sensible' o 'resistente', los casos de resistencia intermedia fueron contabilizados bajo la condición de resistentes. El número total de resultados obtenido bajo cada condición fue dividido para el número total de muestras analizadas (n=132). Las muestras que no contaban con identificación para alguno de los agentes antibióticos fueron contabilizadas bajo la descripción 'sin información'. Los resultados fueron colocados de manera conjunta en un solo gráfico de barras simple.

4.3.2 Obtención de muestras con el fenotipo MLS_B

La determinación de las muestras que presentan el fenotipo MLS_B o MLS se realizó mediante la aplicación de dos filtros que identifican las muestras resistentes tanto para eritromicina como para clindamicina según los resultados arrojados por el sistema Vitek® 2.

La identificación de las cuatro clasificaciones fenotípicas (MLS inducible, MLS constitutivo, M y L) se determinó mediante la utilización de filtros que indicaran la relación de resistencia y sensibilidad a eritromicina con la resistencia y sensibilidad a clindamicina, según las características de cada clasificación (ver inciso 2.3.2). El número de muestras identificadas por cada fenotipo se detalla en el capítulo 5.

4.3.3 Análisis de varianza

Para el análisis de varianza se utilizó un ANOVA simple obtenido con el paquete 'análisis de datos' en Microsoft® Excel 1703 para Windows 10.

Se obtuvieron las medias de las concentraciones mínimas inhibitorias reportadas para eritromicina y clindamicina por cada año. La comparación se realizó entre eritromicina y clindamicina según los datos de los años 2012 a 2016.

5. Resultados y discusión

5.1 Identificación de genes por reacción en cadena de la polimerasa

5.1.1 Gen de identificación *scpB*

El gen *scpB* fue identificado mediante electroforesis con 255bp (Figura 8). Los controles negativos de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* no presentaron amplificación para el gen, lo que confirma que el gen *scpB* es único para *Streptococcus agalactiae* como lo describieron Dmitriev, Suvorov, Shen y Yang en 2004.

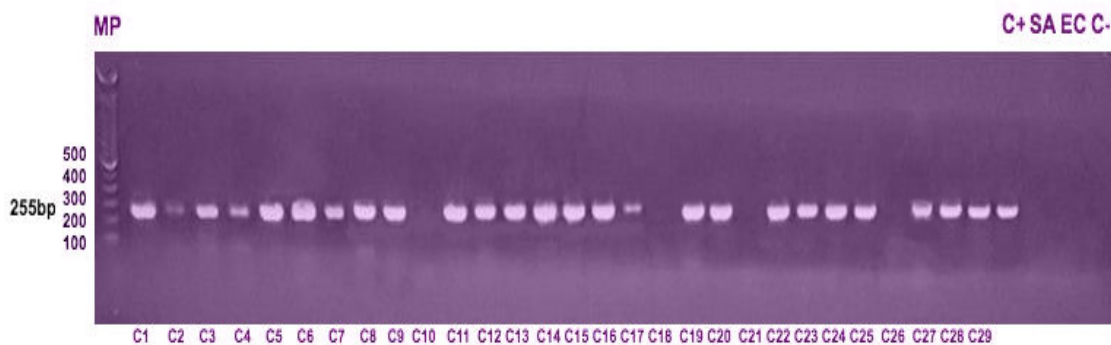


Figura 8: Productos de PCR con amplificación del gen *scpB* en gel de agarosa 1% visualizados en transiluminador UV.

MP: marcador de peso molecular

C+: control positivo//C-: control negativo

C1-C29: Muestras clínicas

SA: *Staphylococcus aureus*

EC: *Escherichia coli*

El gen *scpB* se encontró en ciento veinte y siete muestras, lo que corresponde al 96% de las muestras analizadas (n=132) (Figura 9) mientras que las cinco restantes, no presentaron amplificación para este.

Prevalencia total de gen *scpB*

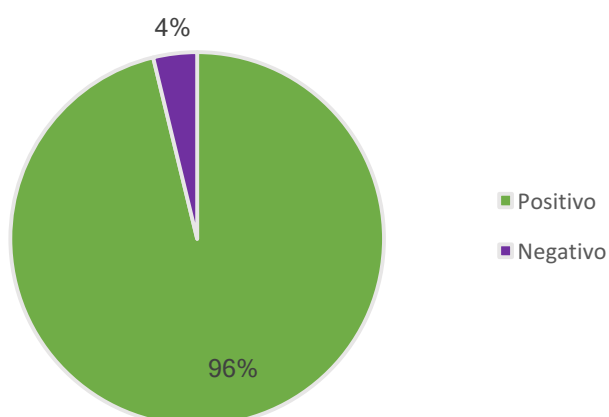


Figura 9. Diagrama de amplificación del gen *scpB*.

El gen *scpB*, codificante para la peptidasa C5a de superficie, normalmente actúa como un factor de patogenicidad y cumple con la función de inactivar la

quimiotoxina fagocítica C5a humana. Debido a que se ha detectado que todas las cepas de GBS producen esta proteína independientemente del serotipo, este gen es útil para identificar a la bacteria (Cheng, Stafslie, Sudha, & Cleary, 2002). Es por esto que se ha planteado utilizar este gen como blanco. Desde la investigación de Dmitriev en el año 2004 que determinó que el método de amplificación del gen *scpB* era superior al 'gold standard' (Dmitriev et al., 2004), se han publicado varios estudios que lo corroboran, por ejemplo el de Dutra realizado en Brasil, que reportó a todas las muestras de *S. agalactiae* positivas tanto para el gen *scpB* como para el *lmb* que codifica para la proteína de anclaje a laminina (Dutra et al., 2014). Estos mismos resultados lo obtuvieron Sadaka y su equipo en el 2017 (Sadaka, Abdelsalam, Meheissen, Orief, & Arafa, 2017).

Por otro lado, también hay evidencia de que no todas las cepas de GBS son positivas para este gen. De hecho, un estudio centrado en crear un método de detección en base a PCR mediante la amplificación de la región 16SrRNA, concluye que por sí solo el gen *scpB* no es capaz de detectar todos los resultados positivos (Mashouf, Mousavi, Rabiee, Yousef, & Arabestani, 2014).

Incluso así, los porcentajes de detección del gen *scpB* en cepas de *Streptococcus agalactiae* siempre rodean la totalidad de las muestras analizadas. Tal como lo describen los estudios de Duarte, Hannoun, Eskandarian y Rallu que reportan prevalencias de 96.7% (Duarte et al., 2005), 94.7% (Hannoun et al., 2009), 96.1% (Eskandarian et al., 2014) y 99% (Rallu, Barriga, Scrivo, Martel-Laferrière, & Laferrière, 2006) lo cual se asemeja a la prevalencia del 96% encontrada en esta investigación. La detección en base a la amplificación del gen *scpB* ha sido comprobada como uno de los métodos más confiables, alcanzando una sensibilidad de 99.6% y una especificidad del 100% (Rallu et al., 2006). Sin mencionar, que se ha descrito como superior al método de detección en base a la amplificación del gen antígeno *cfb* que también ha sido descrito como un gen 'housekeeping' (Bidgani, Navidifar, Najafian, & Amin, 2015)

Una de las preocupaciones en la utilización del gen *scpB* para la detección rápida recae en el alto nivel de homología que este gen comparte con el gen *scpA* de *Streptococcus pyogenes*. Debido a que los dos genes codifican para proteínas que actúan como factores de virulencia con prácticamente la misma función, estas se encuentran altamente conservadas entre especies de *Streptococcus*. Se ha descrito que los genes *scpA* y *scpB* tienen un 95% de homología (Cheng et al., 2002). Sin embargo, la amplificación inespecífica del gen *scpA* en lugar del gen *scpB* depende del juego de primers utilizados y de las condiciones tanto de PCR como de electroforesis. A pesar de su similitud, el gen *scpA* de *S. pyogenes* tiene 51bp más, en el extremo 3', que el gen *scpB* (Elbaradie et al., 2009). Si ocurriera una amplificación inespecífica, la diferencia de peso molecular puede ser visualizada en el gel de electroforesis. Los estudios de Dmitriev en 2004 y el de Elbaradie en 2009 toman esa diferencia de tamaño entre los dos genes como un marcador diagnóstico para confirmar la presencia de *Streptococcus agalactiae*. En esta investigación no se detectaron muestras que tuvieran amplificación inespecífica para el gen *scpA*. Pero si se obtuvo una muestra que fue identificada como *Streptococcus constellatus* por métodos morfológicos, pero no se obtuvo amplificación del gen *scpB*, lo cual demuestra este gen es específico para *S. agalactiae* y puede ser utilizado para su detección y/o diagnóstico.

5.1.2 Gen de resistencia *mreA*

El gen *mreA* fue identificado por electroforesis con 498bp (Figura 10) según lo descrito por Oday, Neihaya y Munim en su estudio publicado en 2015.

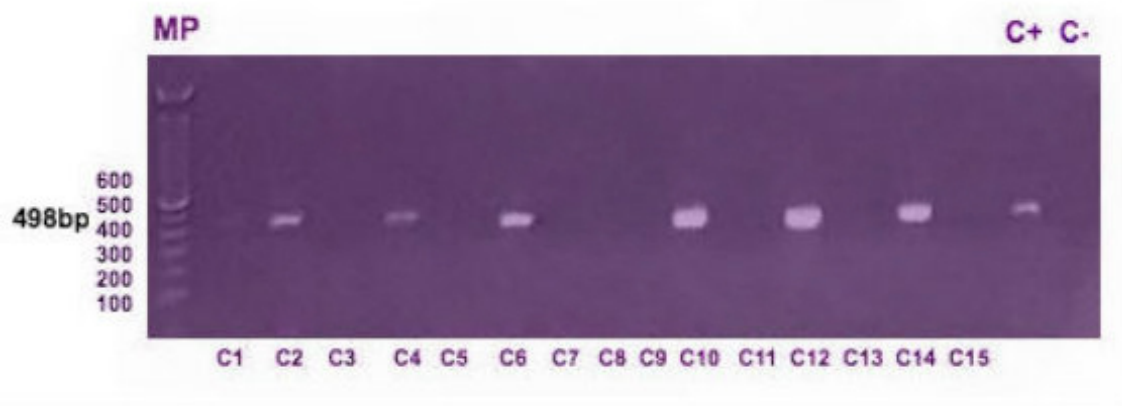


Figura 10. Productos de PCR con amplificación del gen *mreA* en gel de agarosa al 1% visualizados en transiluminador UV.

C1-C15: Muestras clínicas

MP: marcador de peso molecular

C+: control positivo//C-: control negativo

El gen *mreA* se encontró en sesenta y siete muestras lo que corresponde al 51% de las muestras analizadas (Figura 11). Mientras que las 65 muestras restantes, no presentaron amplificación para este gen.

Prevalencia total de gen *mreA*

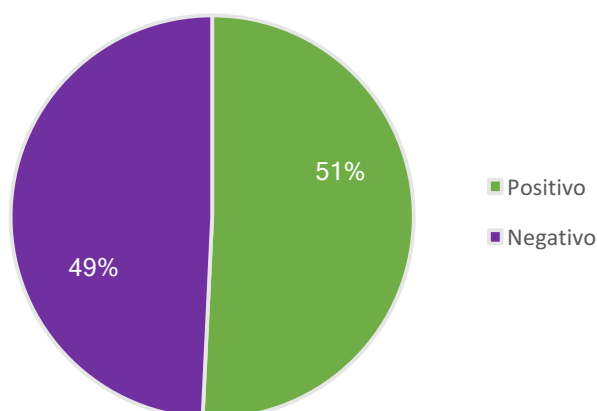


Figura 11. Diagrama de amplificación del gen *mreA*.

El gen *mreA* fue inicialmente descrito como codificante para el eflujo de resistencia a macrólidos (Clancy et al., 1997) pero también se lo ha relacionado con diversas funciones como por ejemplo codificar para una flavoquinasa

involucrada en el transporte de grupos funcionales durante el proceso de respiración celular (Clarebout et al., 2001).

En varios estudios reportaron al gen *mreA* como un gen 'housekeeping' para *S. agalactiae* (Fitoussi et al., 2001). Sin embargo, en esta investigación solo se encontró al gen *mreA* en el 51% de las muestras, por lo tanto, no puede describirse como gen 'housekeeping'. Este resultado concuerda con el obtenido por Hamid Oday en su estudio publicado en 2015, donde se demostró que la presencia del *mreA* y la resistencia a eritromicina no se encuentran completamente asociadas. También encontró que el gen *mreA* solo estaba presente en el 69.5% del total de cepas de *Streptococcus agalactiae* comprobando que no puede ser 'housekeeping' (Oday et al., 2015).

En la mayoría de estudios que buscan la presencia del gen *mreA*, solo amplifican las muestras que previamente hayan presentado resistencia fenotípica a eritromicina. Sin embargo, en esta investigación, no todas las muestras con resistencia fenotípica a eritromicina tuvieron amplificación positiva para el gen *mreA*.

5.1.3 Gen de resistencia *ermB*

El gen *ermB* fue identificado mediante electroforesis con 639bp (Figura 12) según lo descrito por Duarte, Bellei, Miranda, Brito y Teixeira en su estudio de 2005.

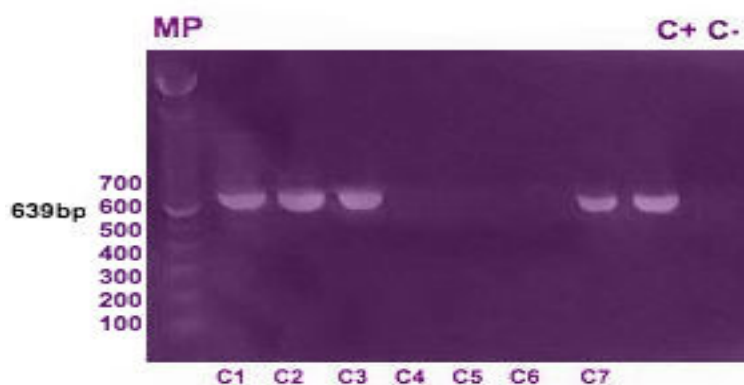


Figura 12. Productos de PCR con amplificación del gen *ermB* en gel de agarosa al 1% visualizados en transiluminador UV.

MP: marcador de peso molecular

C1-C7: Muestras clínicas

C+: control positivo//C-: control negativo

El gen *ermB* fue identificado en treinta y ocho muestras, lo que corresponde al 29% de las muestras analizadas (Figura 13). Mientras que las noventa y cuatro restantes, no presentaron amplificación para este gen.

Incidencia total de gen *ermB*

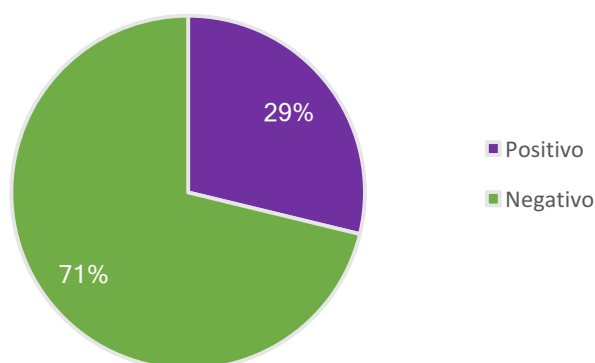


Figura 13. Diagrama de amplificación del gen *ermB*.

El *ermB* es uno de los genes de resistencia más comunes en el género *Streptococcus* debido a que se lo puede encontrar en *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus pneumoniae y *Streptococcus pyogenes*. Este gen codifica para la eritromicina-metilasa, que genera modificación ribosomal para impedir la actividad de los antibióticos macrólidos y lincosamidas produciendo la resistencia cruzada (Bolukaoto et al., 2015). Generalmente actúa en conjunto con *ermA*, *mefA* y *linB*, para completando el espectro de resistencia (Gygax et al., 2006).

En el caso de GBS, los reportes de presencia del gen *ermB* suelen ser superiores a los de los otros, por lo que se asocia a la resistencia a eritromicina con este gen (Pinto et al., 2014).

Los estudios que se enfocan en encontrar la presencia del gen *ermB* suelen hacerlo únicamente entre las muestras que previamente hayan presentado resistencia fenotípica a eritromicina, clindamicina o ambas. En estos casos, la prevalencia puede alcanzar cifras del 80% al 95% (Tsung Lee & Lai, 2015). Sin embargo, en un estudio que evaluó la prevalencia del gen en la totalidad de cepas analizadas, reportó presencia en el 23% de las muestras (Emaneini et al., 2014), resultado que concuerda con el 29% que se encontró en esta investigación. Cabe indicar que este gen no se encontró en todas las muestras que presentaron resistencia fenotípica a eritromicina y/o clindamicina.

5.2 Incidencia del gen de identificación *scpB* por factores cualitativos

5.2.1 Incidencia del gen *scpB* por edad

De los cinco rangos de edad analizados, la mayor incidencia del gen *scpB* (38 muestras positivas) se encontró los pacientes de entre 21 y 30 años de edad (Figura 14). Seguido por los pacientes entre 31 a 40 años con de 30 muestras positivas.

Los pacientes entre 41 y 60 años, no presentaron ninguna muestra negativa. Mientras que los pacientes entre 4 a 20, 21 a 30 y 61 a 88 años presentaron una

sola muestra sin amplificación. Los pacientes entre los 31 y 40 años tuvieron dos resultados negativos.

