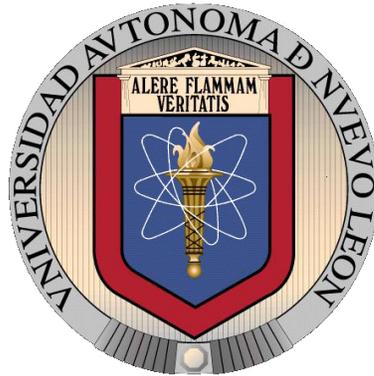


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS A VIRULENCIA, SEROTIPIFICACIÓN  
Y EPIDEMIOLOGÍA DE *Streptococcus agalactiae* EN MUJERES EMBARAZADAS EN  
UN HOSPITAL DEL TERCER NIVEL DE ATENCIÓN**

**Por**

**MELISSA CAROLINA MELLADO GARCIA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

**Agosto, 2019**

**IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS A VIRULENCIA, SEROTIPIFICACIÓN  
Y EPIDEMIOLOGÍA DE *Streptococcus agalactiae* EN MUJERES EMBARAZADAS EN  
UN HOSPITAL DEL TERCER NIVEL DE ATENCIÓN.**

**Comité de Tesis**

---

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales

PRESIDENTE

---

Dr. José Manuel Vázquez Guillén

SECRETARIO

---

Dra. Cristina Rodríguez Padilla

VOCAL

---

Dr. Gerardo del Carmen Palacios Saucedo

VOCAL

---

Dra. Licet Villarreal Treviño

VOCAL

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en la Unidad de Infectología Molecular, Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 25 y la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 23, Hospital de Ginecología y Obstetricia “Dr. Ignacio Morones Prieto”, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Monterrey, Nuevo León, México bajo la dirección del Dr. Gerardo C. Palacios Saucedo y la Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales.

---

Dr. Gerardo C. Palacios Saucedo  
Director externo

---

Dra. Lydia Gpe. Rivera Morales  
Directora interna

## **LUGAR DE TRABAJO**

La presente investigación fue desarrollada gracias al apoyo de diferentes instituciones:

La toma de muestras se realizó en la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 23, Hospital de Ginecología y Obstetricia “Dr. Ignacio Morones Prieto”, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) Monterrey, Nuevo León, México.

El procesamiento de las muestras y la parte experimental de la tesis se realizó en:

El Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. bajo la dirección de la Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales.

Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Especialidades No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) Monterrey, Nuevo León, México.

La Unidad de Genómica del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la Universidad Autónoma de Nuevo León con la asesoría de la Q.C.B Patricia Villarreal Quiroga y el M.C. Luis Ernesto Osuna Rosales.

El Laboratorio de Genómica y Bioinformática del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR); CONACYT. La Paz, Baja California Sur con la asesoría del Dr. Ricardo Vázquez Juárez.

El Instituto Nacional de Salud Pública, en el área de investigación de Ciencias Médicas. Cuernavaca, Morelos, con la asesoría de la Dra. Gabriela Echániz Aviles.

## **FINANCIAMIENTO**

Fondo de Investigación en Salud No. FIS/IMSS/PROT/PRIO/15/047 del “Concurso de Apoyo Financiero para el Desarrollo de Protocolos de Investigación y Desarrollo Tecnológico sobre Temas Prioritarios de Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social”, Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (FOSISS) CONACYT No. 290608 Convocatoria 2017-01 y Beca de Excelencia en Investigación de la Fundación IMSS A.C.

Las fundaciones no tuvieron ningún rol en el diseño del estudio, recolección de información, análisis, publicación y preparación del manuscrito.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación se llevó acabo gracias al apoyo económico y de la infraestructura del Laboratorio de Inmunología y Virología.



Agradezco al **Comité Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo brindado como becaria (CVU No. 860659) de la Maestría en Ciencias con orientación en Inmunobiología, para la realización y obtención de este grado.

A la **Dra. Cristina Rodríguez Padilla**, por brindarme la oportunidad de pertenecer al LIV y permitirme continuar mi camino profesional.

A la **Dra. Lydia Rivera Morales**, porque sin conocerme, me abrió las puertas del laboratorio, por brindarme su apoyo y cariño en todo momento, por su paciencia, por siempre estar al pendiente de mi y nunca dejarme sola. Gracias por guiarme en mi camino y darme la oportunidad de crecer y ser mejor, ¡Muchas gracias por todo!.

Al **Dr. José Manuel Vázquez Guillén**, por su amistad, por animarme en los momentos mas difíciles y por siempre tener palabras de aliento.

Al **Dr. Gerardo Palacios Saucedo**, por la confianza de encomendarme este gran proyecto, por su entusiasmo, su paciencia y por guiarme en el camino de la investigación.

A la **Dra. Licet Villarreal**, por su colaboración y asesoría, por el apoyo brindado en este proyecto.

A **Daniel Ramirez** por su apoyo, su amistad y por ayudarme a sobrellevar los obstáculos que se presentaban en el camino.

A **Aldo, Cinthya y Caro** por ser una pieza importante para culminar este proyecto y por su apoyo incondicional.

A **Roberto y Zacarias** por ser muy buenos compañeros de laboratorio y amigos.

A todos los chicos de **UIMO-L3**, gracias por su amistad y por permitirme acompañarlos durante estos dos años y ser parte del laboratorio. Gracias por todos los buenos momentos.

A **Escalante, Kenny, Benancio, Teo, Alan, Karla y Mar** por su amistad y apoyo.

A mis amigas **Gise, Angie, Gaby, Juan, Majo, Sofy y Altair**, por su amistad incondicional a pesar de la distancia.

A **Sofy Médina** por su apoyo, amistad y su paciencia durante mi camino.

A **Rafael de la Hoz** por siempre motivarme y guiarme de manera acertada. Gracias por siempre estar presente, por ser un gran ejemplo y por compartir tus conocimientos conmigo, por tu dedicación, tu nobleza, tu paciencia y cariño. Gracias por ayudarme a crecer ¡Mil Gracias!.

## DEDICATORIAS

A mis **Padres**, por su amor incondicional y su confianza. Se que fue difícil, pero lo logramos y vamos por mas.

A mi mamá **Beatriz**, por motivarme a seguir avanzando, por comprender y apoyar mis sueños. Por hacerme ver las cosas de la mejor manera y buscar la forma de impulsarme.

A mi papá **Augusto**, por sus consejos y su apoyo incondicional, por confortarme y buscar siempre mi bienestar. Por confiar en mi y siempre motivarme a ver hacia delante.

A **Cesar Rafael**, por siempre darme ánimos y hacer que los momentos en familia sean mas divertidos y valiosos.

A mi **Familia**, que siempre me apoyó y me motivó para seguir adelante.

“Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia devuelve a Él” -P

“All our dreams can come true,  
if we have the courage to pursue them”  
- Walt Disney

# ÍNDICE

	<b>ÍNDICE</b>	<b>I</b>
	<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>IV</b>
	<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>V</b>
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>VI</b>
	<b>RESUMEN</b>	<b>VIII</b>
	<b>ABSTRACT</b>	<b>IX</b>
<b>I</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
	2.1 Estreptococo del Grupo B como agente causal.	3
	2.2 Clasificación por serotipos.	4
	2.3 Identificación microbiológica.	6
	2.4 Factores de virulencia.	10
	2.4.1 Polisacárido capsular.	11
	2.4.2 $\beta$ -hemolisina / citolisina ( $\beta$ -H / C, CylE).	12
	2.4.3 Proteína de unión a laminina (Lmb).	13
	2.4.4 C5a peptidasa (ScpB).	13
	2.4.5 Adhesina Hipervirulenta (HvgA).	14
	2.4.6 Pili.	14
	2.5 Clonas.	15
	2.6 Colonización materna.	16
	2.7 Transmisión al recién nacido.	17
	2.8 Infección perinatal en el recién nacido.	18
	2.9 Epidemiología mundial.	20
	2.10 Epidemiología en México.	20
	2.11 Profilaxis.	22
<b>III</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>27</b>
<b>IV</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>28</b>
<b>V</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>29</b>

5.1	Objetivo general.	29
5.2	Objetivos específicos.	29
<b>VI</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>30</b>
6.1	Diseño del estudio.	30
6.2	Criterios.	30
6.2.1	Criterios de inclusión.	30
6.2.2	Criterios de exclusión.	30
6.2.3	Criterios de eliminación.	30
6.3	Muestreo.	31
6.4	Aislamiento e identificación del EGB.	31
6.5	Tipificación de grupo y serotipificación.	33
6.6	Electroforesis en Gel de campos pulsados.	33
6.6.1	Extracción de DNA.	33
6.6.2	Restricción de los discos.	35
6.6.3	Corrimiento del gel.	37
6.7	Identificación de factores de virulencia de las cepas aisladas de las pacientes colonizadas por EGB.	37
6.7.1	Aislamiento de ADN genómico.	37
6.7.2	Preparación de librería para secuenciación.	38
6.7.3	Análisis bioinformático.	40
6.8	Análisis estadístico.	41
<b>VII</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>42</b>
7.1	Identificación de <i>Streptococcus agalactiae</i> en muestras de mujeres embarazada.	42
7.2	Identificar los serotipos del EGB.	45
7.3	Evaluar la distribución y la existencia de clonas de EGB.	46
7.4	Identificación de factores de virulencia de las cepas aisladas de las pacientes colonizadas por EGB.	47
7.4.1	Calidad y concentración del DNA de las muestras.	47

7.4.2 Análisis bioinformático de los datos generados.	48
Características de las lecturas y los ensamblados.	
7.4.3 Identificación y mapeo de los genes que codifican para el polisacárido capsular de aislados de EGB.	49
7.4.4 Identificación y mapeo de los factores de virulencia FbsA, FbsB, Lmb, ACP, PI-1, PI-2a, PI-2b, HvgA, $\beta$ -H/C y ScpB de aislados de EGB.	51
<b>VIII DISCUSIÓN</b>	<b>53</b>
<b>IX CONCLUSIONES</b>	<b>58</b>
<b>X PERSPECTIVAS</b>	<b>59</b>
<b>XI BIBLIOGRAFIA</b>	<b>60</b>
<b>XII RESUMEN BIBLIOGRÁFICO</b>	<b>67</b>
<b>XIII ANEXOS</b>	<b>68</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Características sociodemográficas y gineco-obstétricas de 1154 mujeres embarazadas de acuerdo con el estado de colonización por Estreptococo del grupo B (EGB).	43
<b>2</b>	Características clínicas y obstétricas de 17 mujeres embarazadas colonizadas por Estreptococo del grupo B (EGB).	44
<b>3</b>	Características de ensambles obtenidos mediante Quast.	49
<b>4</b>	Presencia de los factores de virulencia en cada una de las muestras positivas.	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Algoritmo recomendado para la búsqueda del EGB en muestras de pacientes embarazadas.	7
<b>2</b>	Regulación de los genes que codifican para los factores de virulencia del EGB.	10
<b>3</b>	Locus CPS de <i>Streptococcus agalactiae</i> .	11
<b>4</b>	Ubicación de gen CylE dentro del operón Cyl.	12
<b>5</b>	Infección ascendente por el Estreptococo del Grupo B.	18
<b>6</b>	Comparación entre los resultados de los estudios epidemiológicos realizados en México para conocer la prevalencia del EGB.	22
<b>7</b>	Algoritmo 1 para implementar la profilaxis intraparto.	24
<b>8</b>	Algoritmo 2 para la prevención de la infección precoz por EGB en neonatos.	25
<b>9</b>	Algoritmo 3 para el manejo del RN cuya madre recibió PAI.	25
<b>10</b>	Porcentajes de prevalencia de cada serotipo.	45
<b>11</b>	Patrones de banda para las muestras positivas corridas PFGE.	46
<b>12</b>	Corrimiento de electroforesis del DNA previamente extraído de las muestras positivas para EGB.	47
<b>13</b>	Figura circular del Polisacárido Capsular.	50
<b>14</b>	Figura circular de factores de virulencia.	52

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>EGB</b>	Estreptococo Grupo B
<b>EDTA</b>	Ácido Etilendiaminotetraacético
<b>EOD</b>	Early Onset Disease
<b>BLT</b>	Bead-Linked Transposomes
<b>BHI</b>	Brain-Heart Infussion
<b>CPS</b>	Capsular Polisacharide
<b>CAMP</b>	Christie, Atkins y Munch Petersen
<b>EPM</b>	Enhanced PCR Mix
<b>FPTDP</b>	Falta de progresión de trabajo de parto.
<b>HVC</b>	Clona hipervirulenta
<b>IMSS</b>	Instituto Mexicano del Seguro Social
<b>LOD</b>	Late Onset Disease
<b>MEE</b>	Electroforesis de enzimas multilocus
<b>ml</b>	Microlitros
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>NT</b>	No tipificables
<b>PAI</b>	Profilaxis antibiótica intraparto
<b>PFGE</b>	Pulse Field Gel Electrophoresis
<b>RM</b>	Razón de momios
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>RN</b>	Recién nacido
<b>RSB</b>	Resuspension Buffer
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SPB</b>	Sample Purification Beads
<b>SDG</b>	Semanas de gestación
<b>TWB</b>	Tagment Wash Buffer
<b>TSB</b>	Tagmentat Stop Buffer

<b>THB</b>	Todd-Hewitt Broth
<b>UCIN</b>	Unidad Neonatal de Cuidados Intensivos
<b>UMAE</b>	Unidades Médicas de Alta Especialidad
<b>V</b>	Volts
<b>VL0D</b>	Very Late Onset Disease

## RESUMEN

Identificación de genes asociados a virulencia, serotipificación y epidemiología de *Streptococcus agalactiae* en mujeres embarazadas en un hospital de tercer nivel de atención. Bajo consentimiento informado, se realizó el cultivo microbiológico de muestras vagino-rectales a mujeres entre las semanas 35-37 de gestación, que acudieron a la consulta para control prenatal, y a todos los recién nacidos de madres colonizadas por EGB de la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) No. 23 hospital de Ginecología y Obstetricia “Dr. Ignacio Morones Prieto”, perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social en Monterrey, Nuevo León, en el periodo de enero a diciembre del 2018. La identificación del EGB se realizó mediante pruebas de catalasa, tinción de Gram, así como las pruebas de identificación específicas, como la hidrólisis de hipurato, prueba de CAMP, crecimiento en el medio cromogénico Strep B Carrot Broth™ Kit y la prueba de aglutinación de látex para identificación de grupo por medio del SLIDEX® STREPTO PLUS kit. La determinación de los serotipos se realizó mediante el ImmuLex™ Strep-B, el cual permite la identificación de los serotipos Ia, Ib-IX. Se evaluó la distribución clonal de los aislados, mediante la técnica de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE). Se realizó la extracción de ADN genómico de los EGB aislados para la realización de una librería genómica y seguido de la secuenciación de las mismas, esto con la finalidad de buscar las secuencias asociadas a los factores de virulencia presentes en este microorganismo. Se realizó el cultivo microbiológico a las 1154 muestras obtenidas de las pacientes embarazadas y sus recién nacidos, siendo posible el aislamiento de EGB en 17 de ellas, correspondiendo a una prevalencia del 1.47%. Se muestrearon 6 recién nacidos de las 17 mujeres colonizadas, en ninguno se aisló EGB, por lo que la transmisión madre-producto fue de 0%. Además, ninguna de las 17 mujeres colonizadas ni sus recién nacidos presentaron complicaciones infecciosas atribuibles a EGB durante el seguimiento a tres meses posteriores al parto. Al realizar la serotipificación en látex fue posible la identificación de los serotipos Ib (11.7%), II (29.4%), III (23.5%), IV (23.5%) y V (11.7%). La PFGE se realizó a los 17 aislados obtenidos, sin embargo, de acuerdo a su patrón clonal, no se pudo identificar similitud entre los patrones electroforéticos de las muestras. Se identificaron los genes codificantes para factores de virulencia PI-1, PI-2A, PI-2B, Lmb, CylE, FbsA, FbsB, ScpB, HvgA, y bca.

## ABSTRACT

Identification of virulence associated genes, serotyping and epidemiology of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women in a third level hospital. Under informed consent, the microbiological culture of vagino-rectal samples was performed on women between weeks 35-37 of gestation, who attended the consultation for prenatal control, and all newborns of colonized mothers by GBS of the Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) No. 23 hospital de Ginecología y Obstetricia “Dr. Ignacio Morones Prieto”, belonging to the Instituto Mexicano del Seguro Social at Monterrey, Nuevo León in the period from January to December 2018. The identification of the EGB was carried out by means of catalase tests, Gram staining, as well as specific identification tests such as the hydrolysis of hippurate, CAMP test, growth kit in the Strep B Carrot Broth™ chromogenic medium and the latex agglutination test for group identification using the SLIDEX® STREPTO PLUS kit. Serotypes were determined using ImmuLex™ Strep-B, which allows the identification of serotypes Ia, Ib-IX. The clonal distribution of the components was evaluated using the Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) technique. Genomic DNA was extracted from the isolated of GBS for the preparation of genomic library and followed by the sequence; this with the determination to look for the sequences associated with the virulence factors of this microorganism. Microbiological culture was carried out on the 1154 samples obtained from pregnant patients and their newborns, with the isolation of GBS being possible in 17 of them, corresponding to a prevalence of 1.47%. Six newborns of the 17 colonized women were sampled, EGB was not isolated in any of them, so the mother-product transmission was 0%. In addition, none of the 17 colonized women or their newborns confirmed infectious complications attributable to GBS during follow-up three months after delivery. When performing latex serotyping, it was possible to identify serotypes Ib (11.7%), II (29.4%), III (23.5%), IV (23.5%) and V (11.7%). The PFGE were performed to the 17 samples, however, according to its clonal pattern, it could not be possible to identify similarity between the electrophoretic patterns of the samples. The coding genes for virulence factors PI-1, PI-2A, PI-2B, Lmb, CylE, FbsA, FbsB, ScpB, HvgA, and bca were identified.

## I. INTRODUCCIÓN

El estreptococo del grupo B (EGB) o *Streptococcus agalactiae*, es un patógeno oportunista Gram-positivo y principal causante de infecciones neonatales. Este microorganismo coloniza los tractos gastrointestinal y genitourinario de aproximadamente el 40% de la población femenina y el 30% de la población masculina (Diseases 2006; Bliss et al. 2002). Durante el embarazo este puede llegar a ocasionar neumonía, septicemia y meningitis, además de presentar una alta morbilidad en mujeres embarazadas y personas adultas, y en los pacientes inmunocomprometidos es responsable de un alto índice de mortalidad (Dermer et al. 2004).

En la década de 1970 la tasa de sepsis temprana por EGB en los Estados Unidos de América (EUA) se calculaba en 1.7 casos por cada 1,000 nacidos vivos, con una letalidad cercana al 50% (Baker y Barret 1974; Verani et al. 2010). Gracias al conocimiento sobre la fisiopatogenia y el comportamiento clínico de la enfermedad, así como el entendimiento de la colonización previa como principal factor de riesgo, y el desarrollo de guías clínicas; a finales de la década de los 90's, fue posible lograr una disminución en esta tasa de mortalidad de 0.37/ 1000 recién nacidos vivos. Sin embargo, EGB sigue siendo la causa más común de sepsis y meningitis neonatal en EUA y en países desarrollados (Phares et al. 2008; CDC 2010; Verani et al. 2010).

En México, no se realiza la búsqueda intencionada de la colonización por EGB, ni se administra profilaxis intraparto, debido a que hasta el momento la información disponible hace considerar al EGB como una causa poco común de infecciones perinatales (Sólorzano et al. 1989, 1990; González et al. 2004; Villaseñor et al. 2004; Palacios 2009).

No obstante, diversos estudios han encontrado porcentajes de colonización vaginal de hasta un 20% en mujeres embarazadas y una tasa de infección neonatal de 1/1,500 recién nacidos vivos con una letalidad del 38.5% (Sólorzano et al. 1990; González et al. 2004; Villaseñor et al. 2004). Por otro lado, una encuesta seroepidemiológica de alcance nacional en la que se evaluó la presencia de anticuerpos contra el antígeno de grupo de EGB en mujeres de entre los 15 y 40 años de edad, demostró una alta tasa de exposición al EGB, con una seroprevalencia del 90% (Palacios et al. 2002).

Debido a que la mayoría de la información relacionada con la participación de EGB en la patología perinatal en México corresponde a estudios realizados en el centro del país (Sólorzano et al. 1989, 1990; Palacios et al. 1997, 2005, 2007, 2009; Reyna et al. 2007; González et al. 2004; Villaseñor et al. 2004) y a la inexistente información sobre este microorganismo en el área metropolitana de Monterrey y en todo el noreste de México, se planteó la realización de este estudio, que permita evaluar la epidemiología clínica de la infección perinatal por estreptococo del grupo B en el noreste de México, a través de un estudio realizado en la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) No. 23, Hospital de Ginecología y Obstetricia “Dr. Ignacio Morones Prieto”, el cual al pertenecer al Instituto Mexicano del Seguro Social, cuenta con una cobertura hospitalaria la cual abarca diversos estados del noreste del país.

## II. ANTECEDENTES

El género *Streptococcus* es un grupo de bacterias formado por cocos gram-positivos, las cuales crecen en cadenas o pares. Existen diversas especies conocidas, que son clasificadas de acuerdo a sus propiedades hemolíticas, tales como los que no presentan hemólisis (no hemolíticos), los que presentan hemólisis parcial (alfa hemolíticos) y los que producen hemólisis total ( $\beta$ -hemólisis); esta última clasificación tiene una subdivisión reportada por la Dra. Rebecca Lancefield en donde se encuentran los grupos A, B, C y D. En el grupo A se encuentra *S. pyogenes* agente causal de faringitis, en el grupo B se encuentra *S. agalactiae*, uno de los responsables de la infección perinatal, y los del grupo D se clasifican como *Enterococcus*, de los cuales los más comunes son *E. faecalis*, *S. faecium*, entre otros.

Hasta ahora se sabe que las diferentes especies de Estreptococos son responsables de causar diversas afecciones en ser humano, pero principalmente se ha reportado que el grupo B tiene impacto en dos poblaciones de riesgo como lo son las mujeres en estado de gestación y sus recién nacidos.

### 2.1 Estreptococo del Grupo B como agente causal.

El Estreptococo del grupo B mejor conocido como *Streptococcus agalactiae* es un microorganismo que se encuentra en el tracto gastrointestinal y aparato genitourinario. Fue aislado por primera vez en bovinos, como causante de la mastitis. Posteriormente se le relacionó como un patógeno causante de diversas enfermedades neonatales (Fry 1938; Edwards y Baker 2005; Phares et al. 2008; Edmond et al. 2012).

En la tinción se observan cocos gram positivos, no presenta la enzima antioxidante “catalasa” la cual cataliza la dismutación del peróxido de hidrogeno en dos productos, agua y oxígeno, por lo tanto no se observa una reacción efervescente al poner una colonia en contacto con el peróxido de hidrogeno. Esta bacteria es aerobia y anaerobia facultativa y se encuentra formando cadenas de longitud variable o en pares. En el cultivo en agar adicionado con eritrocitos de carnero al 5%, se puede observar el crecimiento de colonias blancas-grisáceas, que miden alrededor de 2mm de diámetro y presentan  $\beta$ - hemólisis (Brizuela 2007).

Existe una clasificación realizada por la Dra. Rebecca Lancefield (Lancefield 1932), en donde describe que los Estreptococos hemolíticos pueden tipificarse de acuerdo a sus características bioquímicas; originalmente definió dos carbohidratos antigénicos de la pared celular en *S. agalactiae*: el antígeno específico de grupo B, común en todas las cepas y el antígeno capsular que actualmente define a los 10 diferentes serotipos, los cuales son Ia, Ib, II- IX. Casi todos tienen componentes similares los cuales se encuentran agrupados de diferentes maneras: Glucosa, Galactosa, N- acetil glucosamina y ácido siálico (Schuchat 1999).

## **2.2 Clasificación por serotipos.**

El Estreptococo del grupo B presenta en la superficie, un polisacárido capsular (CPS) el cual se considera una protección contra los mecanismos de defensa del huésped, ya que puede imitar a los antígenos propios o puede interferir en la muerte mediada por el complemento (Edwards et al. 1982; Kim et al. 1986).

La clasificación por serotipos se realizó por primera vez por medio del método de precipitación en capilar, con extractos antigénicos preparados a partir de células completas mediante el método de HCl caliente de Lancefield, y por un proceso enzimático utilizando N- acetylmuramidasa (mutanolysin) (Lancefield 1932).