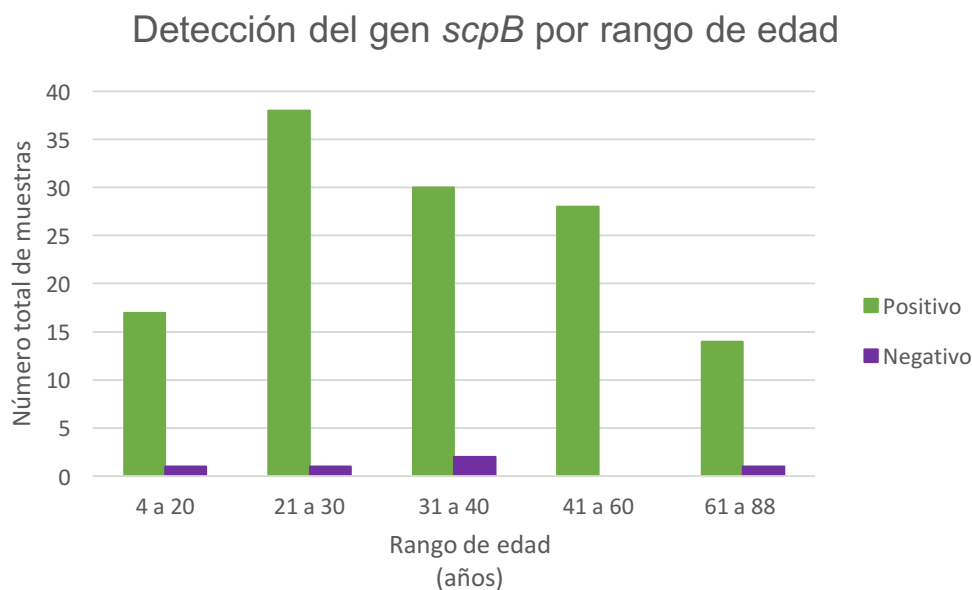


Figura 14. Distribución del gen *scpB* por rangos de edad.

El hecho que la mayor incidencia se encuentre en los grupos de pacientes con edades entre los 21 y 40 años, se puede explicar dado a que la mayoría de muestras utilizadas en este estudio provienen de pacientes de género femenino, quienes se encuentran en edad fértil, pudo darse el caso de que las muestras hayan sido de pacientes en estado de gestación. Sin embargo, debido a que esta investigación se basa en un punto de vista retrospectivo, dicha información no pudo ser adquirida.

El resultado obtenido se asemeja a las cifras publicadas por la Oficina de Salud Pública de Louisiana en el año 2011 (Anexo 1), en el cual reportan que los diagnósticos acumulativos de infección y/o colonización por GBS, desde el año de 1999 hasta 2010 se encuentran en su mayoría en personas de entre 15 y 34 años (Louisiana Office of Public Health, 2011). Así mismo se asemeja con una investigación australiana que reporta incidencia de GBS en 93 de 663 muestras de mujeres en edad fértil (Zhao et al., 2008).

Existen reportes que indican que, el índice de incidencia de colonización o infección por *S. agalactiae* en adultos mayores (~ 25%) es similar al que se presenta en mujeres en edad fértil (Edwards & Scrivo, 2006). Lo que concuerda con las altas incidencias reportadas en los pacientes entre 41 y 88 años. Si el desarrollo de enfermedades causadas por GBS en adultos mayores se debe a la eminente disminución de la inmunidad o a la predisposición por aumento en la edad, es incierto. Dado a que la mayoría de adultos mayores que desarrollan una infección a causa de este microorganismo, suelen presentar cuadros clínicos de enfermedades crónicas y que los adultos mayores tienen deficiencias en la formación de anticuerpos corpusculares, se ha concluido que las infecciones por GBS en este grupo en específico estarían más asociadas a las condiciones de salud del paciente y al estado de su sistema inmune que a la edad en sí misma (Schuchat, 1998).

5.2.2 Incidencia del gen *scpB* por tipo de muestra

La mayor incidencia (95.5%) se obtuvo en las muestras de secreción vaginal, con ochenta y cinco positivas y cuatro negativas (Figura 15).

En las muestras de orina, se obtuvieron diecinueve positivas y una negativa para. Por otro lado, las muestras de líquido seminal y 'otros' fueron todas positivas.

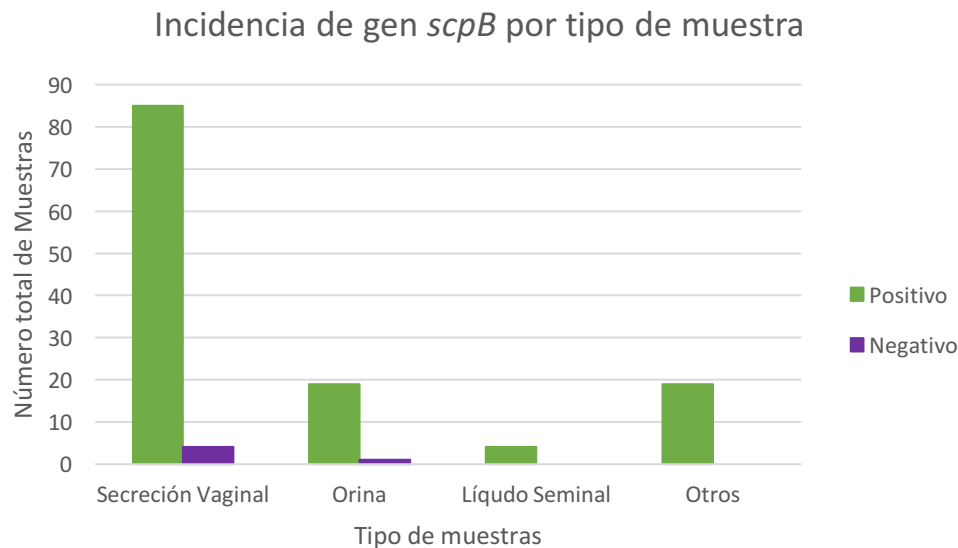


Figura 15. Distribución del gen *scpB* según el tipo de muestra.

Debido a que *Streptococcus agalactiae* puede encontrarse en una gran variedad de tejidos y fluidos humanos, es necesario comprobar la capacidad del gen de identificación *scpB* para detectar el microorganismo en varios tipos de muestras. Las muestras más comunes para análisis clínicos son las de secreción vaginal y/o orina debido a que el tracto genital es la zona de mayor colonización de esta bacteria con el 15% al 30% de incidencia en pacientes adultos sanos (Landwehr & Henneke, 2014). Lo que corrobora que la mayor incidencia del gen de identificación se presenta en muestras provenientes de secreción vaginal seguidas por las de orina.

El 95.5% de incidencia en las muestras de secreción vaginal concuerda con el 92.5% de incidencia reportado por Lysakowka (Lysakowska, Kalinka, Bigos, Prosniewska, & Wasiela, 2011).

Los resultados negativos en las muestras de secreción vaginal y orina pueden deberse a la forma de recolección que haya utilizado el médico tratante o el paciente; puede deberse también al tratamiento previo a la reacción en cadena de la polimerasa o a la ausencia del gen *scpB*. Sin embargo, se ha comprobado que el gen *scpB* como el más prevalente en GBS por lo que su ausencia es un

hecho esporádico. Una de las muestras de orina negativas correspondía a *Streptococcus agalactiae*, sino que fue comprobada por métodos morfológicos, como *Streptococcus constellatus*.

La ausencia de resultados negativos en las muestras de líquido seminal y 'otros' se asemeja a los resultados obtenidos por Safadi en 2010, quien estudió ciento once cepas de *Streptococcus agalactiae* de diferentes orígenes humanos y reportó la amplificación del gen *scpB* en la totalidad de las muestras (Safadi et al., 2010). El grupo científico de Udo analizó muestras de sangre, secreción vaginal, orina y de fuentes diversas y reportó una incidencia del 83.3% lo cual pudo deberse al alto índice de ausencia del microorganismo en las muestras de sangre (Udo, Boswihi, & Al-Sweih, 2013). Se puede concluir que el gen *scpB* es capaz de detectar la presencia de la bacteria en un alto porcentaje y una amplia variedad de muestras de origen humano.

5.3 Pruebas CAMP

De las doce muestras sometidas a la identificación por el factor CAMP por crecimiento inespecífico, se obtuvo ocho muestras positivas para *Streptococcus agalactiae* (Figura 16).

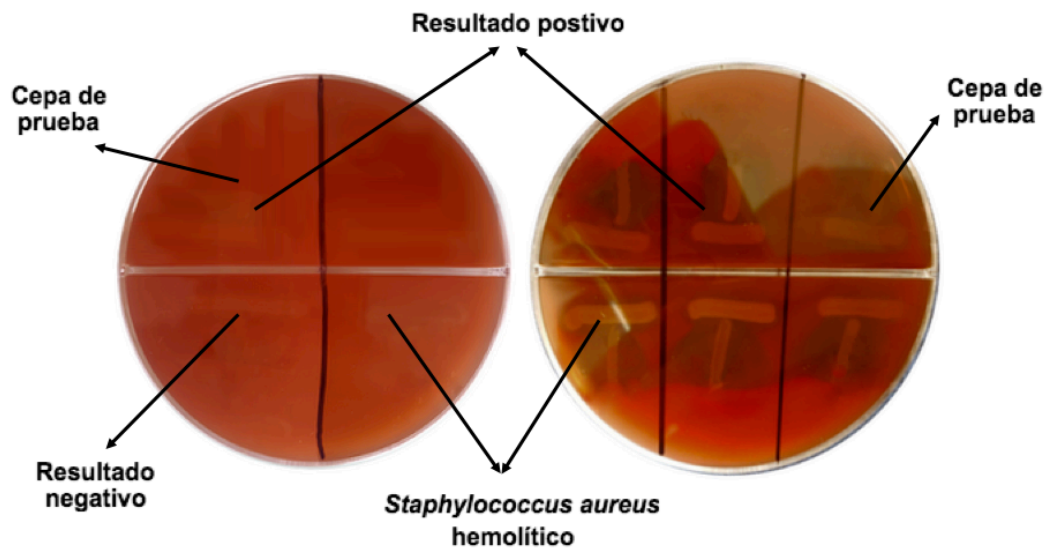


Figura 16. Interpretación de pruebas del factor CAMP en agar sangre de cordero.

La prueba del factor CAMP es un método de identificación presuntivo para *Streptococcus agalactiae* que se realiza en base a la reacción hemolítica sinérgica que se produce entre la muestra de prueba y una cepa hemolítica de *Staphylococcus aureus* (Tankeshwar, 2013), formando una zona clara en el agar sangre de cordero en los puntos de unión de las dos cepas (Phillips, Tapsall, & Smith, 1980). Se ha descrito que el 98% de cepas de GBS producen la proteína del factor CAMP, por lo que los resultados falsos positivos suelen ser esporádicos (Khafri & Nazari, 2004).

Debido a que la sensibilidad y la especificidad de la identificación de *S. agalactiae* han sido reportadas con valores del 100% y 88.9% respectivamente (Zárate, Vargas, Pachecho, Fernández, & Smayevsky, 2005), en este estudio se tomaron los resultados de la prueba CAMP como efectivos y se prosiguió a realizar las pruebas tanto de susceptibilidad fenotípica como las PCR únicamente con las muestras que se encontraron con resultado positivo.

5.4 Fenotipo de susceptibilidad a antibióticos

Se obtuvieron los fenotipos de todas las muestras mediante el sistema Vitek® 2 de ©Biomériux. Solo una muestra no se analizó debido a que no correspondía a *Streptococcus agalactiae*. Los datos detallados como 'sin información' se deben a que la tarjeta de identificación no contenía el antibiótico en específico o la dilución bacteriana no alcanzó el inóculo indicado para la lectura dentro del tiempo establecido por el equipo.

5.4.1 Susceptibilidad a penicilina

Del total de muestras analizadas (n=132), el 89% fueron susceptibles a penicilina con una concentración inhibitoria mínima de $\leq 0.12\mu\text{g/mL}$ mientras que el restante 11% no tuvo información para este antibiótico (Figura 17). No se encontraron muestras que presentaran resistencia a penicilina o muestras que presenten una reducción en la concentración inhibitoria mínima.

Susceptibilidad fenotípica a penicilina

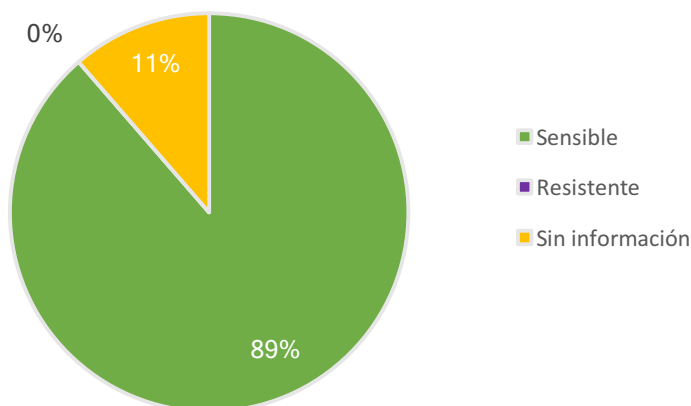


Figura 17. Diagrama del fenotipo de resistencia de *Streptococcus agalactiae* a penicilina

Debido a que la penicilina es el antibiótico primario para combatir la colonización y/o infección por GBS, es esperado que todas las muestras sean susceptibles al

mismo. Sin embargo, reportes de reducción en la concentración inhibitoria mínima o del aparecimiento de muestras completamente resistentes se han incrementado en los últimos años, uno de los primeros estudios fue publicado en el año 2008 en Japón. A pesar de que no se identificaron muestras completamente resistentes al agente antibiótico, si se habrían obtenido reducciones en las concentraciones inhibitorias mínimas que oscilaban entre 0.25µg/mL y 1µg/mL (Kimura et al., 2008). Resultados similares se reportaron en el 2012 en la misma zona geográfica donde se encontraron diez muestras de GBS asiladas con reducción de sensibilidad a penicilina (Nagano et al., 2012). Un estudio retrospectivo llevado a cabo en México con muestras de *S. agalactiae* recolectadas por diecisiete años, también reportó un 6% (n= 201) de resistencia a penicilina desde 1994 hasta 2001 y un 2% (n=671) desde 2004 a 2012 (Crespo et al., 2014a).

A pesar de estas publicaciones, según los resultados de este estudio la penicilina aún puede ser utilizada como tratamiento. La ausencia de muestras resistentes o con una reducción en la concentración inhibitoria mínima se asemeja a los resultados obtenidos por el grupo investigativo de Bolukaoto realizado en Sudáfrica, quien reportó a la totalidad de sus muestras (n=413) como sensibles a penicilina (Bolukaoto et al., 2015) y el equipo de Garland en su estudio realizado en Australia, quienes reportaron susceptibilidad en todas las muestras (n=1160) al antibiótico (Garland et al., 2011). Estudios más antiguos como el publicado por el grupo investigativo de Panda en la región de Yale en Estados Unidos, reportaron que todas las muestras provenientes de hisopados vaginorectales eran sensibles a penicilina (Panda, Iruretagoyena, Stiller, & Panda, 2009).

Si bien no se puede reportar la ausencia total de muestras resistentes a penicilina en el territorio ecuatoriano debido a las limitaciones geográficas de la presente investigación, por los resultados obtenidos, se puede concluir que la penicilina aún es la mejor alternativa para el tratamiento y/o profilaxis de cuadros clínicos presentados por *Streptococcus agalactiae*.

5.4.2 Susceptibilidad a ampicilina

De todas las muestras analizadas, el 95% presentó sensibilidad a ampicilina (Figura 18) con una concentración inhibitoria mínima de $\leq 0.25\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, 2% de las muestras indicaron ser resistentes a ampicilina con concentraciones inhibitorias mínimas de $1\mu\text{g/mL}$, $4\mu\text{g/mL}$ y $\geq 16\mu\text{g/mL}$. El restante 3% no tuvo información para el antibiótico.

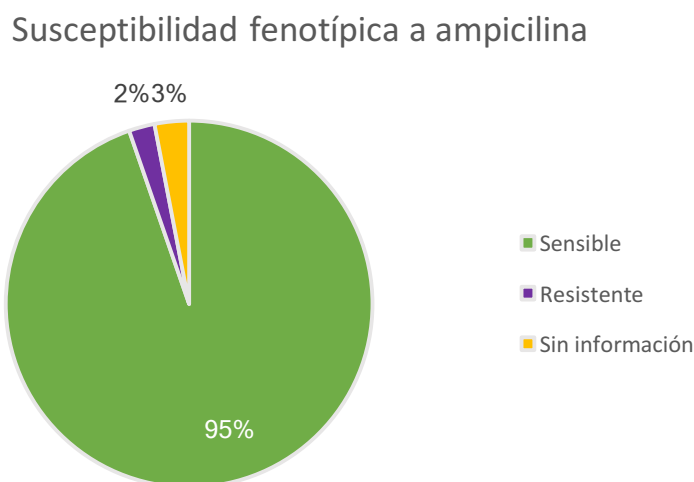


Figura 18. Diagrama en base al fenotipo de resistencia por parte de GBS a ampicilina.

La ampicilina es un antibiótico beta lactámico que pertenece a la familia de las aminopenicilinas. Tanto este antibiótico como la amoxicilina se describen como 'penicilina de espectro extendido' por lo que su mecanismo de acción se basa en el mismo principio que la penicilina común. La penicilina y la ampicilina actúan generalmente como inhibidores de la síntesis de la pared celular, por lo que su acción suele ser más efectiva y más específica contra bacterias Gram positivas, debido a la mayor cantidad de péptidoglicano que estas contienen en sus paredes celulares (Sharma, Singh, & Singh, 2013). A diferencia de la penicilina, la ampicilina y la amoxicilina son capaces de penetrar la pared celular e inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Ashnagar &

Brandao, 2007). Es por esto que se considera que la ampicilina y penicilina son iguales en términos de efectividad, pero no de espectro. Es así que en los casos más comunes un cuadro de sensibilidad o resistencia a penicilina resulta en un cuadro idéntico con respecto a ampicilina. Aunque también puede darse el caso de que un microorganismo presente resistencia a penicilina y susceptibilidad a ampicilina o vice versa (Concelção, Barta de Oliveira, Pinherio da Silva, Rezende, & Gonçalves de Oliveira, 2012).

A pesar de que la mayoría de estudios de susceptibilidad en GBS reportan susceptibilidad total tanto a penicilina como a ampicilina, en esta investigación únicamente tres muestras (2%) presentaron resistencia. Este resultado se asemeja a los obtenidos en el estudio retrospectivo del grupo investigativo de Crespo, quienes reportan un 94% (n= 201) de susceptibilidad a ampicilina en el entre los años 1994 y 2001 y un 2% (n= 671) desde el año 2004 hasta 2012 (Crespo et al., 2014a).

En este estudio no se presenta la susceptibilidad fenotípica a penicilina y ampicilina de forma conjunta debido a que las tres muestras que presentaron resistencia a ampicilina no obtuvieron información para penicilina. Dado a que el porcentaje de resistencia al antibiótico, tanto en este estudio como en investigaciones previas, es mínimo o nulo, se puede establecer que la ampicilina puede ser utilizada para el tratamiento y/o profilaxis de cuadros clínicos causados por *Streptococcus agalactiae*.