Esto dió lugar a la serotipificación de nueve antígenos pertenecientes al polisacárido capsular los cuales se conocen como Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, así como también nuevas cepas que aún no se incorporan en ninguna clasificación y se reportan como no tipificables (NT) (Kong et al. 2002; Moyo et al. 2002). El último serotipo encontrado fue el IX, ya que en el 2007 se analizaron tres aislamientos que no reaccionaron con los antisueros de cada uno de los serotipos de EGB que se tenían hasta ese momento (Melin y Efstratiou 2013).

Todas presentan conformaciones bioquímicas que les permite ser diferenciados, ya que tienen un patrón de enlaces glicosídicos único para cada serotipo y contienen diversas conformaciones en sus estructuras primarias, pero básicamente todo están formados por tres monosacáridos ( $\beta$ -D-glucopiranososa,  $\beta$ -D-Glc;  $\beta$ -D-galactopiranososa,  $\beta$ -D-Gal y  $\beta$ -D-N acetil glucosamina,  $\beta$ -D-GlcNAc), y ácido siálico (ácido  $\alpha$ -N-acetil-neuramínico, NeuNAc) (Berti et al. 2014; Cieslewicz et al. 2005).

La serotipificación ha sido usada para identificar y dar seguimiento a las variantes, pero esta metodología ha sido respaldada por técnicas moleculares tales como la tipificación multilocus de secuencias, en donde se pueden rastrear diferencias en los nucleótidos, esto en un número variable de genes. También se ha incluido la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) y la electroforesis de enzimas multilocus (MEE), aunque una de las técnicas mejor descritas y de mayor utilidad, es el análisis del genoma completo o secuenciación (Palmeiro et al. 2010).

En América Latina y países desarrollados, la distribución de los serotipos ha sido variable, aunque se ha reconocido que el serotipo III es el que tiene una mayor asociación con la infección perinatal, y esta asociada con la aparición de meningitis en el recién nacido (RN). De igual forma se encuentra con mayor frecuencia en los estudios anteriormente realizados ya que hay cepas de este serotipo que pertenecen a un linaje hipervirulento (Phares et al. 2008; Manning et al. 2009; Joubrel et al. 2015).

Estudios han indicado que los serotipos Ia, Ib, II, III, y V son los causantes de aproximadamente el 95% de las enfermedades invasivas, teniendo mayor frecuencia las pertenecientes al serotipo III y V (Edmond et al. 2012; Le Doare y Heath 2013).

La frecuencia de los serotipos relacionados con la sepsis neonatal es muy similar a los serotipos encontrados en la colonización vaginal de las pacientes, sin embargo, en los casos de la enfermedad neonatal de aparición tardía, los aislados son predominantemente del serotipo III (Edwards y Nizet 2011).

En el caso del serotipo III, se le atribuye que es la causa mas frecuente de sepsis y meningitis neonatal ya que es el mas frecuente en estos casos, sobretodo una cepa hipervirulenta perteneciente al Complejo Clonal 17 (CC17), (Manning et al. 2009; Joubrel et al. 2015).

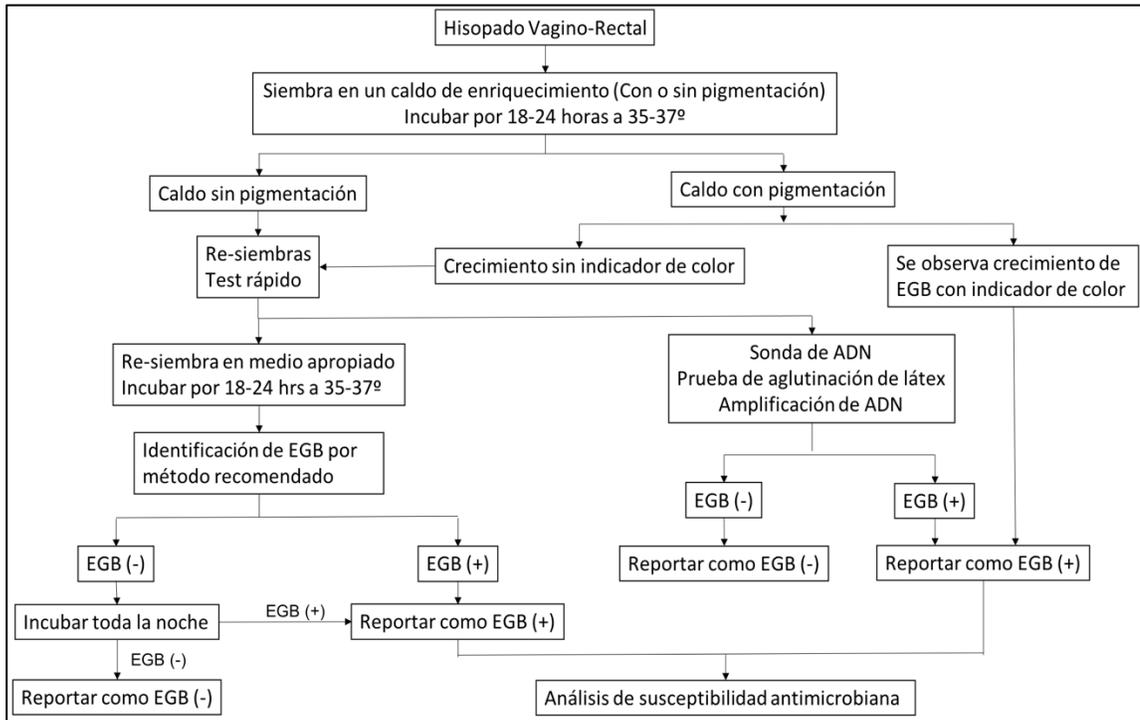
Por otro lado, un estudio realizado en Lisboa en los años 2005-2012 indicó un aumento en la frecuencia del serotipo IV Cepa ST-291 (Florindo et al. 2014) y se cuentan con reportes similares en Noruega (Bergseng et al. 2008), Irlanda (Meehan et al 2014) y Canadá (Teatero et al. 2014, 2015).

En Minnesota, EU entre 2004 y 2008 se observó un aumento en el aislamiento de este serotipo en las mujeres embarazadas (Diedrick et al. 2010), mientras que otro estudio realizado en el mismo estado durante 2000-2010 se reportó un aumento de este serotipo, en las infecciones neonatales invasivas (Ferrieri et al. 2013).. En lo que respecta a América Latina, en el sur Brasil se aisló al EGB, IV, en los casos de LOD entre 2006 y 2008 (Palmeiro et al. 2010). La serotipificación de EGB se realiza comúnmente por aglutinación en látex, pero los métodos moleculares tales como la PCR multiplex para analizar el patrón de bandas o mediante secuenciación del genoma, han llegado a revolucionar su detección y a mejorarla. Pero en algunas ocasiones, estas metodologías pueden resultar con falsos negativos o pueden ser muy costosas como es el caso de la secuenciación, por esta razón se han diseñado ensayos donde la tipificación se pueda realizar mediante PCR tiempo real, ya que en algunos estudios en donde se realiza una aglutinación en látex y PCR tiempo real, los resultados muestran un 100% de concordancia en ambas técnicas. Esto sugiere que realizar qPCR es una gran alternativa para detectar el polisacárido capsular (Breeding et al. 2016).

### **2.3 Identificación microbiológica.**

Se ha comparado la eficacia de cada uno de los métodos de obtención de la muestra para la detección del EGB, como lo es la toma individual y por separado del área vagina y el área perianal, así como la conjunción de ambas muestras en un solo hisopado, demostrando que había un mayor porcentaje de recuperación cuando la muestra se tomaba en un solo hisopado, combinando el cultivo vaginal y rectal. En un estudio del 2003 obtuvieron resultados concluyentes ya que se reportaron porcentajes de recuperación en 80% de las muestras vaginales con EGB, en un 91% de las rectales, y la combinación de ambas muestras se detectó en un 93% de las portadoras (Bosch et al. 2003).

Por lo tanto, se ha establecido un algoritmo específico para la búsqueda intencionada del EGB en las mujeres embarazadas, en donde se realiza un hisopado vagino-rectal para posteriormente hacer el cultivo de ésta. Figura 1 (Verani et al. 2010).



**Figura 1.** Algoritmo recomendado para la búsqueda del EGB en muestras de pacientes embarazadas.

Tomada de Verani et al. 2010.

Existen casos en donde se detectó la colonización de la paciente desde el urocultivo, para lo cual deberá mostrar un recuento mayor o igual a 10,000 ufc/ml y en estos casos ya no se tomará la muestra vaginal-perianal. Se recomienda también, que la muestra sea recolectada antes de cualquier manipulación vaginal, es decir, sin lavados, sin uso de óvulos y se deberá indicar si se cuenta con un tratamiento para un tipo de infección vaginal o urinaria (Padilla et al. 2016). Una vez seleccionada la obtención, se ha buscado el mejor medio de cultivo que agilice la recuperación del EGB y así poder evitar la mayor contaminación posible por otro tipo de bacterias como las gram (-), las cuales se ha observado, que invaden la mayor parte de las cajas de cultivo, impidiendo que se puedan apreciar a la vista las colonias hemolíticas del EGB, sin dejar atrás el crecimiento de levaduras y Estafilococos que retrasan el aislamiento deseado (Bosch et al. 1998).

Actualmente se ha optado por utilizar medios de cultivo específicos para EGB, por lo que una vez que se tiene la muestra, el hisopo se inocula en un caldo de enriquecimiento conocido como Todd-Hewitt Broth (THB), el cual ha sido el más recomendable para inhibir la mayoría de las bacterias gramnegativas (CDC, 2002; Verani et al. 2010).

Se han estandarizado las concentraciones de los antibióticos utilizados en conjunto, tales como Gentamicina 8 µg/mL - Nalidíxico 15 µg/mL o Nalidíxico 15 µg/mL – Colistina 10 µg/mL, o bien Gentamicina 8 µg/mL Colistina 10 µg/mL, los cuales mejoran la especificidad del medio, inhibiendo crecimiento de bacterias no deseadas y ayudando a que *S. agalactiae* pueda crecer sin ningún problema; aunque por otro lado, se ha descrito que algunas cepas de *S. agalactiae* pueden ser sensibles a una concentración de Gentamicina de 8 µg/mL (Brizuela 2007).

Actualmente existen medios sólidos como el Agar Tripto-Soya, el Agar Columbia, el Agar Cerebro-Corazón y por último el Agar Base Sangre a los que comúnmente se agrega sangre de carnero al 5% para poder observar la hemólisis del EGB.

Existen además, medios cromogénicos como el Agar Granada, o el CHROMagar Strept B, en los cuales se siembra directamente y las colonias crecen de color rojo- naranja, o rosa respectivamente en los medios mencionados.

En el 2004, se realizó un estudio comparativo en EUA entre el Agar Granada y el Todd-Hewitt suplementado con Gentamicina y Ácido nalidixico, en donde de un total de 1635 muestras tomadas, se obtuvieron 390 cultivos positivos para EGB, de los cuales 385 (98,7%) fueron recuperados del caldo Todd-Hewitt, mientras con el agar Granada se recuperaron 348 cultivos positivos (89,2%) (Gupta et al. 2004).

La siembra directa en agar base sangre o agar Columbia, adicionado con eritrocitos de carnero al 5% o con suero, puede favorecer el crecimiento del EGB y su visualización gracias a la β-hemólisis que presenta, pero este medio posee una nula selectividad al momento de inocular al EGB junto con otro tipo de bacterias y levaduras, lo que implica más tiempo invertido para obtener un resultado positivo final. Además de que se ha descrito que alrededor de un 2% de las cepas de EGB, no produce β-hemólisis, lo que dificulta su identificación.

Por lo que el uso de antibióticos tales como la Gentamicina, el Ácido nalidíxico y la Colistina, pueden inhibir el crecimiento de bacterias gramnegativas y de estafilococos y ha logrado hacer más específico el medio, confiriéndole selectividad similar a la del THB para esta bacteria (Altaie et al. 1994).

Algunos enterococos también presentan cierta actividad hemolítica, lo que lleva a la realización de pruebas posteriores al aislamiento, tales como pruebas de aglutinación y pruebas bioquímicas (Christensen et al. 1987).

Para lograr obtener el aislado final del EGB, se ha recomendado seguir diferentes técnicas de cultivo y aislamiento comenzando con la inoculación de los hisopados en caldo Todd-Hewitt suplementado con antibióticos, incubando durante 18 a 24 horas a una temperatura de 37°C (Puede utilizarse o no CO<sub>2</sub>), para después ser sembrado en un medio sólido como el agar Columbia, adicionado con eritrocitos de carnero al 5% utilizando las mismas condiciones de incubación (Overman y Jacobs 2002).