5.4.3 Susceptibilidad a eritromicina

El 71% de las muestras analizadas son sensibles mientras que el 25% presentó ser resistente al mismo (Figura 19) con concentraciones inhibitorias mínimas de $\leq 0.25\mu\text{g/mL}$ y un rango de $1\mu\text{g/mL}$ a $\geq 8\mu\text{g/mL}$ respectivamente. El restante 4% de las muestras presentaron un fenotipo de resistencia intermedia con concentración inhibitoria mínima de $0.5\mu\text{g/mL}$.

Fenotipo de resistencia a eritromicina

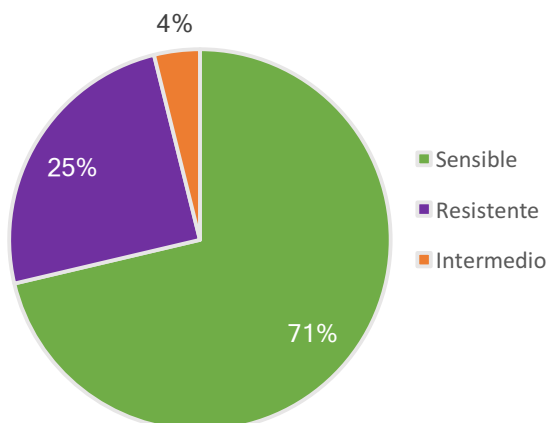


Figura 19. Diagrama del fenotipo de susceptibilidad de GBS a eritromicina.

La eritromicina es uno de los antibióticos alternativos utilizados para el tratamiento de infecciones a causa de *S. agalactiae*. Las directrices del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (*Center for Disease Control and Prevention*) de Estados Unidos recomiendan que se realicen pruebas de sensibilidad tanto para eritromicina como para clindamicina para pacientes que presenten riesgo de anafilaxis al ser dosificados con penicilina y/o ampicilina (Heelan et al., 2004). Sin embargo, en las últimas décadas, se han publicado reportes globales que sugieren que la resistencia a eritromicina y a clindamicina ha incrementado (Garland et al., 2011).

En los resultados obtenidos predominan los fenotipos de sensibilidad. El 25% de resistencia total y el 9% de resistencia intermedia presentados en este estudio es mayor al 6.4% (n= 264) reportado por Garland en Australia (Garland et al., 2011) y al 11% (n= 1171) reportado por Marimón en España (Marimón, Valiente, Ercibengoa, García- Arenzana, & Pérez- Trallero, 2005).

Los resultados obtenidos son similares a los publicadas por Gyax, Heelan y Bolukaoto quienes reportan un porcentaje del 38% (n= 222) (Gyax et al., 2006), 22% (n=200) (Heelan et al., 2004) y 21% (n= 413) (Bolukaoto et al., 2015) de

resistencia a eritromicina. Sin embargo, el índice de esta investigación es considerablemente menor al 54% (n= 200) reportado DiPersio (DiPersio & DiPersio, 2006).

Las diferencias existentes entre los índices de incidencia de muestras resistentes a eritromicina reportados en varias investigaciones pueden deberse al número total de muestras analizadas, los años en los que fueron tomadas, el tejido o fluido de origen, el protocolo de muestreo y la zona geográfica donde se realizó el análisis (Garland et al., 2011). En comparación con otros estudios, el 25% y 9% de muestras resistentes y resistentes intermedios reportados en este estudio pueden considerarse como índices elevados. Este tipo de reportes ha generado que se sugiera reemplazar el tratamiento alternativo de eritromicina por vancomicina (Peláez, Gelber, Fox, & Chasen, 2009), pero no se han realizado cambios oficiales en las directrices internacionales. Este hecho indica que, si bien aún existe predominancia de muestras sensibles a eritromicina, es absolutamente necesario realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana previo a la dosificación del agente antibiótico a un paciente que presente un cuadro clínico causado por *S. agalactiae*.

5.4.4 Susceptibilidad a clindamicina

Se encontró que el 70% de las muestras son sensibles mientras que el 29% son resistentes (Figura 20). Las concentraciones inhibitorias mínimas de sensibilidad y resistencia fueron de $\leq 0.25\mu\text{g/mL}$ y un rango de $2\mu\text{g/mL}$ a $\geq 8\mu\text{g/mL}$ respectivamente. El 1% presentó resistencia intermedia descrita con una concentración inhibitoria mínima de $0.5\mu\text{g/mL}$.

Fenotipo de resistencia a clindamicina

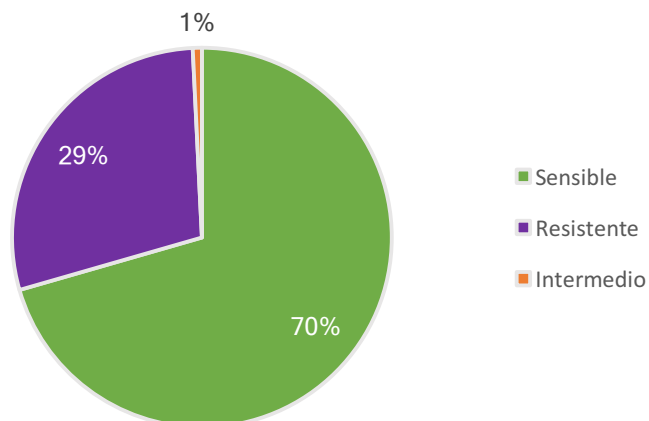


Figura 20. Diagrama del fenotipo de susceptibilidad por parte de GBS a clindamicina.

Al igual que la eritromicina, la clindamicina se utiliza como tratamiento alternativo para combatir infecciones con *S. agalactiae* en pacientes que presenten alergia y/o resistencia a los antibióticos beta lactámicos. Sin embargo, los reportes globales sobre el incremento en la resistencia por parte de la bacteria a eritromicina se han presentado también para clindamicina (Schoening, Wagner, & Arvand, 2005). La clindamicina tiene un mecanismo de acción similar a la eritromicina, por lo que el desarrollo de resistencia a eritromicina suele ser acompañado con el desarrollo de resistencia a clindamicina (Tenson et al., 2003). Aunque pueden darse casos en los que el microorganismo solo presente susceptibilidad a clindamicina y no a eritromicina, tema que será ampliado en la sección 5.5 del presente documento.

La mayoría de las investigaciones sobre la susceptibilidad a clindamicina aún reportan predominancia de sensibilidad. Las tasas de 29% de muestras resistentes y 1% de muestras con resistencia intermedia son significativamente superiores a las presentadas por Garland, Schoening, Brychzy y Castor quienes reportaron resistencias totales de 4.2% (n= 264) en territorio australiano (Garland et al., 2011), 4.7% (n=338) en Alemania (Schoening et al., 2005), 3% (n=169) en

Krakow, Polonia (Brzychczy- Wloch et al., 2010) y 12.7% en Estados Unidos (n=2937) (Castor et al., 2008) respectivamente. También son superiores a los dos índices obtenidos en el estudio retrospectivo de Crespo en territorio mexicano, quien presenta 5.2% (n= 201) de resistencia entre 1994 y 2001 y 9.4% (n= 671) entre 2004 hasta 2012 (Crespo et al., 2014a).

El índice de resistencia de esta investigación concuerdan con los porcentajes presentados por Stoll en la zona del sur de Estados Unidos, Skoff también en la zona de Estados Unidos, Bolukaoto en Sudáfrica, Gygax en la zona de Hamilton, DiPersio en Ohio y Savoia quienes reportan índices del 20% (n=611) (Stoll et al., 2011), 20.2% (n=1933) (Skoff et al., 2008), 17.2% (n=413) (Bolukaoto et al., 2015), 21% (n=222) (Gygax et al., 2006), 33% (n=200) (DiPersio & DiPersio, 2006) y 16.4% (n=73) (Savoia, Gottimer, Crocilla, & Zucca, 2008) respectivamente.

Las diferencias en las tasas de resistencias es altamente dependiente del número total de muestras analizadas, los años en los que las fueron tomadas, el tejido o fluido de origen, el protocolo de muestreo y la zona geográfica donde se realiza el análisis (Garland et al., 2011). Poniendo en contraste el resultado de 29% y 1%, de muestras con resistencia y resistencia intermedia encontradas en esta investigación, con los resultados obtenidos en otros estudios, se puede establecer que las tasas obtenidas se encuentran dentro del rango común de resistencia a clindamicina encontrado en GBS. A pesar de que la mayoría de muestras aún son fenotípicamente sensibles, las estadísticas de resistencia encontradas sugieren que es necesario realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana antes de administrar clindamicina a los pacientes.

5.4.5 Susceptibilidad a otros agentes antibióticos

Conjuntamente con el análisis de susceptibilidad a penicilina, ampicilina, eritromicina y clindamicina, se obtuvieron datos sobre la resistencia a

ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, quinupristina/dalfopristina, linezolid, vancomicina, tetraciclina, tigeciclina y nitrofurantoína.

Para ocho de los nueve agentes antibióticos mencionados, predominaron las muestras con sensibilidad (Figura 21). Sin embargo, en el caso del antibiótico macrólido tetraciclina, predominaron las muestras resistentes (n=91) con concentraciones inhibitorias mínimas en un rango de $8\mu\text{g/mL}$ a $\geq 16\mu\text{g/mL}$.

Todas las muestras analizadas mostraron ser sensibles a tigeciclina, vancomicina y linezolid con concentraciones inhibitorias mínimas de $\leq 0.12\mu\text{g/mL}$ y rangos de $\leq 0.5\mu\text{g/mL}$ a $1\mu\text{g/mL}$ y ≤ 0.5 a $2\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

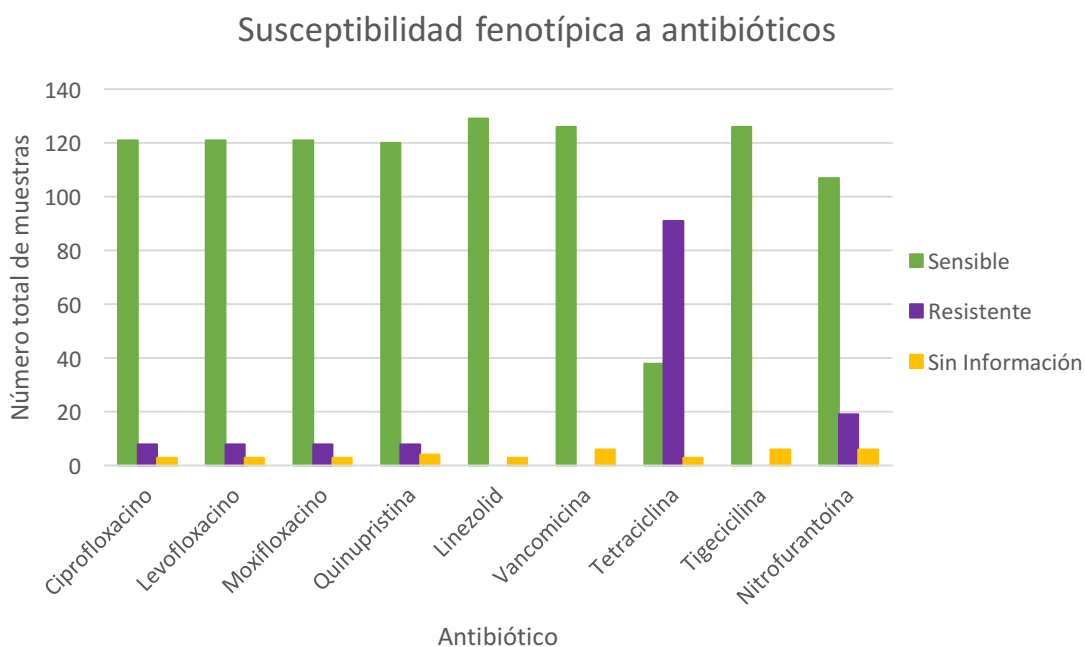


Figura 21. Fenotipo de susceptibilidad presentado por *Streptococcus agalactiae* a diferentes agentes antibióticos.

La ciprofloxacina, levofloxacina y moxifloxacina son antibióticos pertenecientes a la familia de las fluoroquinolonas, las cuales se caracterizan por ser compuestos antimicrobianos sistémicos de amplio espectro. Su acción ha sido descrita como efectiva contra varias especies del género *Streptococcus*. Razón

por la cual han sido recomendadas por las organizaciones internacionales para el tratamiento de exacerbaciones agudas de neumonía o bronquitis. Sin embargo, la utilización de estos antibióticos en infecciones adquiridas por déficits inmunológicos ha causado que se presenten cada vez más microorganismos con resistencia tal como es el caso del *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus agalactiae* (Maeda et al., 2008).

A pesar de que en algunos estudios se ha reportado sensibilidad total a ciprofloxacina (n=52) (Simoes, Aroutcheva, Heimler, & Faro, 2004), en esta investigación el índice de resistencia a ciprofloxacina, levofloxacina y moxifloxacina fue de 6.2% (n=129) este es considerablemente menor al reportado por Quiroga en Argentina, quien obtuvo un índice de 35.5% (n=62) en el caso de la ciprofloxacina. Sin embargo, es similar al 6.5% (n=62) levofloxacina (Quiroga, Pegels, Oviedo, Pereyra, & Vergara, 2008). Existen estudios que reportan sensibilidad total (n=207) a moxifloxacina (Persson et al., 2008). Sin embargo, el porcentaje de resistencia reportado en este estudio coincide con los hallazgos de Wehbeh en Estados Unidos quien describió un rango desconocido de muestras resistentes a moxifloxacina, ciprofloxacina, gemifloxacina y garenoxacina, los cuales pertenecen a la misma familia de compuestos. La diferencia en estas cifras puede deberse a las diferencias en el número de muestras estudiadas así mismo como el método de análisis utilizado para determinar los fenotipos de sensibilidad. En los estudios de Wehbeh y Simoes se utilizó el método de difusión por disco mientras que en esta investigación se utilizó el método automatizado Vitek® 2.

La quinupristina/ dalfopristina es la combinación de dos antibióticos de la familia de las estreptograminas. El mecanismo de acción se basa en la inhibición tanto de las fases iniciales de la síntesis de proteínas, realizada por la dalfopristina, como de las fases finales del proceso, realizado por la quinupristina (Baudoux et al., 2007). Los estudios realizados con este antibiótico en *S. agalactiae* generalmente reportan a todas las muestras como sensibles. Tal es el caso de Quiroga (n=62) quien obtuvo resultados de sensibilidad mediante la utilización

de paneles de microdilución (Quiroga et al., 2008), Borchardt (n=486) utilizando el método E-test (Borchardt et al., 2006) y Persson quien también utilizó el método de E-test (n=297) (Persson et al., 2008). Los reportes de resistencia hacia esta combinación antimicrobiana son esporádicos. Sin embargo, 6.3% (n= 128) de resistencia reportado en esta investigación concuerda con el 10% (n= 98) de resistencia que fue reportado por el grupo investigativo de Betriu en Madrid (Betriu et al., 2004). Similar es el caso de la Nitrofurantoína, la cual tiene una tasa del 15% de resistencia en este estudio que resulta mayor a los porcentajes presentados por Simoes y Quiroga que reportan índices de 3.8% (n= 52) (Simoes et al., 2004) y 1.7% (n=62) (Quiroga et al., 2008) respectivamente. Al igual que en los casos de los antibióticos descritos anteriormente, la variación en los índices de resistencia puede deberse tanto al número de muestras estudiadas como en el método utilizado para determinar el fenotipo de susceptibilidad.

La ausencia de bacterias con fenotipos de resistencia a linezolid, vancomicina y tigeciclina es común en *S. agalactiae* y coincide con los resultados obtenidos por Borchardt (n= 486) en el caso de linezolid y vancomicina (Borchardt et al., 2006), Simoes (n=52) para vancomicina (Simoes et al., 2004), Persson (n=297) para vancomicina y linezolid (Persson et al., 2008), Betriu (n= 98) para tigeciclina (Betriu et al., 2004) y Quiroga (n=62) para linezolid y vancomicina (Quiroga et al., 2008) por lo que se puede concluir que la bacteria tiene sensibilidad intrínseca a estos tres agentes antibióticos, por lo que el tratamiento o profilaxis utilizando uno de estos tres agentes antibióticos debería resultar efectivo.

El único antibiótico en el cual predomina el fenotipo de resistencia es con la tetraciclina. Se ha descrito que *S. agalactiae* tiene un alto nivel de resistencia a tetraciclina, razón por la cual existen investigaciones en las que se reporta que todas las muestras son fenotípicamente resistentes a este antibiótico (Duarte et al., 2005). En esta investigación la tasa de resistencia a tetraciclina fue de 70.5% (n= 129), cifra que se asemeja a los resultados obtenidos por Persson y Betriu quienes reportan índices de resistencia del 68% (n=297) (Persson et al., 2008),

89.8% (n=98) (Betriu et al., 2004) respectivamente. Por lo que se puede establecer que el microorganismo es poco sensible a este antibiótico en particular y el mismo no podría ser utilizado en el tratamiento de pacientes.

5.5 Fenotipo MLS_B

Del total de muestras analizadas, 38 exhiben un comportamiento de resistencia MLS_B o MLS. El fenotipo MLS constitutivo o cMLS, caracterizado por presentar resistencia tanto a eritromicina como a clindamicina, es el más predominante con un total de 28 muestras (Figura 22).

En los reportes obtenidos por el sistema Vitek® 2, no se encontró ninguna muestra con el fenotipo MLS inducible o iMLS. Por otro lado, seis de las muestras presentaron el fenotipo MLS M caracterizado por presentar resistencia a eritromicina y sensibilidad a clindamicina. Mientras que el fenotipo MLS L, que se presenta con sensibilidad a eritromicina y resistencia a clindamicina, fue encontrado en cuatro muestras. La distribución de los genes encontrados según cada fenotipo MLS se encuentran descritos en Tabla 7.

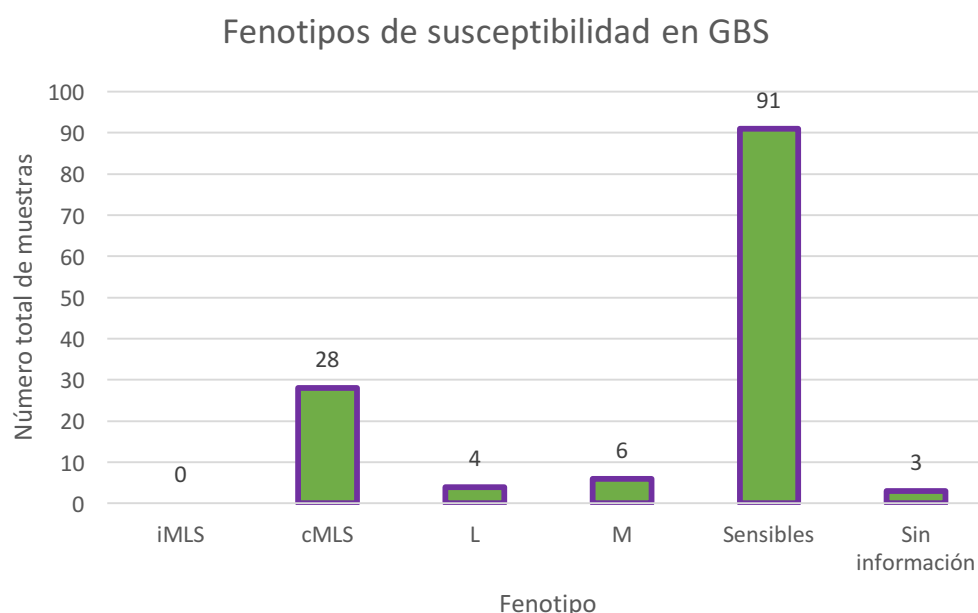


Figura 22. Diagrama de distribución del fenotipo MLS entre las muestras analizadas.

Tabla 7.

Genes de resistencia identificados según el fenotipo de resistencia presentado.

Fenotipo	Número total de muestras	<i>mreA</i>	<i>ermB</i>	<i>mreA + ermB</i>
cMLS	28	22 (78.6%)	25 (89.3%)	20 (71.4%)
L	4	2 (50%)	1 (25%)	1 (25%)
M	6	6 (100%)	5 (83.3%)	5 (83.3%)
Sensibles	91	35 (38.5%)	6 (6.6%)	4 (4.4%)

El fenotipo MLS_B se refiere a la capacidad que posee un microorganismo para desarrollar resistencia a tres familias de antibióticos diferentes: macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B. Estos tres grupos de agentes antibióticos son químicamente diferentes, pero tienen un mecanismo de acción similar, por lo cual la resistencia a uno de ellos puede implicar el desarrollo de resistencia a los otros (Van Hoek et al., 2011). Este fenotipo fue inicialmente descrito en

Staphylococcus aureus pero ha sido analizado en otras especies incluyendo *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*.

El fenotipo se puede expresar de cuatro formas diferentes: Constitutivo (resistencia a eritromicina- resistencia a clindamicina), inducible (resistencia a eritromicina- resistencia inducida a clindamicina), M (resistencia a eritromicina- sensibilidad a clindamicina) y L (sensibilidad a eritromicina- resistencia a clindamicina) (Sasirekha et al., 2014). En este estudio el fenotipo predominante es cMLS con un total de 28 muestras (n= 38), resultados que se asemejan con los obtenidos en otros estudios. Tal es el caso de Sadaka, Dutra, Tazi, Hraoui y Hsueh quienes reportan 6 (n=12) (Sadaka et al., 2017), 13 (n=18) (Dutra et al., 2014), 50 (n=81) (Tazi et al., 2007) , 79 (n=90) (Hraoui, Boutiba- Ben, Rachdi, Slim, & Redjeb, 2012), 63 (n=107) (Hsueh et al., 2001) respectivamente.

No obstante, la ausencia de muestras que presenten el fenotipo iMLS no es común. Algunas investigaciones reportan al fenotipo inducible como predominante por sobre las otras tres variaciones (Sherman, Whitehead, Blondel- Hill, Wagner, & Cheeptham, 2012) mientras que otras reportan haber encontrado únicamente una o dos muestra expresando esta variante (Sadaka et al., 2017). El método automatizado, Vitek® 2 ha sido estudiado para comprobar su efectividad en la detección del fenotipo MLSB en *S. agalactiae*. Una investigación concluyó que el método solo tiene el 94.4% de eficiencia en comparación con el método rutinario de discos de difusión (Tang et al., 2004) al contrario de otra que estableció una efectividad del 36% en comparación con el método de difusión de doble disco (Tazi et al., 2007). Sin embargo, considerando que el reporte de resultados entregados por este sistema tiene un área destinada únicamente para el reporte del fenotipo de resistencia inducible a clindamicina (Anexo 2) y el hecho de que en las dos investigaciones dedicadas a la comprobación del sistema Vitek® 2 citadas, si se reporta la presencia de muestras expresando el fenotipo inducible, se han tomado los resultados obtenidos como efectivos. Aunque podría realizarse una prueba de difusión de doble disco para confirmar los resultados.

El fenotipo M se ha descrito como prevalente en muestras de GBS. En las investigaciones publicadas por De Francesco, Azavedo, Sherman, Tazi y Hsueh quienes reportan un total de muestras de 29 (n=58) (De Francesco, Caracciolo, Gargiulo, & Manca, 2012), 4 (n=32) , 10 (n=158) (Sherman et al., 2012), 6 (n=110) (Tazi et al., 2007) y 17 (n=124) (Hsueh et al., 2001) respectivamente. Resultados que se asemejan con las 6 (n=38) encontradas en esta investigación.

La variante fenotípica L, es tan esporádica en *S. agalactiae*, que la mayoría de estudios reporta total ausencia de la misma. Sin embargo, las 4 (n=38) muestras que presentan este fenotipo en este estudio concuerdan con los resultados presentados por Gyax y Azavedo quienes encontraron un total de 6 (n=222) (Gyax et al., 2006) y 1 (n=33) (Azavedo, McGavin, Duncan, Low, & McGeer, 2001) respectivamente. Confirmando así que, si bien la presencia del fenotipo L no es tan común como las otras tres variantes, el microorganismo si puede presentarlo por lo que no debe ser descartado en los análisis de susceptibilidad. Los fenotipos MLS_B se encuentran codificados por un grupo de genes estrechamente relacionados que suelen actuar en conjunto para codificar la resistencia cruzada. Entre este grupo de genes, uno de los más destacados es el gen *ermB* y es uno de los más comúnmente identificados en GBS. Este gen codifica para la proteína 23S rRNA metilasa, la misma que altera el sitio diana de los agentes antibióticos, es por esto que se asocia al gen con todas las variantes de los fenotipos MLS_B (Gyax et al., 2006). En esta investigación las incidencias del gen *ermB* solo en muestras resistentes a eritromicina y clindamicina fueron de 84% y 82% respectivamente (Figura 23 y Figura 24) distribuidos en los fenotipos MLS_B según se especifica en Tabla 7.

Incidencia del gen *ermB* en muestras resistentes a eritromicina

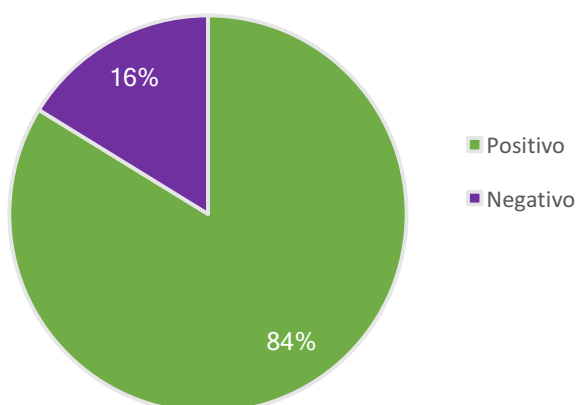


Figura 23. Porcentajes de incidencia del gen *ermB* en muestras fenotípicamente resistentes a eritromicina.

Incidencia del gen *ermB* en muestras resistentes a clindamicina

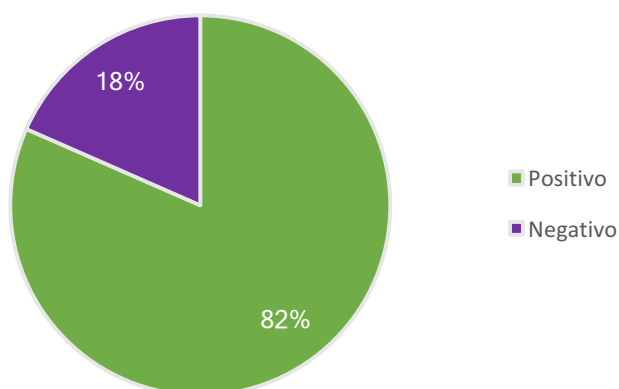


Figura 24. Porcentajes de incidencia del gen *ermB* en muestras fenotípicamente resistentes a clindamicina.

Debido a que los antibióticos pertenecientes al grupo MLS_B tienen un mecanismo de acción similar, la presencia del gen *ermB* puede conferir resistencia a todos ellos puesto que la proteína metilasa modificará la diana inhibiendo la acción de los tres grupos de agentes antibióticos independientemente de su estructura química. Es por esto que se ha asociado al gen *ermB* con la expresión del

fenotipo MLS constitutivo, inducible y M (Gygax et al., 2006). El índice de 89.3% de presencia del gen reportado en este estudio concuerda con los resultados de los de los grupos científicos de Florindo, Duarte y Azavedo quienes reportan que el gen fue principalmente encontrado en muestras que expresaban el fenotipo MLS constitutivo (Florindo et al., 2010) (Duarte et al., 2005) (Azavedo et al., 2001). Sin embargo, el fenotipo MLS constitutivo también se encuentra asociado con otro gen denominados *ermA* el cual es homólogo al gen *ermB* y también codifica para una proteína metilasa (Nakamura et al., 2011). Al igual que *ermB*, este gen se asocia también con el fenotipo MLS inducible y con la resistencia única a eritromicina. No obstante, a pesar de que este gen si puede ser encontrado en *Streptococcus agalactiae*, no es tan común como el gen *ermB* (Duarte et al., 2005). Dado a que existen tres muestras que expresan el fenotipo constitutivo, pero no contienen el gen *ermB*, se puede establecer que poseen otro mecanismo de resistencia que puede estar codificado por el gen *ermA*.

El fenotipo M se encuentra generalmente asociado con un gen denominado *mefA/E*, el mismo que codifica para una bomba de flujo activa de resistencia a macrólidos de 14 y 15 átomos (Florindo et al., 2010). En este estudio se encontró que el gen *ermB* se encuentra presenta en 5 (83.3%) de las seis muestras que se presentan el fenotipo M. A pesar de que el gen *ermB* generalmente no se asocia con esta variante fenotípica, si se han presentado casos en los que se obtiene muestras que amplifican tanto para el gen *ermB* como el gen *mefA/E* (De Francesco et al., 2012). Existen reportes de ausencia total del gen *mefA/E* en muestras de *S. agalactiae* en la zona de Brasil, por lo que se explica al fenotipo M por la presencia del gen *ermB* (Duarte et al., 2005). Cabe recalcar que las seis muestras que expresaron el fenotipo M tuvieron amplificación para el gen *mreA*, el mismo que también se ha descrito como codificante para un sistema de eflujo contra macrólidos de catorce y quince átomos (Oday et al., 2015), por lo que también podría explicar la presencia de las muestras con esta variación fenotípica.

El gen *ermB* solo estuvo presente en una de las cuatro muestras que presentó el fenotipo L, así mismo como en seis muestras sensibles tanto a eritromicina como a clindamicina. Debido a que el fenotipo L se basa en la sensibilidad a eritromicina y resistencia a clindamicina, esta se encuentra asociada al gen denominado *LinB* originalmente identificado en *Enterococcus faecium* (Gygax et al., 2006) y es esporádico en *S. agalactiae*. Sin embargo, la presencia del gen *ermB* tanto en la muestra de fenotipo L como en las seis muestras sensibles a eritromicina y clindamicina puede deberse a bajos niveles de expresión del mismo, mecanismos de regulación genética no especificados o transferencias incompletas dado a que los genes *ermB*, *ermA* y *mefA/E* se encuentran codificados en elementos genéticos móviles (Hawkins, Chochua, Jackson, Beall, & McGee, 2014).

El gen *mreA* es menos específico que el gen *ermB* en relación con el fenotipo MLS_B. Si bien este gen fue descrito como codificante para un eflujo de resistencia a macrólidos (Clancy et al., 1997) varios reportes han descrito la presencia del gen *mreA* en muestras sensibles a eritromicina (Duarte et al., 2005) e incluso hay reportes de que dicho gen actúa como 'housekeeping'. La presencia de *mreA* en muestras resistentes a eritromicina fue del 78% (Figura 25) sin embargo, también fue encontrado en 38.5% de muestras sensibles al antibiótico (Tabla 7).

Incidencia del gen *mreA* en muestras resistentes a eritromicina

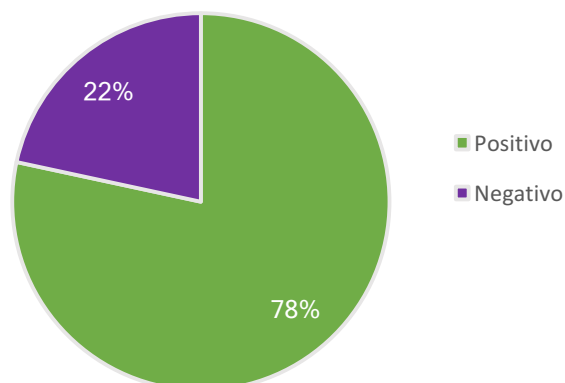


Figura 25. Porcentajes de incidencia del gen *mreA* en muestras fenotípicamente resistentes a eritromicina.

La presencia del gen *mreA* por sí solo no es capaz de explicar la resistencia a eritromicina presentada por GBS. No obstante, el 71.4% de incidencia que el gen tuvo en conjunto con *ermB* en las muestras expresando el fenotipo MLS constitutivo, así mismo como el 100% de incidencia que se encontró en las muestras que expresaron el fenotipo M sugieren que el gen si codifica para un mecanismo de resistencia a eritromicina. Si fuese así, la presencia del *mreA* en las muestras sensibles a este antibiótico podría verse explicado por los reportes que indican que los eflujos activos de resistencia bacterianos también tienen funciones fisiológicas en los mecanismos de respuesta a señales ambientales (Sun, Deng, & Yan, 2014). Además de que podrían tener roles en la regulación hormonal y en la patogenicidad del microorganismo (Pidcock, 2006). Aun así, según los resultados de esta investigación, se puede establecer que el gen *ermB* explica mejor y está más relacionado con la resistencia a eritromicina y el fenotipo MLS_B, que el gen *mreA* en *Streptococcus agalactiae*.

5.6 Incidencia retrospectiva de *Streptococcus agalactiae* en base al gen de identificación *scpB*

Del total de muestras analizadas, la mayor incidencia del gen *scpB* se presenta en los años 2014 y 2016 con un total de 35 positivas, correspondientes al 97.2%. En estos dos años también se obtuvo una muestra negativa, correspondiente al restante 2.8% (Figura 26).

No se obtuvo ningún resultado negativo de las muestras pertenecientes al año 2012, por lo que el 100% presentó el gen *scpB*. En el año 2013, se obtuvieron 21 muestras positivas, representando el 95.5%, y una sola muestra negativa que corresponde al restante 4.5%. La situación es diferente en el año 2015, donde se encontraron 30 muestras positivas correspondientes al 93.7% y el restante 6.3% corresponden a dos muestras que no tuvieron amplificación.

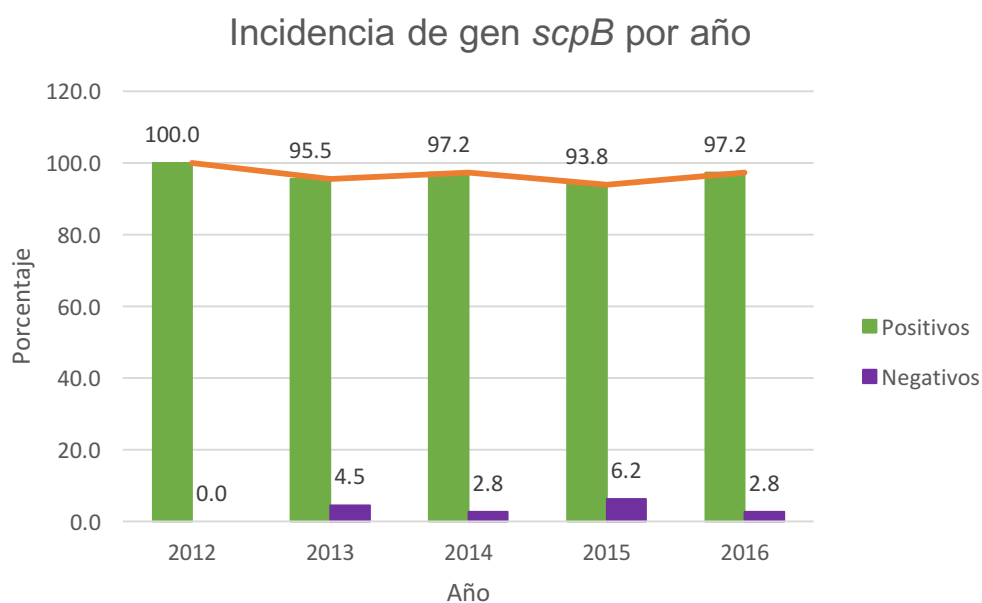


Figura 26. Distribución del gen *scpB* por año.

El desarrollo de enfermedades invasivas causadas por *S. agalactiae* se vio drásticamente reducida después de que el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (*American College of Obstetricians and Gynecologists*) presentaron

directrices oficiales para la prevención de infecciones tempranas en neonatos. Sin embargo, esta medida no tuvo efecto en la incidencia de infecciones tardías (Verani et al., 2010). Esto podría deberse en parte a que las infecciones neonatales pueden controlarse mediante dosificación de compuestos antibióticos intraparto, esta medida no tiene efectividad en la prevención de la colonización y transmisión del microorganismo. Dado a que el mismo puede provenir de otras vías o focos infectivos.