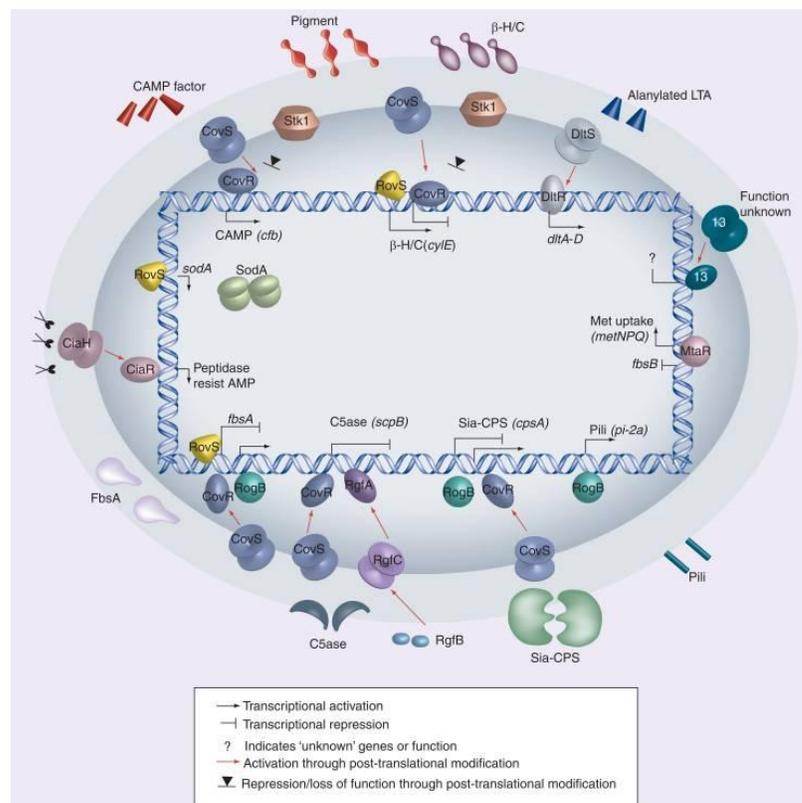
Los métodos de laboratorio utilizados de manera estandarizada para la identificación del EBG, comienzan con una tinción de Gram, la cual puede indicar si la colonia presuntiva está constituida por cocos teñidos de azul-morado y se puede observar el acomodo de estos. Posteriormente se realizan pruebas como la catalasa para poderlo diferenciar de los Estafilococos, seguido de una prueba para asegurar la hidrólisis de hipurato, característica de esta bacteria.

También se cuenta con la prueba de la siembra en el agar Bilis esculina, ya que el crecimiento del EGB es de color blanco, a diferencia de los Enterococos (crecimiento de color negro) y por último pruebas que determinan la producción de pigmentos de color naranja como el medio Granada (Stevens y Kaplan, 2000).

Una vez realizadas las pruebas bioquímicas correspondientes, se deberá realizar la confirmación, esto mediante la detección de la presencia del antígeno del EGB que se encuentra en su pared celular, por lo que se utilizan antiseros específicos para el Estreptococo de látex grupo B y para los serotipos que lo conforman, uno de ellos es la tipificación con partículas de látex, seguido de métodos moleculares como la PCR que tiene una especificidad del 97% (Brizuela 2007).

## 2.4 Factores de virulencia.

El EGB coloniza las mucosas, tanto en el tracto gastrointestinal, como en el área vaginal y vías urinarias, por lo que requiere de características específicas que le confieran la capacidad de sobrevivir a la hostilidad de los diferentes microambientes para poder colonizarlos, por lo tanto posee proteínas que le ayudan a proliferar y evadir las defensas del huésped; para esto, la bacteria contiene secuencias génicas que codifican para diversos factores de virulencia los cuales le ayudan a ser invasivo y a adaptarse adecuadamente, sobretodo en la población compuesta por mujeres embarazadas y sus RN (Rajagopal 2009). Existen diversos genes que regulan a los factores de virulencia del EGB, siendo los de la Figura 2 los de mayor importancia, entre ellos se encuentran CovR, RgfA, CiaR y DltR, y sus sensores análogos histidina quinasa CovS, RgfC, CiaH y DltS, que regulan la transcripción de toxinas y otros factores que contribuyen a la virulencia del EGB (Maisey et al. 2008).



**Figura 2.** Regulación de los genes que codifican para los factores de virulencia del EGB. Tomado de Rajagopal, 2009.

### 2.4.1 Polisacárido capsular.

El polisacárido capsular es un importante factor de virulencia en la enfermedad invasiva causada por el *S. agalactiae*, ya que le permite a la bacteria evadir mecanismos innatos de defensa del huésped. En un estudio realizado por Slotved y colaboradores se observó una relación entre los diversos serotipos, y la virulencia del patógeno (Slotved et al. 2007). Estos se encuentran codificados en el clúster del gen capsular, y existen variaciones demográficas, geográficas y temporales con respecto a los serotipos predominantes en la población humana (Hickman et al. 1999; Lachenauer et al. 1999).

El polisacárido capsular está codificado en el locus CPS y está compuesto por alrededor de 16-18 genes. Los genes cpsA al -F están ubicados en un extremo distal de los genes cpsL, NeuB, -D, -A y -C en el otro extremo y estos genes están altamente conservados en los diez serotipos mencionados anteriormente. La presencia de genes y / o la secuencia de similitud varía entre los serotipos (Figura 3) (Cieslewicz et al. 2005).

Los antígenos del CPS son importantes factores de virulencia expresados en 10 serotipos únicos, de los cuales Ia, Ib, II, III y V representan la mayoría de las enfermedades a nivel mundial. Las proteínas de superficie que confieren protección independiente del serotipo en los modelos de infección preclínica se identificaron mediante enfoques genómicos (Kapatai et al. 2017).

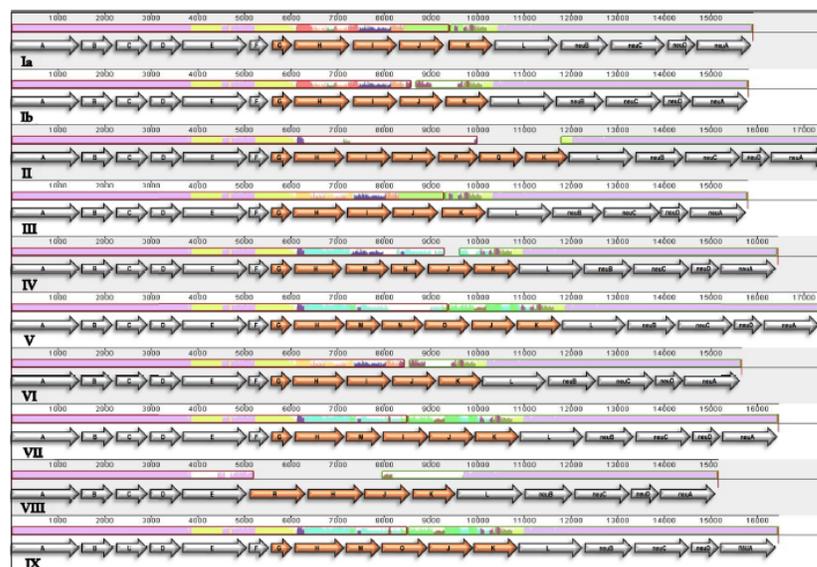


Figura 3. Locus CPS de *Streptococcus agalactiae*. Tomado de Kapatai et al. 2017.

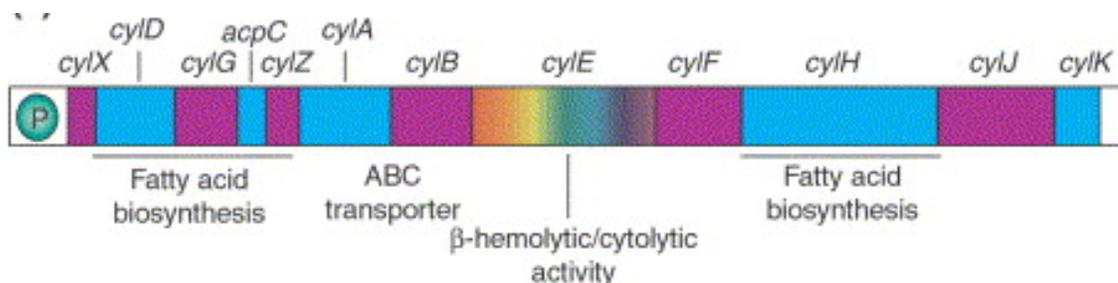
#### 2.4.2 $\beta$ -hemolisina / citolisina ( $\beta$ -H / C, CylE).

La presencia de la  $\beta$ -hemólisis es una de las características principales del EGB, aunque alrededor del 2% de los aislados recuperados pertenecen a cepas no hemolíticas. Mientras que las cepas con  $\alpha$ -hemólisis son raramente identificadas (Stevens y Kaplan 2000).

La actividad hemolítica se debe al pigmento ornitina ramnolípido conocido como "pigmento hemolítico", el cual es producido por la acción de genes del operón de *cylE* (Whidbey et al. 2013; Pritzlaff et al. 2001). La transcripción de genes *cylE*, y por lo tanto la producción del pigmento hemolítico, está regulada negativamente por el sistema de dos componentes CovR/S (también conocido como CsrR/S) (Jiang et al. 2005; Whidbey et al. 2013). Dicha propiedad hemolítica ha demostrado tener un papel importante en la infección y la evasión del sistema inmune.

En un estudio realizado por Whidbey et al. (2013) se menciona al pigmento hemolítico como promotor de la invasión del EGB en la placenta humana (membranas corioamnióticas), además de inducir la pérdida de la función de barrera en células epiteliales amnióticas humanas, también se ha observado una disminución de la propagación bacteriana, de la lesión fetal y el parto prematuro en ratones que fueron inoculados vaginalmente con EGB no hemolítico (es decir, EGB carente de *cylE*) (Whidbey et al. 2013; Randis et al. 2014).

El gen *cylE* que codifica para  $\beta$ -hemolisina / citolisina, se ubica en medio de un operón de biosíntesis de ácidos grasos (Figura 4). Cuando el gen está presente, el EGB causa una lesión citolítica de las células epiteliales pulmonares y en células endoteliales cerebrales, esto se observa mediante la formación de poros superficiales y pérdida de la densidad citoplasmática (Nizet 2002; Rajagopal 2009).



**Figura 4.** Ubicación de gen *CylE* dentro del operón *Cyl*. Tomado de Nizet 2002.

### **2.4.3 Proteína de unión a laminina (Lmb).**

La adhesión e invasión de bacterias patógenas es un paso crítico en la infección y es mediada por proteínas expuestas en la superficie denominadas adhesinas, entre ellas se encuentra la proteína de unión a laminina (Lmb) una adhesina encargada de la adherencia del *S. agalactiae* a la laminina celular del huésped. La estructura cristalina de Lmb proporciona un avance para investigaciones acerca de la patogenicidad de diversos microorganismos, en especial del *S. agalactiae* ya que se encuentra presente en todos sus serotipos, por lo tanto, la estructura de Lmb podría dirigir el desarrollo de una vacuna eficaz (Kapatai et al. 2017). Se ha demostrado que cuando EGB carece de Lmb, presentan una disminución de la adherencia a la laminina humana y a las células endoteliales microvasculares del cerebro humano (Lindahl et al. 2005).

### **2.4.4 C5a peptidasa (ScpB).**

El gen ScpB que codifica a la peptidasa ScpB anclada en la pared celular, se expresa en la mayoría de las cepas de *S. agalactiae*, la cual escinde el factor de complemento C5a, siendo este el principal quimioatrayente de neutrófilos producido por la activación de la cascada del complemento. Se han identificado dos serinas proteasas adicionales unidas a la pared celular, gbs0451 y gbs2008 que son similares a la peptidasa C5a (55% y 49% de similitud, respectivamente). En particular, estas enzimas poseen en las posiciones esperadas y se denominan como la tríada catalítica (D, H, S), postulada para constituir el sitio activo, pero aún falta demostrar si estas proteasas pueden cumplir una función en la virulencia de la bacteria. Además de escindir el complemento C5a, se ha observado que tiene una actividad como mediador de la unión bacteriana a fibronectina (Glaser et al. 2002). Al igual que eliminando el gen Lmb se reduce la actividad virulenta de EGB, eliminando la región ScpB-lmb se logra una disminución del 64% de la invasión en células endoteliales microvasculares del cerebro humano (Tenenbaum et al. 2007).

#### **2.4.5 Adhesina Hipervirulenta (HvgA).**

La proteína adhesina hipervirulenta (HvgA) fue identificada como una proteína anclada en superficie específica de ST-17 y se demostró que su presencia favorece una adhesión más eficientemente a las células epiteliales intestinales, las células epiteliales del plexo coroideo y células endoteliales microvasculares que constituyen la barrera hematoencefálica (BBB, *blood-brain barrier*). La presencia de HvgA permite la colonización intestinal y la translocación a través de la barrera intestinal y la BBB, lo que da lugar a la meningitis (Tazi et al. 2010).

#### **2.4.6 Pili.**

El pili es un organelo de superficie celular recién descubierto en *S. agalactiae*; estos organelos son apéndices flexibles en la superficie bacteriana que participan en eventos esenciales para el establecimiento de la infección, tales como la adhesión a las células huésped, la transferencia de DNA y la formación de biofilm. Se ha identificado que el pili está codificado por genes ubicados en dos loci distintos, llamados pilus island 1 y 2 (PI-1 y PI-2) y poseen dos variantes para PI-2: PI-2a y PI-2b, además se ha reportado que todos los aislamientos clínicos de EGB poseen al menos una de las islas de pilus (Banerjee et al. 2011).

En un estudio en donde se tenían 898 aislados de EGB se encontró que PI-2a es la isla más común en EGB (79%), seguido de PI-1 (70%) y el menos común fue PI-2b (21%). Una cepa de EGB puede presentar 2 islas, en dicho estudio se encontraron PI-1 y PI-2a (49%), seguidos por PI-2a solo (30%), PI-1 y PI-2b (21%), y PI-2b solo (0.6%). Además, llegaron a la conclusión de que EOD (enfermedad de inicio temprano) se asoció con PI-1 + PI-2a y PI-2a solo, mientras que PI-1 + PI-2b se relaciona con LOD (enfermedad de inicio tardío) (Martins et al. 2013).

## 2.5 Clonas.

Hasta el momento se ha descrito que existen cepas ya serotipificadas que pueden presentar subclonas, las cuales se basan en subdivisiones de los serotipos o serovariantes de la expresión de los antígenos anclados a la superficie de cada una de las cepas o en la detección de los diferentes genes que codifican para las proteínas de los antígenos de superficie (Mavenyengwa et al. 2008).

Algunos de estos antígenos incluyen miembros de la familia Alp (Alp1, Alp2, Alp3), estas proteínas contienen secuencias quiméricas que muestran reactividad inmunológica cruzada variable y tienen estructuras repetitivas (Lindahl et al. 2005).

En el 2004, por medio de electroforesis de enzimas multilocus, se encontraron que las cepas que poseen el polisacárido capsular del tipo III, pertenecían a dos linajes evolutivamente relacionados que tenían diferente potencial patogénico, ya que una sola clona tenía un grado inusualmente alto de patogenicidad la cual había sido responsable de la morbilidad y mortalidad reportada y se identificó como una clona hipervirulenta (HVC, *hipervirulent clone*) (Hansen et al. 2004).

Estas clonas hipervirulentas tienen características específicas las cuales facilitan su identificación, tales como la elaboración de altos niveles de antígeno extracelular específico de cada serotipo, así como la producción de hialuronidasa extracelular y ácido lipoteicoico (Palacios, Eskew, Solorzano, & Mattingly, 1999). De igual forma, su incapacidad para crecer a 40° C en un medio definido, es una característica que ha sido utilizada como un marcador específico y sensible para la identificación de la HVC (Mattingly et al. 1990; Timmons et al. 1994).

Para ver la dinámica de la presencia de las clonas de EGB en las muestras que se han obtenido en diferentes poblaciones de mujeres embarazadas, se ha utilizado la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE, *Pulsed-field gel electrophoresis*), por esta metodología se pueden distinguir diversos patrones de bandas en el gel, utilizando enzimas de restricción específicas para las cepas, entre ellas la mayormente utilizada es la SmaI.

En un estudio del 2004, se hizo un corrimiento de gel para observar el comportamiento de la enzima, por lo que se obtuvo que la mayoría de los aislamientos presentaron distintos patrones de bandas de gel, pero el ADN de algunos aislamientos fue resistente al corte por la enzima SmaI. Ninguna de las enzimas de restricción ApaI, XhoI y NotI arrojaron resultados satisfactorios con estas cepas, por lo que no fue posible observar el corrimiento de bandas, para esto fue necesario utilizar una enzima de digestión conocida como Sall, la cual en conjunto con otro programa de corrimiento, hizo posible la presencia de bandas, similares a las que se presentaban al utilizar la enzima SmaI (Hansen et al. 2004).

En un análisis más reciente realizado en el 2015, se plasmó un dendograma con la información de los aislados obtenidos en donde se encontró arriba del 80% de similitud entre ellos. También fue posible identificar algunos de los serotipos como el Ia y el V los cuales presentaban patrones parecidos. Algunas de estas muestras fueron obtenidas de pacientes con enfermedades invasivas y el resto con enfermedades no invasivas (Flores et al. 2015).

## **2.6 Colonización materna.**

Este microorganismo forma parte de la microbiota del tracto gastrointestinal, pero puede aparecer colonizando el área vaginal de las mujeres de manera intermitente, transitoria o crónica, y es por ello que el screening debe realizarse entre las 35 a 37 semanas de gestación. Estudios realizados específicamente en mujeres en estado de gestación, demuestran una variación en la colonización entre un 5 y un 25% (Viegas et al. 2004).

Según las normas para la prevención de las infecciones perinatales, se indica que la búsqueda intencionada de este microorganismo deberá realizarse entre las 35 y 37 semanas de gestación, mediante un hisopado vaginal y anal, ya sea en un solo hisopado o por separado, aunque también se ha aislado mediante urocultivos ya que el EGB también puede estar presente en el tracto urinario (Baker et al. 2017; CDC 2002). El EGB no solo ha sido aislado en el área vaginal y perianal de la mujer embarazada, también hay estudios que muestran porcentajes de colonización en áreas como el endometrio con un 16%, en un 15% se encuentra colonizando líquido amniótico (Sperling, Newton, & Gibbs, 1988), y por último alrededor 2-15% permanece en la herida abdominal infectada después de una cesárea (Blanco y Gibbs 1980; Emmons et al. 1988; Roberts et al. 1993).

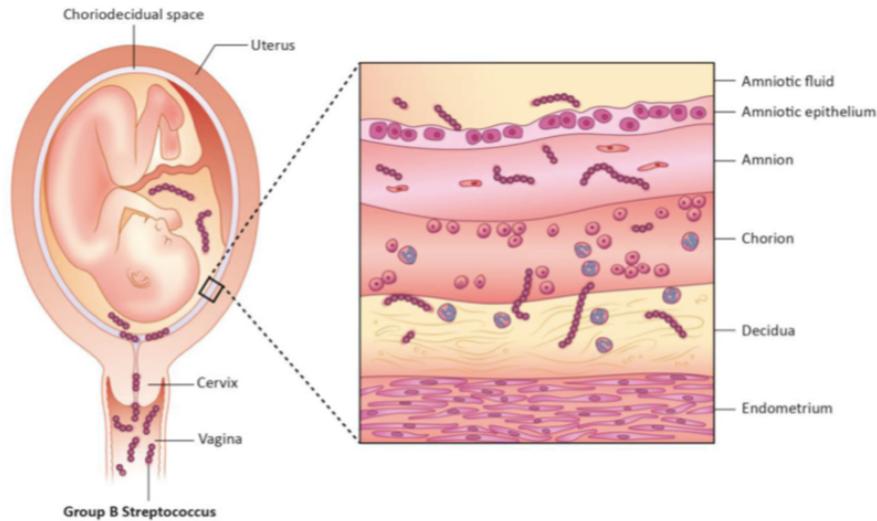
## **2.7 Transmisión al recién nacido.**

La transmisión del EGB de una persona a otra puede ser por diferentes vías como la fecal-oral, sexual y la transmisión vertical o ascendente, así como también en una mujer colonizada, la bacteria puede moverse de la vagina al área perianal debido a la proximidad de ambas (Manning et al. 2004).

Una vez que se encuentra en el área vaginal, el EGB tendrá que sobrevivir a las barreras epiteliales, al pH vaginal, a los péptidos antimicrobianos y en general al microbioma propio de la paciente.

Después de todo eso, cuando el EGB se encuentra colonizando el tracto genito-urinario de la mujer embarazada puede existir la transmisión al recién nacido de dos formas, la primera es durante su paso a través del canal de parto, estando en contacto con las mucosas vaginales que se encuentran colonizadas por el EGB y puede resultar en la aparición de la infección perinatal de estadio temprano (Hansen et al., 2004). Por otro lado, el EGB puede invadir el líquido amniótico antes o durante el parto, cabe mencionar que no todas las cepas son capaces de hacer esto y por lo tanto no causan una enfermedad invasiva en el RN (Palacios et al. 1999).

La transmisión ascendente ya es una ruta de infección utilizada por EGB en donde se mueve desde la vagina, pasando por el cérvix para llegar al útero y penetrando las membranas fetales (Figura 5). Una vez que llega a tener contacto con la placenta, hay un riesgo muy grande de que la madre sufra de una inflamación de las membranas placentarias (corioamnionitis), la cual está relacionada con los partos prematuros (Romero et al. 2014).



**Figura 5. Infección ascendente por el Estreptococo del Grupo B.** La colonización vaginal por el EGB aumenta el riesgo de una infección ascendente durante el embarazo lo cual implica el tráfico de bacterias desde la vagina, lo que en última instancia conduce a la invasión bacteriana de las membranas placentarias (corion y amnios), la cavidad amniótica y el feto. Tomado de Vornhagen et al. 2017.

Los partos prematuros están fuertemente asociados con la muerte neonatal, cada año hay aproximadamente 6,000,000 nacimientos pre-término y mas de 500,000 neonatos, mueren por esta razón (Mokdad et al. 2013). La mayor parte de los partos pre-término, desarrollan una infección microbiana y aproximadamente al 10% se le atribuye a una colonización por parte del EGB (DiGiulio et al. 2008). Por último, se han descrito casos de transmisión nosocomial a través de las manos del personal sanitario debido a la falta de higiene (Larsen y Sever 2008; Edwards y Nizet 2011).

## 2.8 Infección perinatal en el recién nacido.

La colonización del EGB en los RN puede causar diversas enfermedades, pero las tres principales son neumonía, sepsis y meningitis; aunque a la fecha, la incidencia de estas afecciones ha disminuido en algunos países debido a los esfuerzos por implementar protocolos de prevención (Cowgill et al. 2004).

Según el centro de control y prevención de enfermedades, de 1998 al 2000, en Estados Unidos, se encontró una prevalencia de 0.5 a 0.6 casos por cada 1,000 nacimientos (Oddie y Embleton 2002).

La letalidad reportada por este microorganismo en países desarrollados, es del 30% en recién nacidos menores de 33 semanas de edad gestacional, y de un 2-3% en recién nacidos que completaron las 38-40 semanas de gestación (Phares et al. 2008).

Existen diversos factores y condiciones de alto riesgo que presentan los RN, entre las principales están el parto prematuro, la ruptura prematura de membranas, hipoxia fetal, infección urinaria por EGB durante el embarazo o madres que hayan presentado partos anteriores con infección por esta bacteria y hasta la dificultad al momento del nacimiento pueden aumentar las posibilidades de infección ya que se puede ver reducida la respuesta inmune del hospedero (Baker et al. 2017). Las afecciones en el neonato se pueden presentar desde algunas semanas previas al nacimiento, comenzando con las infecciones bacterianas en las membranas fetales (corioamnionitis), la placenta, el líquido amniótico, el cordón umbilical o en el mismo feto (Robert et al. 2000).

Se cuenta con una clasificación de los tres diferentes estadios en los cuales pueden aparecer los síntomas de la infección perinatal, estas se conocen como enfermedad de inicio temprano (EOD, *early onset disease*), enfermedad de inicio tardío (LOD, *late onset disease*) y enfermedad de inicio tardío tardío (VLOD, *Very Late Onset Disease*), donde la principal diferencia, son los días de nacido que tiene el bebé al momento de mostrar los primeros síntomas y posiblemente la manera en que fue transmitida (Slotved et al. 2007).