La gran mayoría de los pacientes que se encuentran colonizados por GBS son completamente asintomáticos, por lo que los exámenes clínicos para la detección suelen solo ser rutinarios en mujeres embarazadas o pacientes en los que ya se presentan síntomas de un proceso infeccioso. Según los resultados de esta investigación se puede establecer que la incidencia de *Streptococcus agalactiae* no se ve considerablemente modificada desde el año 2012 hasta el año 2016. A pesar de que no existen estudios que detallen la incidencia del microorganismo hasta 2016, el resultado de esta investigación es similar al obtenido por el equipo científico de Crespo en la zona de México quienes reportan haber obtenido tres veces más de casos confirmados en el periodo de entre 2004 a 2012, que en entre el año 1994 hasta 2001 (Crespo et al., 2014a).

Estos resultados concuerdan con los índices encontrados en la zona de Reino Unido que muestra un incremento en la incidencia de infecciones tempranas y tardías desde el 2001 hasta el 2009 (Group B Strep Support. GBSS, 2015a). Además, la incidencia de 127 muestras confirmadas como GBS en el periodo de cinco años reportados en esta investigación, se asemeja al estudio retrospectivo de Chaiwarith realizado en la zona de Tailandia, quien reportó un total de 197 muestras positivas en un periodo de cuatro años, las mismas que representaron un incremento en la incidencia de GBS durante este periodo (Chaiwarith et al., 2011). Sin embargo, la incidencia encontrada en este estudio es distinta a las 69 muestras que fueron encontradas en la zona de Atenas, Grecia durante un periodo de cinco años (Falagas, Rosmarakis, Avramopoulos, & Vakalis, 2006).

Es importante mencionar que los resultados encontrados no son inferenciales por lo que no permiten conclusiones en poblaciones más grandes debido a que las muestras provienen de un muestreo no aleatorio.

5.7 Incidencia retrospectiva de fenotipos y genotipos de resistencia a eritromicina y clindamicina

5.7.1 Incidencia retrospectiva de resistencia a eritromicina en relación a los genes *mreA* y *ermB*

La variación en la resistencia a eritromicina se ve incrementada desde el año 2012 hasta el año 2014, donde las muestras resistentes alcanzan el 38.2% (Figura 27). Sin embargo, hay una reducción del 9.2% en el año 2015 donde las muestras resistentes representan al 29% pero se reduce en 6.8% según los datos de 2016.

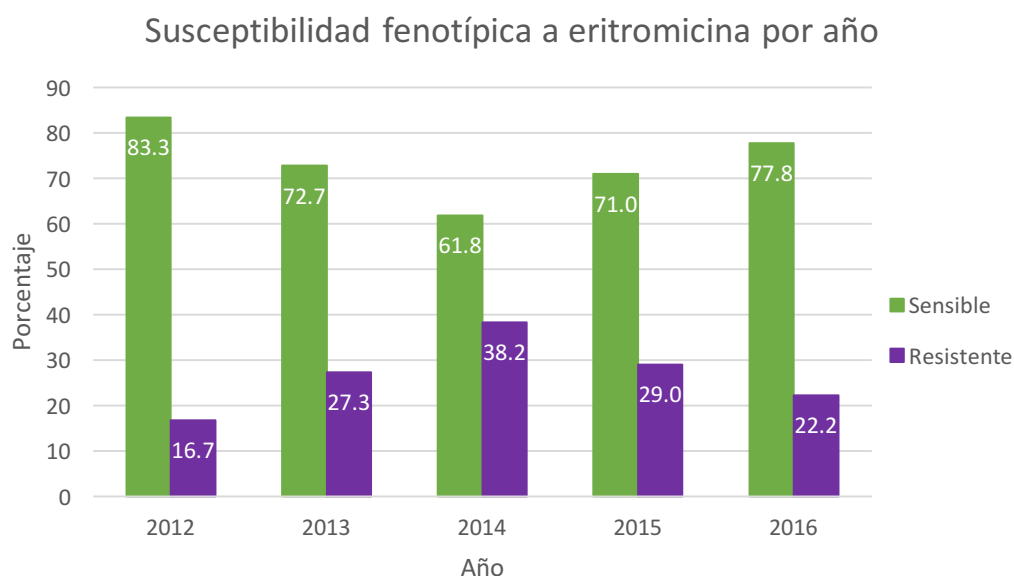


Figura 27. Distribución del fenotipo de susceptibilidad a eritromicina por año

Del total de muestras analizadas, la mayor incidencia del gen *mreA* se presentó en el año 2014 con un total de 24 muestras positivas, correspondientes al 66.6%. Mientras que las 12 muestras negativas, representan el 33.3% (Figura 28).

En el año 2012, se obtuvieron únicamente dos muestras positivas mientras que las restantes cuatro no presentaron el gen de resistencia, lo que corresponde al 33.3% y 66.6%, respectivamente. En el año 2013, 15 de las veinte y dos muestras presentaron el gen *mreA*, representado el 68.2%. Las restantes siete con resultado negativo representan el 31.8%.

En el caso de los años 2015 y 2016, la presencia del gen *mreA* se vio reducida en comparación con el año 2014. Con un total de 11 y 15 muestras positivas, correspondientes al 34.4% y 41.7%, respectivamente.

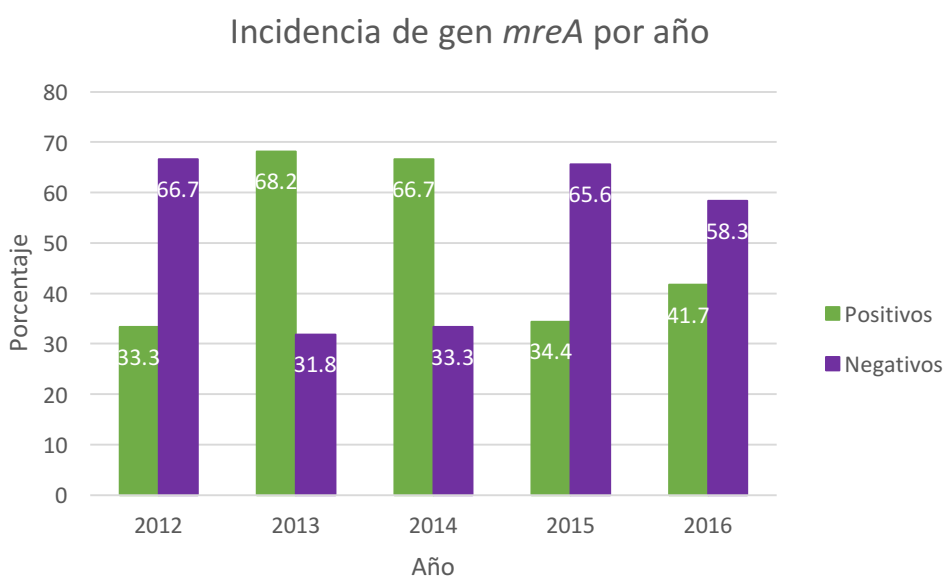


Figura 28. Distribución del gen *mreA* por año

En el caso del gen *ermB*, en todos los años predominaron los resultados negativos. Sin embargo, las mayores incidencias del gen se obtuvieron en el año 2014 y 2016 con un total de catorce y diez muestras positivas (Figura 29), representando el 38.9% y el 27.8%, respectivamente.

En el año 2012, solo una muestra fue positiva representando el 16.6%. Similares resultados fueron encontrados para los años 2013 y 2015, donde se obtuvieron cinco y diez muestras positivas, las mismas que representan el 22.7% y 25% respectivamente.

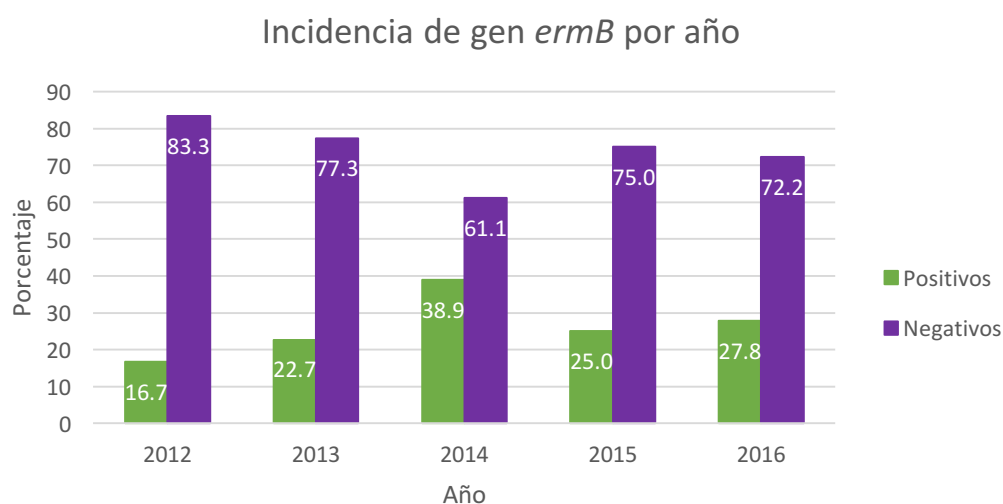


Figura 29. Distribución del gen *ermB* por año

5.7.2 Incidencia retrospectiva de resistencia a clindamicina en relación con el gen *ermB*

La resistencia se ve incrementada desde el año 2012 al 2014 en 21.5%, donde las muestras resistentes alcanzan un porcentaje de 38.2% (Figura 30). Sin embargo, desde este año, la incidencia de muestras resistentes a clindamicina disminuye en un 5.9% en relación al año 2015 y en un 16% en relación al año 2016.

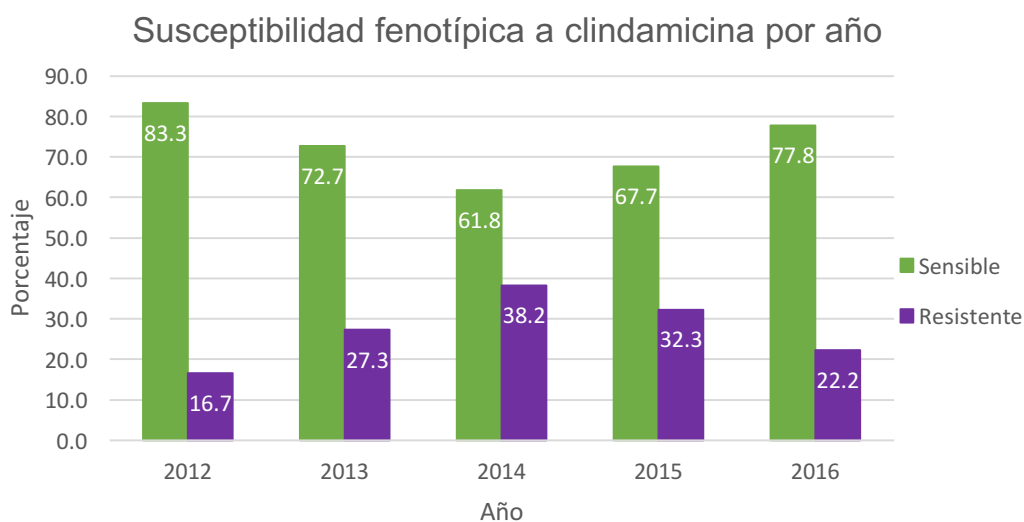


Figura 30. Distribución del fenotipo de susceptibilidad a clindamicina por año.

En base a los reportes globales que indican el incremento en la resistencia a eritromicina y clindamicina por parte de *Streptococcus agalactiae* (Schoening et al., 2005), en esta investigación se determinó la incidencia de muestras resistentes a ambos antibióticos en los cinco años estudiados y su relación con la incidencia de los genes que confieren la resistencia a los dos agentes microbianos.

A pesar de que en esta investigación se puede observar cierto nivel de variación entre las tasas de incidencia de resistencia fenotípica, el análisis de varianza ANOVA confirma que las diferencias no son estadísticamente significativas (Tabla 8) entre eritromicina y clindamicina desde 2012 hasta 2016. Resultado que es similar con el obtenido en un estudio en la zona de Australia, donde si bien se encontraron muestras con resistencia fenotípica tanto a eritromicina como a clindamicina, no se determinó que la diferencia fuese estadísticamente significativa entre los dos agentes antibióticos en dos periodos de tiempo (Garland et al., 2011). No obstante, en esta investigación no se analizó la varianza en dos periodos de tiempo dado que las muestras estudiadas corresponden a un periodo de cinco años consecutivos.

Tabla 8.

Análisis de varianza (ANOVA) de un factor

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
ERITRO	5	8	1.6	0.185
CLINDA	5	10.9	2.18	0.727

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.841	1	0.841	1.844298246	0.2115068	5.317655072
Dentro de los grupos	3.648	8	0.456			
Total	4.489	9				

Las incidencias de muestras resistentes a eritromicina y clindamicina siguen el mismo patrón que la incidencia de resultados positivos para el gen de resistencia *ermB* (Figuras 26, 28 y 29). El gen *ermB* está más relacionado con el fenotipo MLS y también explica mejor la resistencia a eritromicina que el gen *mreA*. Por otro lado, los resultados positivos del gen *mreA* no coinciden con el patrón de incidencia de muestras resistentes a eritromicina. Este gen no puede por sí solo explicar la resistencia al antibiótico macrólido (Oday et al., 2015) pero si puede estar relacionado tanto con una porción de resistencia como con funciones fisiológicas del microorganismo (Sun et al., 2014).

Si bien estos resultados no muestran una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la diferencia de los patrones de resistencia a eritromicina y clindamicina a través de un periodo de cinco años, si se puede confirmar el incremento inminente de muestras no susceptibles a estos dos agentes antibióticos. Considerando que la resistencia a estos compuestos se encuentra codificada en elementos genéticos móviles, se puede establecer que la incidencia de muestras con resistencia a ambos antimicrobianos se verá incrementada con el paso del tiempo con posibilidad de cruce inter-especie e inter-género (Varaldo, Montanari, & Giovanetti, 2009).

Hasta la actualidad, la eritromicina y la clindamicina constituyen una forma de tratamiento alternativo para pacientes que presentan enfermedades invasivas, infecciones o colonizaciones a causa de GBS, pero en base a los resultados tanto de esta investigación como varios resultados previos, se puede concluir

que las directrices oficiales de tratamiento deben ser revisadas y preferiblemente, modificadas. En caso de no ser así, las muestras deberían ser sometidas a antibiogramas específicos previa la dosificación de uno de estos compuestos antibióticos en casos de pacientes diagnosticados con cuadros clínicos causados por *Streptococcus agalactiae*.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

El gen *scpB* se encuentra altamente conservado entre las cepas de *Streptococcus agalactiae* y la ausencia del mismo en muestras de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* indicando que este gen es único para esta especie por lo que puede ser utilizado como identificador de diagnóstico.

El gen *scpB* resulta efectivo para la identificación de *Streptococcus agalactiae* independientemente del tipo de muestra de origen humano que se esté analizando y entrega resultados de forma más precisa y rápida que el método 'gold standard'.

A pesar de que el gen *mreA* no se encuentra completamente asociado a la resistencia a eritromicina, el mismo no puede ser descrito como un gen 'housekeeping' debido a que no encuentra en todas las cepas de *Streptococcus agalactiae*.

El gen *ermB* se encuentra más relacionado con la resistencia a eritromicina y el fenotipo MLS_B que el gen *mreA* en *Streptococcus agalactiae*.

El gen *mreA* por sí solo no puede explicar la resistencia a eritromicina, pero existe la posibilidad de que su presencia en muestras sensibles al macrólido se deba a que el gen cumple funciones fisiológicas en el microorganismo como lo indican evidencias recientes sobre los eflujos activos de resistencia.

El incremento en la resistencia de *Streptococcus agalactiae* a eritromicina y clindamicina es inminente por lo que las muestras deben ser sometidas a antibiogramas específicos para los dos agentes antibióticos previa su dosificación.

6.2 Recomendaciones

El análisis del gen *scpB* en muestras previamente descritas como *Streptococcus agalactiae* comprobó su efectividad y su sensibilidad como factor de identificación para el microorganismo. Sin embargo, se recomienda realizar el estudio de forma comparativa y simultánea con el método de cultivo para obtener tasas de sensibilidad y especificidad sobre el método a base de PCR.

En el caso de los análisis retrospectivos, se recomienda estandarizar el número de muestras que se obtienen por año, con el fin de reducir el sesgo estadístico y obtener resultados más certeros en cuanto a las incidencias anuales.

En este estudio, se seleccionaron los genes *mreA* y *ermB* debido a que son los que se encuentran con mayor frecuencia en muestras de *Streptococcus agalactiae*. No obstante, para comprobar completamente el fenotipo MLS_B, se recomienda identificar los genes *ermA*, *mefA/E* y *LinB*.

Para comprobar el incremento de resistencia a eritromicina y clindamicina de una forma más amplia, se recomienda tomar muestras de *Streptococcus agalactiae* en dos periodos de tiempo no consecutivos con el fin de establecer una comparación sobre la varianza de los promedios obtenidos entre los dos periodos de investigación.

En base a los resultados de esta investigación, se recomienda mantener una vigilancia continua sobre el desarrollo de resistencia antimicrobiana desarrollada por *Streptococcus agalactiae* a futuro.

Referencias

- 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*. Vol. 28. No. 4: 334- 337. doi 10.4067/S0716-10182011000500005.
- Ahmadzia, H., & Heine, P. (2014). *Diagnosis and Management of Group B Streptococcus in Pregnancy*. *Obstetrics & Gynecology Clinics of North America*. Vol. 41: 629-647. doi 10.1016/JGS.2014.08.009.
- American Association for Clinical Chemistry. (2015). *Prenatal Group B Strep Screening*. Recuperado el 28 de marzo de 2017 de <https://labtestsonline.org/understanding/analytes/group-b-strep/tab/glance>
- American College of Obstetricians and Gynecologists. (2015). *Group B Strep and Pregnancy. FAQ. 105: Pregnancy*. *The American College of Obstetricians and Gynecologists. Women's Health Physicians*. Recuperado el 29 de marzo de 2017 de <https://www.acog.org/~media/For%20Patients/faq105.pdf>
- American Pregnancy Association. (2017). *Group B Strep Infection: GBS*. Recuperado el 28 de marzo de 2017 de <http://americanpregnancy.org/pregnancy-complications/group-b-strep-infection/>
- Anderson, D. (2004). *The ways in which bacteria resist antibiotics. The Global Threat of Antibiotic Resistance: Exploring Roads towards Concerted Action*. Upland, Sweden. *Background Document*. Recuperado el 4 de abril de http://archives.who.int/prioritymeds/report/append/microb_apx.pdf

- Ashnagar, A., & Brandao, G. (2007). *Analysis of Three Penicillin Antibiotics (Ampicillin, Amoxicillin and Cloxacillin) of Several Iranian Pharmaceutical Companies by HPLC*. E- Journal of Chemistry. Vol. 4. No. 4: 536- 545. doi 10.1155/2007/480907.
- Ayra, A., Cryan, B., O'Sullivan, K., Greene, R., & Higgins, J. (2008). *Self-collected versus health professional-collected genital swabs to identify the prevalence of group B streptococcus: A comparison of patient preference and efficacy*. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. No. 139: 43-45. doi 10.1016/j.ejogrb.2007.12.005.
- Azavedo, J., McGavin, M., Duncan, C., Low, D., & McGeer, A. (2001). *Prevalence and Mechanisms of Macrolide Resistance in Invasive and Noninvasive Group B Streptococcus Isolates from Ontario, Canada*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 45. No. 12: 3504- 3508. doi 10.1128/AAC.45.12.3504.3508.2001.
- Barton, L., Feigin, R., & Lins, R. (1973). *Group B beta hemolytic meningitis in infants streptococcal*. *The Journal of Pediatrics*. Vol 82. No.4: 719-723. doi 10.1016/S0022-3476(73)80605-5.
- Baudoux, P., Lemaire, S., Denis, O., Tulkens, P., Van Bambeke, F., & Glupczynski, Y. (2007). *Activity of quinupristin/dalfopristin against extracellular and intracellular Staphylococcus aureus with various resistance phenotypes*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol.59: 246- 253. doi 10.1093/jac/dkq110.
- Berardi, A., Rossi, C., Lugli, L., Creti, R., Bacchi, M., Lanari, M., Ciccia, M. (2012). *Group B Streptococcus Late-Onset Disease: 2003–2010*. *Pediatrics*. Volume 131. No. 2: e361- e368. doi 10.1542/peds.2012-1231.
- Bergseng, H., Bevanger, L., Rygg, M., & Bergh, K. (2007). *Real-time PCR targeting the sip gene for detection of group B streptococcus*

colonization in pregnant women at delivery. Journal of Medical Microbiology. 56, 223-228. doi 10.1099/jmm.0.46731.

Betriu, C., Culebras, E., Rodríguez- Avial, M., Gómez, M., Sánchez, B., & Picazo, J. (2004). *In Vitro Activities of Tigecycline against Erythromycin-Resistant Streptococcus pyogenes and Streptococcus agalactiae: Mechanisms of Macrolide and Tetracycline Resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* Vol. 48. No. 1: 323- 325. doi

Bhushan, R., Bascom, A., & Carl, F. (1998). *Estimation of Group B Streptococcus Type III Polysaccharide-Specific Antibody Concentrations in Human Sera Is Antigen Dependent. Infection and Immunity.* Vol 66. No.12. 5848-5853. doi 0019- 9567/98/\$04.00+0.

Bidgani, S., Navidifar, T., Najafian, M., & Amin, M. (2015). *Comparison of group B streptococci colonization in vaginal and rectal specimens by culture method and polymerase chain reaction technique. Journal of the Chinese Medical Association. Article in Press.* doi 10.1016/j.jcma.2015.06.021.

Blancas, D., Santin, M., Olmo, M., Alcaide, F., Carratala, J., & Gudiol, F. (2004). *Group B Streptococcal Disease in Nonpregnant Adults: Incidence, Clinical Characteristics, and Outcome. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* Vol. 23: 168-173. doi 10.1007/s10096-003-1098-9

Bolukaoto, J., Monyama, C., Chukwu, M., Lekala, S., Nchabeleng, M., Maloba, M., Moyo, S. (2015). *Antibiotic resistance of Streptococcus agalactiae isolated from pregnant women in Garankuwa, South Africa. BioMed Central Research Notes.* Vol.8. Pags 364. doi 10.1186/s13104-015-1328-0.

Borchardt, S., DeBusscher, J., Tallman, P., Manning, S., Marrs, C., Kurzynski, T., & Foxman, B. (2006). *Frequency of antimicrobial resistance among*

invasive and colonizing Group B Streptococcal isolates. BMC Infectious Diseases. Vol. 6: 57- 65. doi 10.1186/1471-2334-6-57.

Bourgeois, N., Cordler, A., Gullet, C., Casanova, F., Benachi, A., & Doucet, F. (2013). *Evaluation of the Cepheid Xpert GBS Assay for Rapid Detection of Group B Streptococci in Amniotic Fluids from Pregnant Women with Premature Rupture of Membranes. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 51. No. 4: 1305-1306. doi 10.1128/JCM.03356.*

Breslin, B., Ferguson, J., Byrum, D., Foster, M., Kelly, D., Lyons, M., ... Perles, G. (2011). *Microbiology Module: Antimicrobial Resistance. Bacterial Resistance Strategies. Molecular Basis of Resistance. Detecting AMR.* Recuperado el 4 de abril de 2017 de [http://amrls.cvm.msu.edu/microbiology/ tools/module-pdf-files/microbiology](http://amrls.cvm.msu.edu/microbiology/tools/module-pdf-files/microbiology)

Brzychczy- Wloch, M., Gosiewski, T., Bodaszewska, M., Pabian, W., Bulanda, M., Kochan, P., ... Heckzo, P. (2010). *Genetic characterization and diversity of Streptococcus agalactiae isolates with macrolide resistance. Journal of Medical Microbiology. Vol. 59: 780- 786. doi 10.1099/jmm.0.018176-0.*

Burnham, C. A., & Tyrrell, G. (2003). *Virulence factors of group B streptococci. Reviews in Medical Microbiology. Vol.14:109–118. ISSN 0954- 139X.* Recuperado el 23 de marzo de 2017 de [http://journals.lww.com/revmedmicrobiol/Abstract/2003/10000/Virulence_factors_of_group_B_streptococci.2.aspx?trendmd-shared=0.](http://journals.lww.com/revmedmicrobiol/Abstract/2003/10000/Virulence_factors_of_group_B_streptococci.2.aspx?trendmd-shared=0)

Canu, A., & Leclercq, R. (2009). *Antimicrobial Drug Resistance: Macrolides and Lincosamides. In Infectious Disease. Vol. 1, pp. 211–221. Humana Press. Springer Science+ Bussiness Media, LLC. doi 10.1007/978-1-59745-180-2_18.*

- Carlin, A., Yung-Chi, C., Areschoug, T., Lindahl, G., Hurtado-Ziola, N., King, C., Nizer, V. (2009). *Group B Streptococcus suppression of phagocyte functions by protein-mediated engagement of human Siglec-5. The Journal of Experimental Medicine*. Vol.206 No.8: 1691-1699. doi 10.1084/jem.20090691.
- Castor, M., Whitney, C., Como-Sabetti, K., Facklam, R., Ferrieri, P., Bartkus, J., Lynfield, R. (2008). *Antibiotic Resistance Patterns in Invasive Group B Streptococcal Isolates. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. Vol 2008: 1-5. doi 10.1155/2008/727505.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2012). *Group B Streptococcus (GBS)*. 1600 Clifton Road Atlanta, GA 30329-4027 USA 800-CDC-INFO (800-232-4636), TTY: 888-232-6348. *Department of Health & Human Services of USA*. Recuperado el 29 de noviembre de 2016 desde <https://www.cdc.gov/groupbstrep/references.html>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2016a). *Group B Streptococcus (GBS)*. Recuperado el 24 de marzo de <https://www.cdc.gov/groupbstrep/about/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2016b). *Group B Streptococcus GBS. Clinical Overview*. 1600 Clifton Road Atlanta, GA 30329-4027 USA 800-CDC-INFO (800-232-4636), TTY: 888-232-6348. *Department of Health & Human Services of USA*. Recuperado el 24 de marzo de 2017 de <https://www.cdc.gov/groupbstrep/references.html>
- Chaiwarith, R., Jullaket, W., Bunchoo, M., Nuntachit, N., Sirisanthana, T., & Supparatpinyo, K. (2011). *Streptococcus agalactiae in adults at Chiang Mai University Hospital: a retrospective study. BMC Infectious Diseases*. Vol 11: 149- 156. doi 10.1184/1471-2334-11-149.

- Cheng, Q., Stafslie, D., Sudha, S., & Cleary, P. (2002). *The Group B Streptococcal C5a Peptidase Is Both a Specific Protease and an Invasin*. *Infection and Immunity*. Vol 70. No. 5: 2408-2413. doi 10.1128/IAI.70.5.2408-2413.2002.
- Clancy, J., Dib-Haji, F., Petitpas, J., & Yuan, W. (1997). *Cloning and Characterization of a Novel Macrolide Efflux Gene, mreA, from Streptococcus agalactiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 41. No. 12: 2719- 2723. doi 0066-4804/97\$04.00+0.
- Clarebout, C., Villers, C., & Leclercq, R. (2001). *Macrolide Resistance Gene mreA of Streptococcus agalactiae Encodes a Flavokinase*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol 45. No. 8: 2280- 2286. doi 10.1128/AAC.45.08.2280-2286.2001.
- Concelção, N., Barta de Oliveira, C., Pinheiro da Silva, L., Rezende, L., & Gonçalves de Oliveira, A. (2012). *Ampicillin Susceptibility Can Predict In Vitro Susceptibility of Penicillin-Resistant, Ampicillin-Susceptible Enterococcus faecalis Isolates to Amoxicillin but Not to Imipenem and Piperacillin*. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 50. No. 11: 3729-3731. doi 10.1128/JCM.01246-12.
- Cox, G., & Wright, G. (2013). *Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions*. *International Journal of Medical Microbiology*. Vol. 303: 287- 292. doi 10.1016/j.ijmm.2013.02.009.
- Crespo, M., Castañeda, C., Recalde, M., & Vélez, J. (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. doi 10.1186/1471-2334-14-428.
- De Francesco, M., Caracciolo, S., Gargiulo, F., & Manca, N. (2012). *Phenotypes, genotypes, serotypes and molecular epidemiology of erythromycin-*

resistant Streptococcus agalactiae in Italy. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. Vol. 31: 1741- 17474. doi 10.1007/s10096-011-1495-4.

De Paris, F., Machado, A., Gheno, T., Ascoli, B., Oliveira, K., & Barth, A. (2011). *Group B Streptococcus detection: comparison of PCR assay and culture as a screening method for pregnant women. Brazilian Journal of Infectious Diseases.* Vol. 15. Pags 323-327. doi 10.1590/S1413-86702011000400004.

Dermer, P., Lee, C., Eggert, J., & Few, B. (2004). *A History of Neonatal Group B Streptococcus with Its Related Morbidity and Mortality Rates in the United States. Journal of Pediatric Nursing.* Vol 19. No 5. Pags. 357-363. doi 10.1016/j.pedn.2004.05.012.

DiPersio, L., & DiPersio, J. (2006). *High rates of erythromycin and clindamycin resistance among OBGYN isolates of group B Streptococcus. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* Vol.54: 79- 82. doi 10.1016/j.diagmicrobio.2005.07.003.

Dmitriev, A., Suvorov, A., Shen, A., & Yang, Y. (2004). *Clinical diagnosis of group B streptococci by scpB gene based PCR. Indian Journal of Medical Research.* Vol. 119: 233-236. Recuperado el 7 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15232202>.

Duarte, R., Bellei, B., Miranda, O., Brito, M., & Teixeira, L. (2005). *Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence-Related Genes among Brazilian Group B Streptococci Recovered from Bovine and Human Sources. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* Vol. 49. No.1: 97-103. PMID: 15232202. Recuperado el 7 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC538850/>

Dutra, V., Alves, V., Olendzki, A., Dias, C., De Bastos, A., Santos, G., Murta, E. (2014). *Streptococcus agalactiae in Brazil: serotype distribution,*

virulence determinants and antimicrobial susceptibility. BMC Infectious Diseases. Vol. 14: 323. doi 10.1186/1471-2332-14-323.

Edwards, M., & Scrivo, C. (2006). *Group B Streptococcal Infections in Elderly Adults. Clinical Infectious Diseases. Aging and Infectious Diseases* Vol. 41: 839-847. doi 10.1086/432804.

Elbaradie, S., Mahmoud, M., & Farid, M. (2009). *Maternal and Neonatal Screening for Group B Streptococci by SCPB gene based PCR: A Preliminary Study. Indian Journal of Medical Microbiology.* 27(1): 17-21. PMID: 19172053. Recuperado el 23 de marzo de 2017 de <http://www.bioline.org.br/pdf?mb09004>.

Emaneini, M., Mirsalehian, A., Beigvierdi, R., Foolad, 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. Maedica: A Journal of Clinical Medicine.* Vol 9. No. 2: 157-161. PMCID: 25705271. Recuperado el 12 de mayo de 2017 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4296758/pdf/maed-09-157.pdf>.

Eskandarian, N., Ismail, Z., Neela, V., Belkum, A., Desa, M., & Nordin, S. (2014). *Antimicrobial susceptibility profiles, serotype distribution and virulence determinants among invasive, non-invasive and colonizing Streptococcus agalactiae (group B streptococcus) from Malaysian patients. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* doi 10.1007/s10096-014-2265-x.

Facklam, R. (2002). *What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. Clinical Microbiology Reviews.* Vol. 15. No. 4: 613-630. PMID: 12364372. Recuperado el 12 de mayo de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12364372>.

- Falagas, M., Rosmarakis, E., Avramopoulos, I., & Vakalis, N. (2006). *Streptococcus agalactiae* infections in non-pregnant adults: Single center experience of a growing clinical problem. *Medical Science Monitor*. Vol. 12. No.11: CR447- 451. PMID: 17072267. Recuperado el 18 de mayo de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17072267>.
- Fitoussi, F., Loukil, C., Gros, I., Clermont, O., Mariani, P., Bonacorsi, S., Bingen, E. (2001). *Mechanisms of Macrolide Resistance in Clinical Group B Streptococci Isolated in France. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 45. No. 6: 1889- 1891. doi 10.1128/AAC.45.6.1889- 1891.2001
- Florindo, C., Viegas, S., Paulino, A., Rodriguez, E., Gomes, J., & Borrego, M. (2010). *Molecular characterization and antimicrobial susceptibility profiles in Streptococcus agalactiae colonizing strains: association of erythromycin resistance with subtype III-1 genetic clone family. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Vol. 16: 1458- 1463. doi 10.1111/j.1469-0691.2009.03106.x.
- Galarza, P., Lomuto, C., Ortega, C., Mormandi, J., García, F., Sarubbi, M., Bruno, M. (2004). Recomendaciones para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección neonatal precoz por Estreptococo β Hemolítico del Grupo B (EGB). Dirección Nacional de Salud Materno Infantill. Recuperado el 29 de noviembre de 2016 de <http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000318cnt-consenso-estreptococo-B-hemolitico.pdf>.
- Garland, S., Cottril, E., Markowski, L., Pearce, C., Clifford, V., Ndisang, D., Daley, A. (2011). *Antimicrobial resistance in group B streptococcus: the Australian experience. Journal of Medical Microbiology*, 60, 230-235. doi 10.1099/jmm.0.022616-0.

- Group B Strep Support. GBSS. (2015a). *Incidence of group B Strep infection in England, Wales & Northern Ireland. Group B Strep Support, P O Box 203, Haywards Heath, West Sussex, RH16 1GF*. Recuperado el 29 de noviembre de 2017 de <http://gbss.org.uk>.
- Group B Strep Support. GBSS. (2015b). *Sensitive tests designed to detect group B Strep carriage. Group B Strep Support, P O Box 203, Haywards Heath, West Sussex, RH16 1GF*. Recuperado el 19 de noviembre de 2017 de <http://gbss.org.uk/information-and-support/testing-for-gbs/which-test-for-gbs/>
- Gygax, S., Schuyler, J., Kimmel, L., Trama, J., Mordechai, E., & Adelson, M. (2006). *Erythromycin and Clindamycin Resistance in Group B Streptococcal Clinical Isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol 50. No. 5: 1875- 1877. doi 10.1128/AAC.50.5.1875- 1877.2006.
- Hannoun, A., Sehab, M., Khairallah, M.-T., Sabra, A., Abi-Rached, R., Bazi, T., Matar, G. (2009). *Correlation between Group B Streptococcal Genotypes, Their Antimicrobial Resistance Profiles, and Virulence Genes among Pregnant Women in Lebanon. Hindawi Publishing Corporation. International Journal of Microbiology*. Vol. 2009. doi 10.1155/2009/79512.
- Hawkins, P., Chochua, S., Jackson, D., Beall, B., & McGee, L. (2014). *Mobile Elements and Chromosomal Changes Associated with MLS Resistance Phenotypes of Invasive Pneumococci Recovered in the United States. Microbial Drug Resistance. Centers for Disease Control and Prevention*. Vol. 00. No. 00: 1-9. doi 10.1089/mdr.2014.0086.
- Health Protection Agency. (2010). *Pyogenic and non-pyogenic streptococcal bacteraemia: annual data from voluntary surveillance. Health Protection Report. Weekly Report*. Vol. 6 No. 46. Recuperado el 29 de

abril de 2017 de <https://www.gov.uk/government/collections/health-protection-report-latest-infection-reports>.

- Heelan, J., Hasenbein, M., & McAdam, A. (2004). *Resistance of Group B Streptococcus to Selected Antibiotics, Including Erythromycin and Clindamycin*. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 42. No.3: 1263-1264. doi 10.1128/JCM.42.3.1263-1264.2004.
- Helali, N., Nguyen, J. C., Ly, A., Giovangrandi, Y., & Trinquart, L. (2009). *Diagnostic Accuracy of a Rapid Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Universal Intrapartum Group B Streptococcus Screening*. *Clinical Infectious Diseases*. Vol. 49: 417- 423. doi 10.1086/600303.
- Hordnes, K., Stray- Pedersen, B., Øian, P., & Brigsten, A. (2007). *Group B streptococcus in pregnancy and delivery*. Recuperado el 27 de marzo de <http://www.nfogg.org/files/guidelines/11%20NGF%20Obst%20Group%20B%20Strep%20Hordnes.pdf27>
- Hraoui, M., Boutiba- Ben, I., Rachdi, M., Slim, A., & Redjeb, S. (2012). *Macrolide and tetracycline resistance in clinical strains of Streptococcus agalactiae isolated in Tunisia*. *Journal of Medical Microbiology*. Vol. 61: 1009-1113. doi 10.1099/jmm.0.037853-0.
- Hsueh, P., Teng, L., Lee, L. na, Ho, S., Yang, P., & Luh, K. (2001). *High Incidence of Erythromycin Resistance among Clinical Isolates of Streptococcus agalactiae in Taiwan*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol.45. No. 1: 3205- 3208. doi 10.1128/AAC.45.11.3205-3208.2001.
- Jelić, D., & Antolović, R. (2016). *From Erythromycin to Azithromycin and New Potential Ribosome-Binding Antimicrobials*. *Antibiotics*. Vol. 5. No. 29: 2-13. doi 10.3390/antibiotics5030029.