La enfermedad de inicio temprano aparece dentro de los primeros 7 días de vida, siendo mas evidente en el día del nacimiento o dentro de las primeras 72 horas de vida. La enfermedad de inicio tardío, ocurre después de la primera semana de vida, presentándose a través de los 90 días de edad (Libster et al. 2012), mientras que la enfermedad de inicio tardío tardío, aparece después de los primeros tres meses de vida (89-180 días) (Thigpen et al. 2011; American Academy of Pediatrics 2012). Durante la década de 1990 se reportó una tasa de letalidad del 4.7% en el caso de la enfermedad de inicio temprano y el 2.8% para la enfermedad de inicio tardío. Para los bebés de más de 37 semanas con sepsis por EGB, la supervivencia fue del 98%, pero para los RN prematuros la supervivencia fue más baja; para los nacidos durante las semanas 34-36 está supervivencia fué del 90% y en los nacidos en menos de 33 semanas la supervivencia fue del 70% (Schrag et al. 2000).

En un estudio del 2016, alrededor de 82 neonatos fueron detectados con la presencia de EGB, de los cuales el 43.9% (36/82) se asoció con el inicio temprano y el 52.4% (42/82) con el inicio tardío de la infección. En el caso de los neonatos en la etapa de inicio temprano, el 47.2% (17/36) de ellos fallecieron a pesar del tratamiento, particularmente el 61.1% (11/18) de los que tenían menos de 24 horas de vida (Seale et al. 2016).

## **2.9 Epidemiología mundial.**

Este estreptococo  $\beta$ -hemolítico se reconoce como patógeno humano desde 1938, a partir de tres casos fatales de sepsis puerperal. En la década de los sesenta se transformó en el primer microorganismo con una elevada frecuencia en la sepsis neonatal (Eickhoff et al. 1964). Se ha informado que el EGB es una de las causas frecuentes de sepsis neonatal en el sur de África y Kenia, así como una causa importante de meningitis en Malawi y Kenia. Por otro lado, algunos estudios asiáticos han reportado una incidencia mucho menor (Gray et al. 2007).

En cuanto a otros países como Medio Oriente y África del Norte, la prevalencia del EGB es de aproximadamente 22%; En Asia / Pacífico hay un porcentaje del 19%; En África es del 19%; En India / Pakistán, del 12% y por último en América, se ha reportado hasta un 14% (Stoll et al. 1998).

En cuanto a la prevalencia de la infección perinatal en América Latina, en donde de 0.39-1.15 por cada 1000 nacidos vivos estaban colonizados, mientras que los estudios de Asia y Oriente Medio informaron una menor incidencia 0-0.26 por 1000 nacidos vivos, estaban colonizados (Vaciloto et al. 2002).

Cabe mencionar que las diferencias entre las técnicas microbiológicas aplicadas y de muestreo contribuyen en la diferencia de las incidencias informadas (Zaidi et al. 2009).

## **2.10 Epidemiología en México.**

En el primer estudio que fue implementado en México para saber la frecuencia de la colonización por parte del EGB, se encontró que el 1.5% de las mujeres embarazadas se encontraban colonizadas este estreptococo (Collado et al. 1981).

Seguido de ese estudio, el Instituto Nacional de Perinatología (INPer) de la ciudad de México realizó otro mas, en donde se reportó una colonización del 10.3%, con una tasa de infección neonatal de 1/1,500 recién nacidos vivos y una mortalidad de 38.5% (Sólorzano et al. 1989; Sólorzano et al. 1990a, 1990b). Viendo estos resultados, se incrementó el interés por saber la epidemiología del EGB, por lo que se realizó un estudio mas en Los Altos, Chiapas, obteniendo una prevalencia del 8.6% (Ocampo et al. 2000). Estos primeros estudios, demostraron que el serotipo predominante era el I con una prevalencia del 33% y mostró una baja frecuencia del serotipo III (3%), indicando también que se habían encontrado cepas no tipificables (18.2%) (Elliott et al. 2004). Después nuevos datos apuntaron al aumento en la presencia del serotipo III en los aislados con porcentajes del 5.9% – 12.8%, y una menor aparición de NT con porcentajes de 0- 5.9%, (Villaseñor 2004).

En el 2005 se realizó otro estudio en donde se observó que el 48.6% presentaba un serotipo I, el 14% al serotipo II, el 32.9% de los aislados pertenecían al serotipo III, y se identificó un aumento en la aparición de cepas no tipificables con un 4.2% de prevalencia, además de que (Palacios et al. 2005). Si bien, en México existía un mayor predominio del serotipo I, parece que en los últimos estudios se presentó un incremento del serotipo III (el cual ha sido relacionado con la enfermedad invasiva en México) (Palacios et al. 1997) observándose un descenso en los aislados no tipificables, lo que sugieren un cambio en la epidemiología del EGB en nuestro país.

En la figura 6 se muestra una comparativa de las publicaciones en México, en donde se pueden ver claramente los diferentes porcentajes de la prevalencia del EGB y la diferencia en el total de muestras tomadas, el numero de pacientes colonizadas y la prevalencia en porcentaje de las muestras positivas obtenidas.

**Cuadro 1.** Prevalencia de colonización ocasionada por *Streptococcus* del grupo B en mujeres embarazadas. Reporte de estudios mexicanos

<i>Estudio</i>	<i>Colonizados</i>	<i>No colonizados</i>	<i>Total muestra</i>	<i>Prevalencia (%)<sup>a</sup></i>	<i>p<sup>b</sup></i>
Collado y col.	8	192	200	4	0.001
Narcio y col.	5	100	105	4.8	0.04
Solórzano y col.	35	305	340	10.3	0.5
Ocampo y col.	78	832	910	8.6	0.03
González y col.	97	594	691	14	0.02
Villaseñor y col.	16	107	123	13	0.5
Romero y col.	2	431	433	0.46	0.0000
González y col.	20	78	98	20.4	0.01
Hernández y col.	19	30	49	38.7	0.0000
Total	280	2669	2949	9.5	-

<sup>a</sup> Prevalencia (%) = colonizados x 100/total de la muestra

<sup>b</sup> La *p* se obtuvo al comparar la cifra obtenida de este estudio (9.5%) vs la prevalencia referida en el estudio original, de manera individual mediante la prueba de la *ji* al cuadrado. Diferencia significativa *p*<0.05.

**Figura 6.** Comparación entre los resultados de los estudios epidemiológicos realizados en México para conocer la prevalencia del EGB (Ortiz et al. 2012).

## 2.11 Profilaxis.

La elevada morbilidad y mortalidad asociada a la sepsis, meningitis y neumonía causada por el EGB, ha incrementado la búsqueda por implementar medidas que eviten la transmisión vertical, por lo que en la década de los 80's se demostró que el tratamiento intraparto en las madres colonizadas reducía la tasa de contagio y por lo tanto la aparición de sepsis en los recién nacidos (Boyer et al. 1986).

En el año de 1992, la Asociación Americana de Pediatría (AAP) recomendó hacer tamizaje a las embarazadas entre las 26 y 28 semanas de gestación para la búsqueda intencionada del EGB, por lo que en ese mismo año agregó también el screening basado en los factores de riesgo, que incluía partos de pre-término, antecedente de hijos previamente colonizados con EGB, sepsis, o condiciones de colonización en embarazo actual, rotura prematura de membranas de más de 18 horas, o fiebre intraparto (Gibbs et al. 2004).

Después, en el año 1996 el CDC publicó las primeras guías de consenso para la prevención de esta patología, que se basaban en dar profilaxis antibiótica a aquellas embarazadas que presentaban factores de riesgo o un cultivo positivo para EGB, realizado entre las 35 y 37 semanas de gestación (Yancey et al. 1996).

El resultado de la implementación de estas estrategias demostró una prevención de hasta un 68% de la sepsis por *S. agalactiae* al utilizar el protocolo basado en factores de riesgo y se previno hasta el 89% de la transmisión usando el protocolo basado en cultivo (Tapia et al. 2007).

El centro de prevención y control de enfermedades, recomienda la toma del hisopado vaginal y anal a todas las mujeres embarazadas durante el tercer trimestre, específicamente entre las semanas 35-37 de gestación. Este screening se utiliza como forma preventiva para evitar complicaciones durante y después de parto a causa del *S. agalactiae* (CDC 2002).

Una vez que se ha detectado la presencia de la bacteria, es necesario implementar un tratamiento con profilaxis intraparto antimicrobiana (PAI), en donde se utiliza penicilina o ampicilina, exceptuando los casos de alergia y se opta por utilizar una lincosamida como la clindamicina, o un macrólido como la eritromicina, aunque esta última se contempla cada vez menos debido a una resistencia del 15-30%. El uso de antisépticos vaginales de clorhexidina no ha demostrado eficacia y no hay datos concluyentes respecto a la prevención de EGB mediante vacunas dirigidas al polisacárido o a las proteínas de los pili (Padilla et al. 2016).

Es necesario realizar pruebas de sensibilidad a antibióticos ya que la aplicación de penicilina o ampicilina a pacientes colonizadas, 4 horas antes del parto, previene la infección en los RN entre el 65 al 85% de los casos (Brizuela 2007).

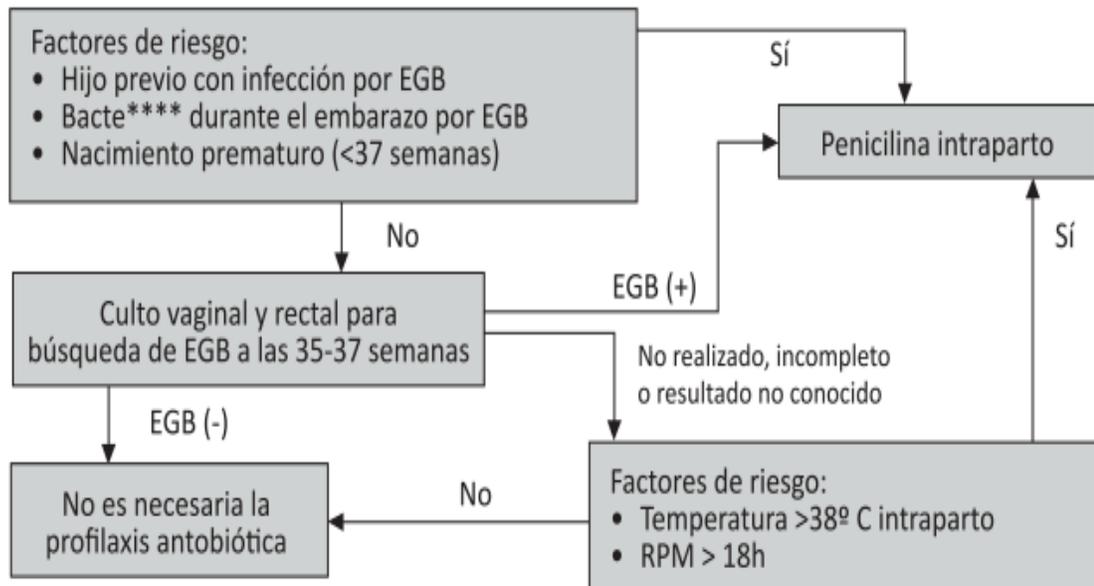
Uno de los problemas que han surgido con el uso de antibióticos intraparto, es el aumento en la tasa de resistencia a estos, tal es el caso de los macrólidos (Betriu 2003).

Se han descrito dos mecanismos de resistencia, el primero esta basado en la modificación del ribosoma por una metilasa codificada por los genes *erm* y la otra que implica un aumento del flujo de salida del fármaco debido a una proteína unida a la membrana hidrófoba codificada por el gen *mef*. La presencia de una metilasa Erm confiere resistencia a la eritromicina y resistencia inducible o constitutiva a lincosamidas y estreptogramina B, mientras que la presencia de una bomba Mef confiere resistencia solo a macrólidos de 14 y 15 miembros (fenotipo M) (Klaassen 2005).