- Johri, A., Lata, H., Yadav, P., Dua, M., Yang, Y., Xu, X., Black, S. (2013). *Epidemiology of Group B Streptococcus in developing countries. Elsevier Ltd. Vaccine* 31S: D43-D45. doi 10.1016/j.vaccine.2013.05.094.
- Khafri, A., & Nazari, A. (2004). *The Rapid CAMP Test for Identification of Streptococcus agalactiae Using Alpha Toxin*. Archives of Razi Institue. Vol 58: 119- 124. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de http://archrazi.areeo.ac.ir/article_103831_10565.html.
- Kimura, K., Susuki, S., Wachino, J., Kurokawa, H., Yamane, K., Shibata, N., Arakawa, Y. (2008). *First Molecular Characterization of Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 52. No. 8: 2890- 2897. doi 10.1128/AAC.00185-08.
- Kothari, N., Morin, C., Glennen, A., Jackson, D., Harper, J., Schrag, S., & Lynfield, R. (2009). *Invasive group B streptococcal disease in the elderly. Emerging Infectious Diseases. Minnesota, USA, 2003-2007*.15(8), 1279-1281. doi 10.3201/eid1508.081381.
- Lachenauer, C., Kasper, D., Shimada, J., Ichiman, Y., Ohtsuka, H., Kaku, M., ... Madoff, L. (1999). *Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. Journal of Infectious Diseases*. Vol. 4. No. 4. Pags. 1030-1033. doi 10.1086/314666.
- Lancefield, R., & Hare, R. (1935). *The Serological differentiation of pathogenic and non- pathogenic strains of hemolytic Streptococci from parturient women. Journal of Experimental Medicine*. 61:335-49. Recuperado el 6 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2133228/>

- Landwehr, K., & Henneke, P. (2014). *Interaction of Streptococcus agalactiae and Cellular Innate Immunity in Colonization and Disease*. *Frontiers in Immunology*; Vol 5:519. doi 10.3389/fimmu.2014.00519.
- Larsen, J., & Sever, J. (2008). *Group B Streptococcus and pregnancy: a review*. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. Vol. 198. No. 4: 440-448. doi 10.1016/j.ajog.2007.11.0.30.
- Lin, F., Weisman, L., Azimi, P., Young, A., Chang, K., Cielo, M., Robbins, J. (2011). *Assessment of Intrapartum Antibiotic Prophylaxis for the Prevention of Early-onset Group B Streptococcal Disease*. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. Vol. 30. No. 9: 759-763. doi 10.1095/INF.0b013e31821dc76f.
- Louisiana Office of Public Health. (2011). *Streptococcal Group B – Annual Report*. Louisiana Office of Public Health – Infectious Disease Epidemiology Section. Recuperado el 12 de mayo de 2017 de http://new.dhh.louisiana.gov/assets/oph/Center-PHCH/Center-CH/infectious-epi/Annuals/LalDAnnual_StrepBInvasive.pdf
- Lu, B., Li, D., Cui, Y., Sui, W., Huang, L., & Lu, X. (2014). *Epidemiology of Group B streptococcus isolated from pregnant women in Beijing, China*. *Clinical Microbiology and Infections*. Vol. 20: O370-O373. doi 10.1111/1469-0691.12416.
- Luminex Corporation. (2017). *Luminex Corporation Receives FDA Clearance for ARIES® GBS Assay*. Recuperado el 28 de marzo de <http://www.prnewswire.com/news-releases/luminex-corporation-receives-fda-clearance-for-aries-gbs-assay-300385029.html>
- Lysakowska, M., Kalinka, J., Bigos, M., Prosniewska, M., & Wasiela, M. (2011). *Occurrence of virulence genes among S. agalactiae isolates from vagina and anus of pregnant women – a pilot study*. *Archives of Perinatal Medicine*. Vol. 17. No. 4: 229-234. PMID: 264887102.

Recuperado el 13 de mayo de 2017 de https://www.researchgate.net/publication/264887102_Occurrence_of_virulence_genes_among_S_agalactiae_isolates_from_vagina_and_anus_of_pregnant_women_-_A_pilot_study.

- Madhi, S., Dangor, Z., Heath, P., Schrag, S., Izu, A., Sobanjo-ter Meulen, A., & Dull, P. (2013). *Considerations for a phase-III trial to evaluate a group B Streptococcus polysaccharide-protein conjugate vaccine in pregnant women for the prevention of early- and late-onset invasive disease in young-infants*. Elsevier Ltd. *Vaccine* 31S: D52-D57. doi 10.1016/j.vaccine.2013.0.029.
- Maeda, K., Hondo, E., Terakawa, J., Kiso, Y., Nakaichi, N., Endoh, D., ... Mizutani, T. (2008). *Fluoroquinolone- Resistant Group B Streptococci in Acute Exacerbation of Chronic Bronchitis*. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 14. No. 2: 349- 350. Recuperado el 16 de mayo de 2017 desde <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18258143>.
- Malbruny, B., Werno, A., Murdoch, D., Leclercq, R., & Cattoir, V. (2011). *Cross-Resistance to Lincosamides, Streptogramins A, and Pleuromutilins Due to the Isa(C) Gene in Streptococcus agalactiae UCN70*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 55. No. 4: 1470-1474. doi 10.1128/AAC.01068-10.
- Manning, S., Neighbors, K., Tallman, P., Gillespie, B., Marrs, C., Borchardt, S., Foxman, B. (2004). *Prevalence of Group B Streptococcus Colonization and Potential for Transmission by Casual Contact in Healthy Young Men and Women*. *Clinical Infectious Diseases*. Vol. 39: 380-388. doi 10.1086/422321.
- Marimón, J., Valiente, A., Ercibengoa, M., García- Arenzana, J., & Pérez-Trallero, E. (2005). *Erythromycin Resistance and Genetic Elements Carrying Macrolide Efflux Genes in Streptococcus agalactiae*.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 49. No. 12: 5069- 5074.
doi 10.1128/AAC.49.12.5069-5074.2005.

Mashouf, R., Mousavi, M., Rabiee, S., Yousef, M., & Arabestani, M. (2014). Direct Identification of *Streptococcus agalactiae* in Vaginal Colonization in Pregnant Women Using Polymerase Chain Reaction. *Journal of Comprehensive Pediatrics*. ISSN: 2155-9597. Recuperado el 11 de mayo de 2017 de <http://en.journals.sid.ir/ViewPaper.aspx?ID=410740>

Mayo Clinic. (2016). *Group B strep disease*. Recuperado el 28 de marzo de 2017 de <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/group-b-strep/diagnosis-treatment/diagnosis/dxc-20200556>.

Ministerio de Salud Pública de Ecuador. (2015). Sepsis Neonatal. Guía de Práctica Clínica GPC. Ministerio de Salud Pública. Gobierno de la República del Ecuador. Recuperado el 29 de noviembre de 2016 de http://gpc.minsalud.gov.co/gpc_sites/Repositorio/Conv_500/GPC_rnsn/GPC_Completa_Sepsis.pdf

Morar, M., Bhullar, K., Hughes, D., Junop, M., & Wright, G. (2009). Structure and Mechanism of the Lincosamide Antibiotic Adenylyltransferase LinB. *Structure*. Vol. 17: 1649- 1659. doi 10.1016/j.str.2009.10.03.

Mousavi, M., Hosseini, M., Mashouf, R., & Arabestani, M. (2016). Identification of Group B Streptococci Using 16S rRNA, *cfb*, *scpB*, and *atr* Genes in Pregnant Women by PCR. *Acta Medica Iran*. Vol. 54. No. 12: 765-770. PMID: 2812587.

Nagano, N., Nagano, Y., Toyama, M., Kimura, K., Tamura, T., Keigo, S., & Arakawa, Y. (2012). Nosocomial spread of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility belonging to clonal complex. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 67: 849- 856. doi 10.1093/jac/dkr546.

- Nakamura, P., Schuab, R., Neves, F., Pereira, C., De Paula, G., & Barros, R. (2011). *Antimicrobial resistance profiles and genetic characterisation of macrolide resistant isolates of Streptococcus agalactiae*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Vol. 106. No.2: 119-122. PMID 21537668. Recuperado el 17 de mayo de 2017 de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S007402762011000200001&lng=en&nrm=iso&tlng=en.
- Nuccitelli, A., Rinaudo, D., & Maione, D. (2015). *Group B Streptococcus vaccine: state of the art*. *Therapeutic Advances in Vaccines*. *Therapeutic Advances in Vaccines*. Vol. 3. No. 3: 76-90. doi 10.11.77/2051013615579869.
- O' Connor, R. (2004). *Tetracyclines, Chloramphenicol, Macrolides and Lincosamides*. In *Modern Pharmacology with Clinical Applications* (6th ed., pp. 544–551. Baltimore, USA: Lippincott Williams & Wilkings. A Wolters Kluwer Company. Recuperado el 1 de abril de 2017 de [https://www.federaljack.com/ebooks/My%20collection%20of%20medical%20books,%20208%20Books%20\(part%201%20of%203\)/Modern%20Pharmacology%20With%20Clinical%20Applications/Ch47.pdf](https://www.federaljack.com/ebooks/My%20collection%20of%20medical%20books,%20208%20Books%20(part%201%20of%203)/Modern%20Pharmacology%20With%20Clinical%20Applications/Ch47.pdf).
- Oday, H., Neihaya, Z., & Munim, A. (2015). *Prevalence of macrolide resistance genes among Group B Streptococci in pregnant women*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. Vol. 4. No. 1: 419- 436. ISSN 2319– 7706. Recuperado el 11 de abril de 2017 de <https://www.ijcmas.com/vol-41/Zainab%20Oday%20Hamid,%20unjet20al.pdf>.
- Ortiz, L., & Bazante, V. (2008). Prevalencia de Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae y Streptococcus agalactiae, en pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra, año 2008. Universidad Central del Ecuador. Recuperado el 29 de noviembre de 2016 de <http://pesquisa.bvsalud.org/bvsecuador/resource/pt/equ-6660>.

- Otaguiri, E., Morguette, A., Tavares, E., Dos Santos, M., Tadachi, A., Cardoso, J., Yamada, S. (2013). *Commensal Streptococcus agalactiae* isolated from patients seen at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil: capsular types, genotyping, antimicrobial susceptibility and virulence determinants. *BMC Microbiology*. 13:297. doi 10.1186/1471-2180-13297.
- Panda, B., Iruretagoyena, I., Stiller, R., & Panda, A. (2009). *Antibiotic resistance and penicillin tolerance in ano-vaginal group B streptococci*. *The Journal of Maternal- Fetal and Neonatal Medicine*. Vol 22. No. 2: 111-114. doi 10.1080/1476705'802488202.
- Peláez, L., Gelber, S., Fox, N., & Chasen, S. (2009). *Inappropriate use of vancomycin for preventing perinatal group B streptococcal (GBS) disease in laboring patients*. *Journal of Perinatal Medicine*. Vol. 37: 487- 489. doi 10.1515/JPM.2009.090.
- Persson, E., Berg, S., Bergseng, H., Bergh, K., Valsö- Lyng, R., & Trollfors, B. (2008). *Antimicrobial susceptibility of invasive group B streptococcal isolates from south-west Sweden 1988-2001*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. Vol. 40: 308- 313. doi 10.1080/00365540701678702.
- Phares, C., Lynfield, R., Farley, M., Mohle-Boetani, J., Harrison, L., Petit, S., ... Schrag, S. (2008). *Epidemiology of Invasive Group B Streptococcal Disease in the United States, 1999-2005*. *JAMA*. Vol. 299, No. 17 (Reprinted). doi 10.1001/jama.297.17.2056.
- Phillips, E., Tapsall, J., & Smith, D. (1980). *Rapid Tube CAMP Test for Identification of Streptococcus agalactiae (Lancefield Group B)*. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 12. No. 2: 135- 137. doi 0095-1137/80/08-0135/03\$02.00/0.

- Piddock, L. (2006). *Multidrug-resistance efflux pumps — not just for resistance*. *Nature Publishing Group*. Vol. 4: 629- 636. doi 10.1038/nrmicro1464.
- Pincus, D. (2006). *MICROBIAL IDENTIFICATION USING THE BIOMÉRIEUX VITEK® 2 SYSTEM*. *bioMérieux, Inc. Hazelwood, MO. United States*. Recuperado el 28 de abril de 2017 de https://store.pda.org/tableofcontents/ermm_v2_ch01.pdf
- Pinto, T., Costa, N., Almeida, A., Oliviera, I., De Mattos, M., Soares, A., & Benchetrit, L. (2014). *Conjugative transfer of resistance determinants among human and bovine Streptococcus agalactiae*. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol. 35. No. 3: 785-789. PMID: 4204959. ISSN: 1678- 4405. Recuperado el 12 de mayo de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4204959/>
- Pokhrel, P. (2015). *CAMP Test- Principle, Purpose, Procedure, Result and Limitation*. Recuperado el 1 de abril de 2017 de <http://www.microbiologynotes.com/camp-test-principle-purpose-procedure-result-and-limitation/>
- Quiroga, M., Pegels, E., Oviedo, P., Pereyra, E., & Vergara, M. (2008). *Antibiotic susceptibility patterns and prevalence of group B Streptococcus isolated from pregnant women in Misiones, Argentina*. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol. 39: 245- 250. doi 10.1590/S1517-83822008000200009.
- Rallu, F., Barriga, P., Scrivo, C., Martel-Laferrrière, V., & Laferrrière, C. (2006). *Sensitivities of Antigen Detection and PCR Assays Greatly Increased Compared to That of the Standard Culture Method for Screening for Group B Streptococcus Carriage in Pregnant Women*. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 44. No. 3: 725-728. doi 10.1128/JCM.44.3.725- 728.2006

- Rao, S. (2009). *CAMP Test*. Department of Microbiology JJMC, Davangere. Recuperado el 1 de abril de 2017 de https://www.microrao.com/micronotes/camp_test.pdf
- Sadaka, S., Abdelsalam, H., Meheissen, M., Orief, Y., & Arafa, B. (2017). *Group B streptococcal carriage, antimicrobial susceptibility, and virulence related genes among pregnant women in Alexandria, Egypt*. *Alexandria Journal of Medicine*. Article in Press. doi 10.1016/j.ajme.2017.01.003
- Safadi, R., Amor, S., Hery-Arnaud, G., Spellerberg, B., Lanotte, P., Mereghetti, L., Rosenau, A. (2010). *Enhanced Expression of Imb Gene Encoding Laminin- Binding Protein in Streptococcus agalactiae Strains Harboring IS1548 in scpB-Imb Intergenic Region*. *Region. PLoS One*. Vol 5. No. 5: e10794. doi 10.1371/journal.pone.0010794.
- Sasirekha, B., Usha, M., Amruta, J., Ankit, S., Brinda, N., & Divya, R. (2014). *Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance among hospital-associated Staphylococcus aureus*. *3 Biotech*. Vol 4: 85- 89. doi 10.1007/s13205-013-0133-5.
- Savoia, D., Gottimer, C., Crocilla, C., & Zucca, M. (2008). *Streptococcus agalactiae in pregnant women: Phenotypic and genotypic characters*. *Journal of Infection*. Vol. 46: 120- 125. doi 10.1016/j.jinf.2007.11.007.
- Schoening, T., Wagner, J., & Arvand, M. (2005). *Prevalence of erythromycin and clindamycin resistance among Streptococcus agalactiae isolates in Germany*. *Clinical Microbiology and Infection*. Vol. 11. No. 7: 577- 596. doi 10.1111/j.1469-0691.2005.01.180.x
- Schrag, S., Fulz-Butts, K., & Schuchat, A. (2002). *Prevention of perinatal Group B Streptococcal disease*. In *MMWR*. Volume 51. Center for Disease Control: 1-22. Recuperado el 23 de marzo de 2017 de <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5910a1.htm>.

- Schrag, S., & Verani, J. (2013). *Intrapartum antibiotic prophylaxis for the prevention of perinatal group B streptococcal disease: Experience in the United States and implications for a potential group B streptococcal vaccine*. *Vaccine*. Vol. 31S: D20- D26. doi 10.1016/j.vaccine.2012.11.056.
- Schuchat, A. (1998). *Epidemiology of Group B Streptococcal Disease in the United States: Shifting Paradigms*. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol.11. No. 3: 497-513. PMID 9665980. PMCID 88893.
- Sendi, P., Johansson, L., & Norrby-Teglund, A. (2008). *Invasive Group B Streptococcal Disease in Non-pregnant Adults*. *Infection*. Vol. 36: 100-111. doi 10.1007/s15010-007-7251-0.
- Shabayek, S., Abdalla, S., & Abouzeid, M. (2010). *Comparison of scpB gene and cfb gene polymerase chain reaction assays with culture on Islam medium to detect Group B Streptococcus in pregnancy*. *Indian Journal of Medical Microbiology*. Vol.28: 320-325. doi 10.4103/0255-085771821.
- Sharma, S., Singh, L., & Singh, S. (2013). *Comparative Study between Penicillin and Ampicillin*. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences*. Vol 1. No. 4: 291-294. ISSN 2320- 6691. Recuperado el 15 de mayo de 2017 de <http://saspublisher.com/wp-content/uploads/2013/08/SJAMS14291-294.pdf>.
- Shaw, C., Mason, M., & Scoular, A. (2003). *Group B streptococcus carriage and vulvovaginal symptoms: causal or casual? A case-control study in a GUM clinic population*. *Journal Sexually Transmitted Infections*. No.79: 246-248. doi 10.1136/sti.79.3.246.
- Sherman, K., Whitehead, S., Blondel- Hill, E., Wagner, K., & Cheeptham, N. (2012). *Penicillin susceptibility and macrolide-*

lincosamidestreptogramin B resistance in group B Streptococcus isolates from a Canadian hospital. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology. Vol. 23. No. 4: 196- 198. PMID 3597397.