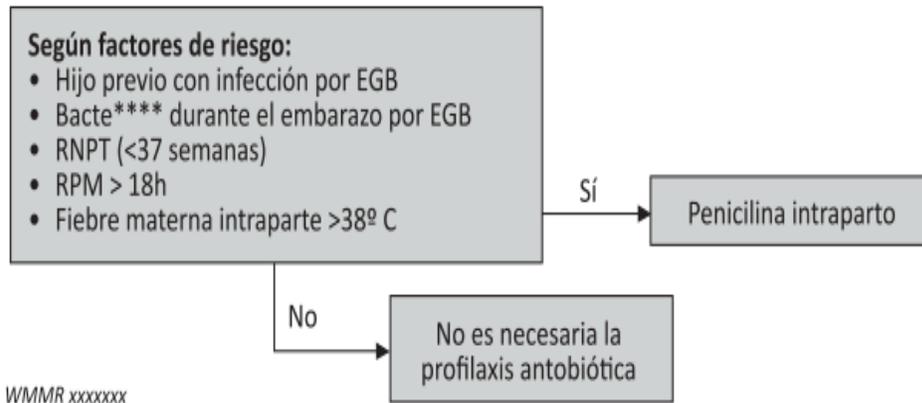
También se deberá contar un tratamiento intraparto de acuerdo a la sensibilidad de los antibióticos que se haya obtenido, además de implementarlo cuando no fue posible hacer la identificación previa del EGB y hay rotura de membranas, fiebre intraparto mayor a 38°C, parto antes de las 37 semanas de gestación, aborto en gestas anteriores, o que alguno de los hijos anteriores haya presentado infección por EGB al momento de nacer, también se menciona que en el caso de cesárea programada o cesárea realizada antes de la rotura de membranas no es necesaria la profilaxis intraparto, sea cual sea el resultado del cultivo del cribado (Domelier et al. 2008; Le Doare y Heath 2013).

Hasta ahora existen diferentes guías que establecen estrategias de prevención las cuales se basan en el screening universal o solamente guiado por factores de riesgo. En esta segunda opción, existen 2 estrategias: a) administrar profilaxis a pacientes que presenten algún factor de riesgo, y b) realizar cribado en estas pacientes y dar profilaxis solo a las que sean detectadas como colonizadas (Alós Cortés et al. 2012).

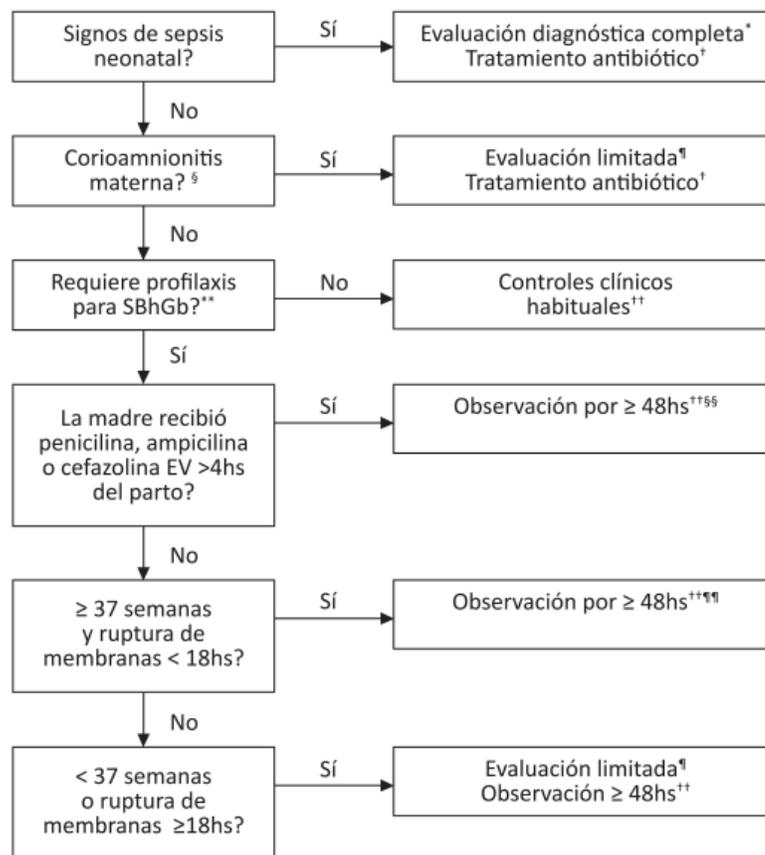
A continuación, se muestran dos algoritmos a seguir de acuerdo con la guía de la Dirección Nacional de Maternidad 2011, escrito para un correcto abordaje de la Infecciones de transmisión vertical de madre a hijo, en donde se mencionan los pasos a seguir al momento de contar con un caso de colonización por *S. agalactiae*. (Figura 7 y Figura 8).



**Figura 7.** Algoritmo 1 para implementar la profilaxis intraparto.



**Figura 8.** Algoritmo 2 para la prevención de la infección precoz por EGB en neonatos. (Dirección Nacional de Maternidad e Infancia 2011).



**Figura 9.** Algoritmo 3 para el manejo del RN cuya madre recibió PAI. (Dirección Nacional de Maternidad e Infancia 2011).

Hasta ahora se sabe que en algunos países no es posible realizar la implementación del PAI ya que existe una gran variación entre la incidencia de la enfermedad tanto de la madre como en el recién nacido, por lo que es importante tomar en cuenta la presencia de los factores de riesgo y la exposición y susceptibilidad de la población de la que se habla (Dagneu et al. 2012; Cruz et al. 2008).

### III. JUSTIFICACIÓN

Una de las mayores problemáticas en los sistemas de Salud Pública son las infecciones perinatales, sobretodo las de transmisión vertical ya que tienen un gran impacto en la morbilidad y mortalidad materno-infantil. El difícil acceso a los servicios de salud, la falta de información y sobretodo la aparición tardía de los síntomas, generan un alto costo económico y se puede perder tiempo valioso que podría evitar complicaciones tanto en el recién nacido y en la madre. Todo esto se puede evitar si se cuenta con un control preconcepcional, prenatal y perinatal adecuado, por lo que es necesario contar con el trabajo conjunto de obstetras, pediatras y químicos para la prevención, diagnóstico y tratamiento oportuno de la madre y el recién nacido. Por lo que la intención de este trabajo es evaluar si en la población estudiada se justifica la búsqueda intencionada del Estreptococo del Grupo B, así como gestionar la implementación de la profilaxis intraparto antimicrobiana en las pacientes de esta población.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Los factores de virulencia CylE, scpB, Lmb están presentes en todas las muestras positivas para EGB y se asocian a un mayor riesgo en la colonización en la mujer embarazada.

## **V. OBJETIVO DEL TRABAJO**

### **5.1 Objetivo general.**

- Caracterización de serotipos del EGB y la asociación de sus factores de virulencia con la transmisión vertical de las pacientes colonizadas.

### **5.2 Objetivos particulares.**

1. Aislar e identificar el EGB en muestras de las pacientes embarazadas.
2. Identificar los serotipos del EGB en las muestras positivas.
3. Evaluar la distribución y la existencia de clonas de EGB.
4. Identificar los factores de virulencia de las cepas aisladas de las pacientes colonizadas por EGB.

## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Diseño del estudio.**

Se realizó un estudio transversal analítico para evaluar los factores sociodemográficos, heredofamiliares, ginecobstétricos y genéticos de las mujeres embarazadas colonizadas por el Estreptococo del grupo B. Se abordaron mujeres embarazadas que presentaban entre 35 y 37 semanas de gestación durante el periodo de enero-diciembre del 2018, las cuales llenaron un cuestionario para obtener información clínica y epidemiológica relevante (Anexo 1) y finalmente firmaron una carta de consentimiento informado (Anexo 2). Los aspectos clínicos fueron evaluados por el responsable médico, así como el manejo de la información de los consentimientos de las participantes.

### **6.2 Criterios.**

#### 6.2.1 Criterios de inclusión.

- a. Mujeres entre las semanas 35 y 37 de gestación
- b. Todos los recién nacidos o productos de madres colonizadas por Estreptococo del grupo B.

#### 6.2.2 Criterios de exclusión.

- a. Mujeres embarazadas que no deseen dar su consentimiento informado.

#### 6.2.3 Criterios de eliminación.

- a. Si la mujer embarazada, sea ella y/o su recién nacido, se retira del estudio o se pierde en el seguimiento por cualquier causa no relacionada con EGB, antes de que se complete el seguimiento planeado, siempre y cuando no haya ocurrido el evento de interés.

### **6.3 Muestreo.**

La toma de muestra consistió en dos partes; la primera fue un hisopado en el introito vaginal y el área perianal (no invasiva) en un solo tiempo, deslizando el hisopo a través del periné hacia el margen anal; la muestra fue tomada antes de cualquier manipulación de la vagina, sin higiene femenina previa, y sin el uso de antibióticos previos. La segunda fue una muestra de sangre, en tubo sin anticoagulante para obtener el suero de las pacientes y en tubo con anticoagulante (EDTA) para poder realizar el grupo sanguíneo de las pacientes. A los productos provenientes de madres colonizadas, se les tomó una muestra de faringe, del área periumbilical y rectal, esto dentro de las primeras 4 h del nacimiento para determinar si había o no, presencia del EGB. Se les dió seguimiento durante tres meses, a madre e hijo.

Los hisopos con las muestras se colocaron en caldo Todd-Hewitt (THB) adicionado con 8 mg/l de Gentamicina y 15 mg/l de ácido nalidíxico (THB, Becton-Dickinson, NJ, EUA). Estas muestras fueron transportadas en menos de 24 h de recolectada la muestra al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. (Si este tiempo es excedido, la muestra y la paciente serán eliminadas del estudio).

### **6.4 Aislamiento e identificación del EGB.**

Las muestras previamente sembradas en caldo Todd-Hewitt, se incubaron 37°C por 18-24 horas, en un ambiente de CO<sub>2</sub> al 5%, para posteriormente ser sembradas en agar base sangre (OXOID LTD, Basingstoke, Hapshire, England), adicionado con eritrocitos de carnero al 5% y fueron incubadas bajo las mismas condiciones. De cada placa de agar sangre, se buscaron las colonias que presentaran β-hemólisis y se aislaron (Incubadas a 18-24 hrs, 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%) para su posterior identificación. Una vez que se tuvieron las colonias aisladas, se realizó una tinción de Gram para observar cocos gram positivos.

El EGB no contiene la enzima catalasa por lo que, al ponerla en contacto con el peróxido de hidrógeno, este no se descompone en oxígeno y agua, esto se puede observar con la ausencia de efervescencia, resultando una prueba negativa.

Se procedió a realizar la prueba de la hidrólisis del hipurato, en donde se utilizaron 10 ul de agua destilada en un tubo en donde se inocularon de 3-4 colonias de la bacteria y se agregó un disco que contiene hipurato, dejándolo incubar 2 hrs a 37°C. El EGB tiene la capacidad de hidrolizar el hipurato mediante la enzima hipuricasa, esto dió como resultado la presencia de la glicina, pasando las dos horas de incubación se agregó el reactivo de ninhidrina que, junto con la presencia de la glicina, reaccionó con el reactivo provocando un cambio de coloración a lila-morado en los primeros 10 minutos de la reacción cuando la bacteria es EGB.

La siguiente prueba que se realizó fue la prueba de CAMP (Christie- Atkins- Munch-Peterson test) , presente en la mayoría de los EGB a la que se conoce como factor CAMP, esta prueba detecta una proteína extracelular difusible y termoestable que aumenta y mejora la beta hemólisis de *Staphylococcus aureus*, esta cepa hemolítica es sembrada en el centro y en línea recta de una placa de agar sangre y en forma perpendicular sin tocar al *S. aureus* son sembradas las muestras problema y controles positivo (cepa de EGB del ATCC) y negativo ( *E. faecalis* ) . La placa es incubada a 37 °C durante 18-24 horas. Cuando la prueba es positiva para el factor CAMP aparece una hemólisis característica de punta en flecha entre la unión de crecimiento del *S. aureus* y las muestras que sean EGB.

Una vez que ya se hizo la identificación mediante las pruebas bioquímicas, se verificó cualitativamente su crecimiento en el medio Strep B Carrot Broth™ Kit. Para esto, se utilizó la característica única de los EGB hemolíticos de producir un pigmento que va de un naranja claro a un naranja rojizo. El Strep B Carrot Broth™ Kit contiene los componentes necesarios para la detección de la pigmentación de los EGB β-hemolíticos, ya que contiene; la peptona, el almidón y los buffers necesarios, mientras que las Tirillas Strep B Carrot Broth™, contienen los factores de enriquecimiento necesarios para el crecimiento y la producción de pigmentación del EGB.