Simoes, J., Aroutcheva, A., Heimler, I., & Faro, S. (2004). *Antibiotic resistance patterns of group B streptococcal clinical isolates. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology.* Vol 12. No. 1: 1-8. doi 10.1080 /106474404110001722269.

Skoff, T., Farley, M., Petit, S., Schaffner, W., Gershman, K., Harrison, L., Schrag, S. (2008). *Increasing Burden of Invasive Group B Streptococcal Disease in Nonpregnant Adults, 1990–2007. Clinical Infectious Diseases.* Vol. 49: 85-92. doi 10.1086/599369.

Slotved, H., Kong, F., Lambertsen, L., Sauer, S., & Gilbert, G. (2007). *Serotype IX, a Proposed New Streptococcus agalactiae Serotype. Journal of Clinical Microbiology.* Vol. 45, No. 9: 2929-2936. doi 10.1128/JCM.00117-07.

Steer, P., McCartney, C., Bedford-Russell, A., & Cox, P. (2012). *Group B Streptococcus: The Facts for Health Professionals. Group B Strep Support, P O Box 203, Haywards Heath, West Sussex, RH16 1GF.* Recuperado el 24 de marzo de http://www.gbss.org.uk/filepool/2012_07_13_The_Facts_4_HealthProfessionals.pdf

Stoll, B., Hansen, N., Sánchez, P., Faix, R., Poindexter, B., Van Meurs, K., Frantz, I. (2011). *Early Onset Neonatal Sepsis: The Burden of Group B Streptococcal and E. coli Disease Continues. Pediatrics.* Vol. 127. No.5: 817-826. doi 10.1542/peds.2010- 2217.

Subsecretaría de Salud Pública. (2015). *Guía Perinatal. Subsecretaría de Salud Pública División Prevención y Control de Enfermedades Departamento de Ciclo Vital Programa Nacional Salud de la Mujer.*

Gobierno de Chile. Recuperado el 29 de noviembre de 2016 de http://web.minsal.cl/sijuites/default/files/files/GUIA%20PERINATAL_2015_%20PARA%20PUBLICAR.pdf

Sun, J., Deng, Z., & Yan, A. (2014). *Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. Biochemical and Biophysical Research Communications. Article in Press.* doi 10.1016/j.bbrc.2014.05.090.

Tang, P., Ng, P., Lum, M., Skulnick, M., Small, G., Low, D., Willey, B. (2004). *Use of the Vitek-1 and Vitek-2 Systems for Detection of Constitutive and Inducible Macrolide Resistance in Group B Streptococci. Journal of Clinical Microbiology.* Vol. 42. No. 5: 2282- 2284. doi 10. 1128/JCM. 42.5.2282-2284.2014.

Tankeshwar, A. (2013). *CAMP Test: Principle, Procedure and results.* Recuperado el 14 de mayo de 2017 de <https://microbeonline.com/camp-test-principle-procedure-results/>

Tazi, A., Réglier- Poupet, H., Raymond, J., Adam, J. M., Trieu- Cuot, P., & Poyart, C. (2007). *Comparative evaluation of VITEK 2w for antimicrobial susceptibility testing of group B Streptococcus. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* Vol. 59: 1109- 1113. doi 10.1093/jac/dkm098.

Tenson, T., Lovmar, M., & Ehrenberg, M. (2003). *The Mechanism of Action of Macrolides, Lincosamides and Streptogramin B Reveals the Nascent Peptide Exit Path in the Ribosome. Journal of Molecular Biology.* No.330: 1005- 1014. PMID 12860123.

Tsung Lee, W., & Lai, M. (2015). *High prevalence of Streptococcus agalactiae from vaginas of women in Taiwan and its mechanisms of macrolide and quinolone resistance. Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* Vol 48: 510-516. doi 10.1016/j.jmii.2014.03.002.

- Udo, E., Boswihi, S., & Al-Sweih, N. (2013). *Genotypes and Virulence Genes in Group B Streptococcus Isolated in the Maternity Hospital, Kuwait. Medical Principles and Practice*. Vol. 22: 453-457. doi 10.1159/000349932.
- Uhl, J., Vetter, E., Boldt, K., Johnston, B., Ramin, K., Adams, M., Cockreill, F. (2005). *Use of the Roche LightCycler Strep B Assay for Detection of Group B Streptococcus from Vaginal and Rectal Swabs. Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 43. No. 8: 4046-4051. doi 10.1128/JCM.43.8.40.46- 40.51.2005.
- Van Hoek, A., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A., & Aarts, H. (2011). *Acquired antibiotic resistance genes:an overview. Frontiers in Microbiology. Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*. Vol. 2: 1- 27. doi 10.3389/fmicb.2011.00203.
- Varaldo, P., Montanari, M., & Giovanetti, E. (2009). *Genetic Elements Responsible for Erythromycin Resistance in Streptococci. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 53. No. 2: 343- 353. doi 10.1128/AAC.00781-08.
- Verani, J., McGee, L., & Schrag, S. (2010). *Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease Revised Guidelines from CDC, 2010. Department of Health & Human Services. Center for Disease Control and Prevention*. Vol. 59. RR-10. Recuperado el 29 de marzo de 2017 de <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5910a1.htm>.
- Zárate, M., Vargas, L., Pachecho, M., Fernández, L., & Smayevsky, J. (2005). *Modified Spot CAMP Test: A rapid, inexpensive and accurate method for identification of group B streptococci. Revista Argentina de Microbiología*. Vol. 37: 126- 128. PMID: 16323659. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16323659>.

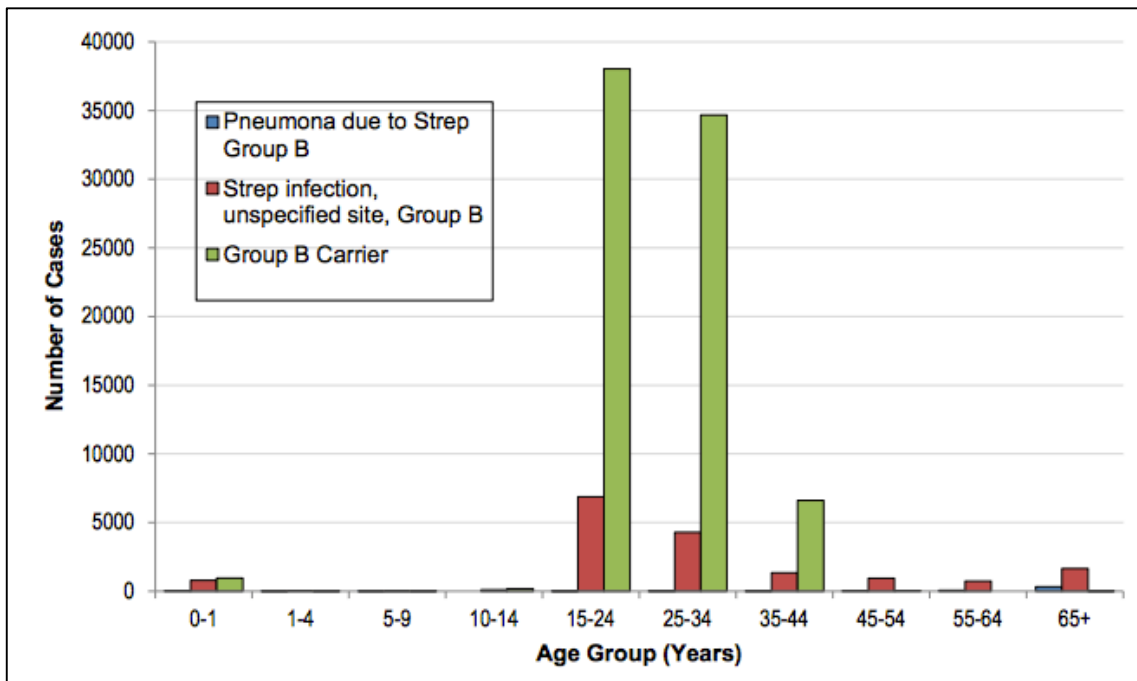
Zhang, Y. (2010). *Mechanisms of Antibiotic Resistance in the Microbial World*. Recuperado el 4 de marzo de 2017 de http://www.molecularartb.org/gb/pdf/transcriptions/11_YZhang.pdf

Zhao, Z., Kong, F., Zeng, X., Gidding, H., Morgan, J., & Gillbert, G. (2008). *Distribution of genotypes and antibiotic resistance genes among invasive Streptococcus agalactiae (group B streptococcus) isolates from Australasian patients belonging to different age groups. Journal Compilation European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Vol. 14: 260- 267. doi 10.1111/j.1469-0691.2007.01914.x.

ANEXOS

Anexo 1

Reporte de infecciones por *Streptococcus agalactiae* por rangos de edad desde 1999 hasta 2010 (Louisiana Office of Public Health, 2011).



Anexo 2

Ejemplo de reporte de sensibilidad entregado por el sistema Vitek 2 de Biomériux®.

Zurita&Zurita Laboratorios		Informe clínico		Editado 13-abr-2017 09:51 COT	
Nº de Cliente:				Nº paciente:	
Nombre del paciente:				Médico:	
Localización:				Nº de aislamiento: 1	
Nº de examen: 475G					
Cantidad de organismo:					
Organismo seleccionado: Streptococcus agalactiae					
Origen:				Recogida:	
Comentarios:					
Información de sensibilidad		Tiempo de análisis: 7,50 horas		Estado: Final	
Antibiótico	CMI	Interpretación	Antibiótico	CMI	Interpretación
Detección de cefoxitina			Eritromicina	<= 0,25	S
Bencilpenicilina	<= 0,12	S	Clindamicina	<= 0,25	S
Ampicilina	<= 0,25	S	Quinupristina/Dalfopristina	<= 0,25	S
Oxacilina			Linezolid	1	S
Gentamicina de nivel alto (sinergia)			Vancomicina	<= 0,5	S
Estreptomina de nivel alto (sinergia)			Tetraciclina	<= 1	S
Gentamicina			Tigeciclina	<= 0,12	S
Ciprofloxacino	<= 0,5	S	Nitrofurantoina	<= 16	S
Levofloxacino	<= 0,12	S	Rifampicina		
Moxifloxacino	<= 0,25	S	Trimetoprima/Sulfametoxazol		
Resistencia inducible a clindamicina					
+= Antibiótico deducido * = AES modificado ** = Usuario modificado					
Conclusiones de AES					
Nivel de confianza:		Coherente			
Página 1 de 1					

Anexo 3

Conjunto completo de muestras analizadas en el estudio en orden cronológico.

No.	Año	Código	Mes	Edad	Tipo de Muestra
1	2012	1563	Febrero	8	Secreción Vaginal
2	2012	8059	Septiembre	48	Secreción Uretral
3	2012	8137	Septiembre	13	Secreción Vaginal
4	2012	8497	Septiembre	22	Orina
5	2012	9703	Octubre	55	Secreción Vaginal
6	2012	9871	Octubre	85	Tejido Blando Cotilo
7	2013	3472	Abril	88	Secreción Rinofaríngea
8	2013	3943	Mayo	40	Secreción Vaginal
9	2013	4791	Junio	29	Secreción Vaginal
10	2013	5073	Junio	37	Secreción Vaginal
11	2013	5634	Junio	26	Lesión de Pierna
12	2013	6130	Julio	35	Secreción Uretral
13	2013	6374	Julio	61	Secreción Vaginal
14	2013	6471	Julio	23	Secreción Vaginal
15	2013	6495	Julio	52	Secreción Vaginal
16	2013	8481	Septiembre	50	Secreción Vaginal
17	2013	8499	Octubre	54	Secreción Vaginal
18	2013	8513	Octubre	58	Secreción Vaginal
19	2013	8835	Octubre	10	Secreción Vaginal
20	2013	9083	Octubre	16	Secreción Vaginal
21	2013	9337	Octubre	40	Secreción Vaginal
22	2013	9613	Noviembre	24	Secreción Vaginal
23	2013	10091	Noviembre	52	Secreción Vaginal
24	2013	9404	Noviembre	11	Secreción Vaginal
25	2013	6364	Julio	35	Secreción Vaginal

26	2013	5896	Julio	35	Secreción Uretral
27	2013	10973	Diciembre	22	Secreción Vaginal
28	2013	11006	Diciembre	52	Secreción de Prepuccio
29	2014	61	Enero	38	Secreción Vaginal
30	2014	418	Enero	27	Secreción Vaginal
31	2014	475	Enero	28	Secreción Vaginal
32	2014	676	Enero	28	Secreción Vaginal
33	2014	824	Enero	58	Secreción Vaginal
34	2014	956	Febrero	22	Secreción Vaginal
35	2014	1157	Febrero	4	Secreción Vaginal
36	2014	1113	Febrero	41	Secreción Vaginal
37	2014	1502	Febrero	28	Orina
38	2014	2049	Marzo	13	Absceso de Pierna
39	2014	2452	Marzo	52	Urocultivo
40	2014	2761	Marzo	46	Secreción Vaginal
41	2014	2834	Marzo	36	Líquido Seminal
42	2014	3365	Abril	22	Orina
43	2014	3759	Abril	57	Secreción Vaginal
44	2014	3801	Abril	39	Secreción Vaginal
45	2014	3915	Abril	48	Secreción Vaginal
46	2014	4131	Mayo	20	Secreción Vaginal
47	2014	4554	Mayo	13	Secreción Vaginal
48	2014	5715	Junio	27	Secreción Vaginal
49	2014	6356	Junio	32	Orina
50	2014	6505	Julio	30	Secreción Vaginal
51	2014	6831	Julio	40	Secreción Vaginal
52	2014	6480	Julio	22	Orina
53	2014	6889	Julio	37	Secreción Vaginal
54	2014	7563	Julio	30	Secreción de Glante
55	2014	8438	Agosto	30	Secreción Peneana

56	2014	8459	Agosto	18	Secreción Peneana
57	2014	9186	Septiembre	60	Secreción Vaginal
58	2014	9417	Septiembre	11	Secreción Vaginal
59	2014	9654	Septiembre	10	Secreción Vaginal
60	2014	9799	Septiembre	24	Secreción Vaginal
61	2014	10279	Octubre	37	Secreción Peneana
62	2014	10527	Octubre	ND	Orina
63	2014	11642	Noviembre	25	Secreción Vaginal
64	2014	9410	Diciembre	68	Orina
65	2015	801	Enero	32	Orina
66	2015	1661	Febrero	52	Orina
67	2015	1744	Febrero	30	Orina
68	2015	1778	Febrero	80	Orina
69	2015	1823	Febrero	38	Secreción Vaginal
70	2015	2433	Febrero	19	Orina
71	2015	2249	Febrero	11	Secreción Vaginal
72	2015	2262	Febrero	26	Orina
73	2015	2578	Febrero	28	Hisopado Rectal
74	2015	2925	Marzo	22	Orina
75	2015	2942	Marzo	27	Secreción Vaginal
76	2015	3003	Marzo	46	Secreción Vaginal
77	2015	3182	Marzo	31	Orina
78	2015	5792	Mayo	37	Secreción Vaginal
79	2015	6673	Mayo	35	Secreción Vaginal
80	2015	6713	Mayo	51	Secreción Vaginal
81	2015	6847	Mayo	68	Líquido Seminal
82	2015	6906	Junio	34	Secreción Vaginal
83	2015	8779	Julio	28	Orina
84	2015	9071	Julio	27	Secreción Vaginal
85	2015	9455	Julio	37	Secreción Vaginal

86	2015	12032	Octubre	36	Secreción Vaginal
87	2015	13816	Noviembre	24	Líquido Seminal
88	2015	13822	Noviembre	31	Secreción Vaginal
89	2015	14354	Noviembre	36	Secreción Vaginal
90	2015	14383	Noviembre	66	Orina
91	2015	15289	Noviembre	15	Secreción Vaginal
92	2015	15507	Diciembre	47	Secreción Vaginal
93	2015	15659	Diciembre	27	Secreción Vaginal
94	2015	16092	Diciembre	49	Secreción Vaginal
95	2015	16160	Diciembre	84	Secreción Vaginal
96	2015	16637	Diciembre	62	Secreción Vaginal
97	2016	214	Enero	33	Secreción Vaginal
98	2016	715	Enero	30	Secreción Vaginal
99	2016	80	Febrero	ND	ND
100	2016	1705	Febrero	69	Secreción Vaginal
101	2016	1941	Febrero	26	Secreción Vaginal
102	2016	2255	Marzo	41	Secreción Vaginal
103	2016	2788	Abril	24	Secreción Vaginal
104	2016	2874	Abril	40	Secreción Vaginal
105	2016	3200	Abril	67	Secreción Vaginal
106	2016	3999	Mayo	30	Secreción Vaginal
107	2016	3997	Mayo	51	Secreción Vaginal
108	2016	4753	Junio	22	Secreción Vaginal
109	2016	4925	Junio	51	Secreción Vaginal
110	2016	4946	Junio	39	Secreción Vaginal
111	2016	5509	Julio	51	Secreción Vaginal
112	2016	5510	Julio	35	Secreción Vaginal
113	2016	5744	Julio	9	Secreción Vaginal
114	2016	6094	Agosto	39	Secreción Vaginal
115	2016	6275	Agosto	32	Secreción Vaginal

116	2016	6391	Agosto	44	Líquido Seminal
117	2016	U5663	Agosto	25	Orina
118	2016	6566	Agosto	19	Amigdala
119	2016	6584	Agosto	42	Amigdala
120	2016	6897	Septiembre	11	Secreción Vaginal
121	2016	6898	Septiembre	35	Secreción Vaginal
122	2016	6902	Septiembre	66	Secreción Vaginal
123	2016	7241	Septiembre	29	Secreción Vaginal
124	2016	7337	Octubre	51	Secreción Vaginal
125	2016	U6507	Octubre	38	Orina
126	2016	7604	Octubre	28	Secreción Vaginal
127	2016	7709	Octubre	67	Secreción Vaginal
128	2016	8192	Noviembre	26	Secreción Vaginal
129	2016	8208	Noviembre	46	Secreción de Glándula
130	2016	8420	Diciembre	23	Herida Quirúrgica
131	2016	8641	Diciembre	39	Secreción de Seno
132	2016	8727	Diciembre	30	Secreción Vaginal