## **6.5 Tipificación de grupo y serotipificación.**

Posteriormente se realizó un método rápido de aglutinación de látex para la identificación serológica de los grupos A, B, C, D, F y G de Lancefield a partir de colonias aisladas de *Streptococcus* spp  $\beta$ -hemolítico por medio del StrepPRO™ Streptococcal Grouping Kit Hardy Diagnostics. La identificación de los serotipos de los aislados de EGB se realizó mediante aglutinación de látex (Pastorex B Streptococci, Sanofi Diagnostic Pasteur, Marnes La Coquette, Francia). Este kit permite la identificación de todos los serotipos de EGB actualmente identificados (Ia, Ib, II-IX).

Se tomaron de dos a tres colonias de cada una de las muestras posibles de EGB y se pusieron en contacto con el reactivo que contiene las partículas de látex sensibilizadas con los anticuerpos específicos para cada uno de los serotipos.

## **6.6 Electroforesis en Gel de campos pulsados.**

### **6.6.1 Extracción de DNA.**

Se tomó una colonia aislada del *Streptococcus agalactiae* y se cultivó en agar sangre por 18 hrs a 37°C. Transcurrido el tiempo se tomó una colonia y se resembró en tubos con 3 ml de agar cerebro corazón (BHI) + extracto de levadura al 1%. Se incubó en CO<sub>2</sub> a 37°C por 3 hrs para permitir que el *S. agalactiae* entrara en fase log. A partir de este punto la muestra se mantuvo en hielo. El cultivo se pasó a un tubo Falcon de 15 ml, se centrifugó por 20 minutos a 4, 500 rpm a 4°C. Se retiró el sobrenadante con una pipeta Pasteur teniendo mucho cuidado de no destruir el pellet bacteriano. El pellet fue resuspendido en 1 ml de PIV.

Nuevamente la suspensión bacteriana se centrifugó en un tubo Eppendorf por 10 minutos a 4,000 rpm a 4°C. Se retiró el sobrenadante y nuevamente se re suspendió el pellet con 200ml de PIV y se homogenizó.

Leer en el espectrofotómetro:

Adicionar a la celda:

- 1ml de PIV.
- 5µl del pellet re-suspendido.

\*Homogenizar por inversión.

Ajustar la densidad óptica (OD) del pellet.

<b>Rango valido.</b> <b>OD= 0.05-0.25</b>
--

\*Si no se cumple con la densidad deseada utilizar la fórmula para compensar.

$$\text{OD} \times 40 \times 240 - 240 = \text{Cantidad necesaria de PIV que se debe de agregar para ajustar la OD a 0.05}$$

Se preparó la agarosa al 1.5% y se dejó en el baño maría a 40 grados. (PIV 5ml – 0.075g Agarosa). Se preparó una base de vidrio, se cubrió con parafilm evitando que queden burbujas, los portaobjetos se limpiaron con alcohol. Se dejó atemperar la muestra en un baño María (40°C) por 2 minutos, posteriormente se toman 150µl de la muestra y 150µl de agarosa para homogeneizarse al vortex.

Se tomó 20µl de la mezcla con una micropipeta, y se depositaron en la base de vidrio. Una vez realizados los discos deseados, se cubrieron con un portaobjetos y se incubaron a -20°C por 5 minutos

Mix para reacción de lisis.

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad por cepa</b>
<b>Buffer EC</b>	1 ml
<b>RNAsa</b>	5 µl
<b>Lisozima</b>	10 µl

Mezclar por inversión.

Se tomó 1ml del mix al tubo Eppendorf (1ml por cepa=1 tubo por cepa).

Después de haber transcurrido los 5 minutos de incubación a  $-20^{\circ}\text{C}$ , los discos se retiraron de la base de vidrio. Los discos seleccionados se depositaron en el Mix previo (asegurándose que ninguno se quede en las paredes del tubo) y se incubaron los discos a  $37^{\circ}\text{C}$  por 3 hrs.

Transcurrido el tiempo de incubación, se decantó a través de una gasa para eliminar el sobrenadante, después de esto se dan unos pequeños golpeteos al tubo para asegurarse que ningún disco se quede en la gasa.

Se agregó 1 ml de Buffer ES + Proteinasa K (0.001gr por cepa/ml) al tubo y se dejó en incubadora o en baño María a  $50^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche (por 17 hrs).

Transcurridas las 17 hrs, se realizó un lavado rápido con Buffer EC, se agregó 1 ml al tubo, se agitó manualmente y se decantó. Posteriormente se hizo el lavado inicial con 13-15 ml de Buffer TE por 30 minutos. Al transcurrir el tiempo se decantó, utilizando una gasa estéril para evitar que los discos se perdieran.

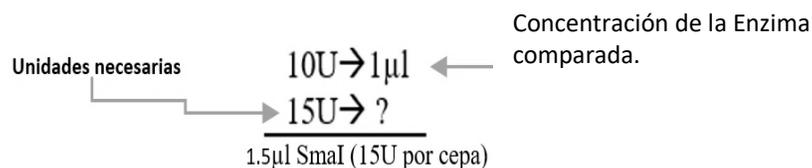
Se realizó el lavado de los discos una vez cada hora durante 5 horas. Para realizar esto se decanta el sobrenadante a través de una gasa para evitar la pérdida de los discos. El lavado se hizo utilizando 13-15 ml de Buffer TE, se dejó en agitación por 1 hora, se decantó y se rellenó nuevamente con el buffer. (Se repite el paso 5 veces).

Al terminar el último lavado, se decantó el buffer y nuevamente se rellenó con 13-15 ml del Buffer TE y se guardaron a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Se eligió un solo disco y se colocó en el tubo eppendorf con  $300\mu\text{l}$  del buffer pre-SmaI + Mercaptoetanol. Se incubaron por 45 min- 1hr (Para 15ml de Buffer pre-SmaI-  $6\mu\text{l}$  de Mercaptoetanol)

### 6.6.2 Restricción de los discos que contienen el ADN de la bacteria.

*Streptococcus agalactiae* / Enzima: SmaI / # de fragmentos en la restricción: 15-20 / Tamaño de los fragmentos (kb): 5-500



**Ejemplo:**

Si se tienen 7 cepas por correr:

$1.5\mu\text{l de SmaI} \times 7\text{muestras (discos)} = 10.5\mu\text{l de SmaI}$ .

Se retiró el buffer pre-SmaI (con pipeta) y se agregaron  $50\mu\text{l}$  de mezcla pre-SmaI + mercaptoetanol + SmaI. **Ejemplo:** Se tienen 7 cepas  $7 \times 50\mu\text{l} = 350\mu\text{l}$  del mix.

$350\mu\text{l del mix} - 10.5\mu\text{l SmaI} = 339.5\mu\text{l pre SmaI} + 10.5\mu\text{l SmaI}$

Se incubaron a  $25^\circ$  por 17 hrs (en baño maría o incubadora). Transcurridas las 17 hrs de incubación se agregó el buffer de carga ( $10\mu\text{l}$  por disco/tubo), se pasaron inmediatamente a hielo y se dejaron listos para cargarlos al gel.

Antes de realizar el gel se preparó la cámara: 3 Litros de agua miliQ por lavado. 3 litros de Buffer TBE 0.5%

- a. Antes de utilizarla se puso a correr el agua bidestilada (agua miliQ de preferencia) por 15 minutos. Se realizaron dos lavados.
- b. Se puso a correr el Buffer TBE 0.5X para atemperar la cámara a  $14^\circ\text{C}$ .

Se preparó un gel de agarosa al 1%. Se sacó el disco con el asa de plástico, se colocó en un cubreobjetos y con la ayuda de una sanita, por las orillas se retiró el exceso de Buffer de carga.

Se cortó el marcador molecular del mismo tamaño que los discos y se colocó en el gel. Por último, se sellaron los pocillos con un poco de agarosa 1% (aproximadamente 5ml), de lo contrario estos se pueden salir en el proceso de corrimiento. Antes de colocar el gel en la base de la cámara se debe de asegurar que este no tenga ningún resto de agarosa en los bordes.

### **6.6.3 Corrimiento del gel.**

1. El **programa de corrimiento** fue el siguiente:

Se corrió el gel por 21 horas a 14°C, a 6.0 V/cm, utilizando un intervalo de tiempo entre pulsos inicial de 3' y un pulso final de 55'.

Una vez terminado el programa de corrimiento, se quitó el gel de la base, desechó el buffer y se realizaron dos lavados. El gel se tiñó con bromuro de etidio (10 mg/ml), y se mantuvo en agitación por 30 minutos. Transcurridos los 30 minutos, se pasó a un recipiente de plástico al cual se le agregará agua miliQ de 5-10 minutos (Tiempo transcurrido antes de tomar la foto). Se llevó a un fotodocumentador para observar el Gel.

## **6.7 Identificación de factores de virulencia de las cepas aisladas de las pacientes colonizadas por EGB.**

### **6.7.1 Aislamiento de ADN genómico.**

Para la extracción de ADNg (ADN genómico) de los 17 aislados de EGB, se utilizó el QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemania). Cada aislado se inoculó en 3 mL de caldo Todd-Hewitt y fue incubado durante 24 horas a 37° C. Posteriormente se tomaron 1.5 mL del cultivo celular y se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 minutos para luego decantar todo el sobrenadante y re-suspender las células en 180 µl lisozima (50 mg/ml), con un periodo de incubación a 37° C por 60 minutos. Posteriormente, se añadieron 20 µL de proteinasa K, se mezcló en vortex durante 15 segundos y se incubó a 56° C por 30 minutos, seguido de 10 minutos a 70° C para inactivar la proteinasa K. Finalizada la etapa de incubación se añadieron 4 µl de RNAsa A y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente.

Para continuar con la purificación, se añadieron 200 µl de buffer AL, se incubó a 70° C durante 15 minutos, se añadieron 200 µl de etanol grado molecular y todo el contenido del tubo fue transferido a una columna QIAamp Mini spin colocada a su vez en un tubo de recolección de 2 mL; se centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm para desechar todo el eluyente y se colocó la columna en un tubo de recolección de 2 mL nuevo.

Se añadieron 500  $\mu$ L de buffer AW1, se centrifugó durante 1 minuto a 8,000 rpm y de nuevo se desechó el tubo de recolección. Se colocó la columna en un tubo de recolección de 2 mL nuevo, se agregaron 500  $\mu$ L del buffer AW2 y se centrifugó durante 1 minuto a 14,000 rpm para desechar el eluente. Finalmente, la columna fue colocada en un tubo nuevo de 1.5 mL y se agregaron 60  $\mu$ l de agua inyectable para eluir el ADNg capturado por centrifugación a 8,000 rpm. Éste paso fue repetido para obtener un volumen final de 120  $\mu$ l. La concentración y la pureza del ADNg obtenido de cada aislado fueron medidas por lecturas espectrofotométricas a 260 y 280 nm y las relaciones A260-280 y A260-A230 en el NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, DE, EUA). Además, se realizaron electroforesis en agarosa al 1% para evaluar su integridad. Previo a la generación de las librerías de ADNg, todas las muestras de ADNg fueron preparadas a una concentración de 500 ng en un volumen de 30  $\mu$ l y depositadas en una placa de 96 pocillos para lo cual, se empleó el Quant-iT PicoGreen dsDNA assay kit (Thermo Fisher Scientific).

Se mezclaron 2  $\mu$ l de la muestra de ADNg con 100  $\mu$ l del Quant-iT PicoGreen dsDNA reagent y 98  $\mu$ l de Buffer TE 1x en tubos para ensayos Qubit y se midió la fluorescencia en el equipo Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific).

### **6.7.2 Preparación de librería para secuenciación.**

Se empleó el Nextera DNA Flex Library Prep Kit (Illumina Inc. San Diego, CA. E.U.A.) en la preparación de la librería de ADNg para la secuenciación del genoma completo de los aislados de EGB. El protocolo inició con una etapa de fragmentación del ADNg y etiquetado de los fragmentos producidos mediante la adición a cada muestra de 10  $\mu$ l del reactivo Bead-Linked Transposomes (BLT) mas 10  $\mu$ l de la solución de etiquetado 1 (TB1, *tagmentation buffer 1*), con incubación en termociclador de 55° C por 15 minutos. A continuación, se realizó la limpieza post-etiquetado de las muestras para lo cual, se les añadieron 10  $\mu$ l del reactivo Tagmentat Stop Buffer (TSB) y se incubaron a 37° C durante 15 minutos.

Al terminar el ciclo, la placa fue colocada sobre un soporte magnético y permaneció inmóvil hasta que la muestra se tornara transparente por completo (3 minutos

aproximadamente), para finalmente descartar todo el sobrenadante con una micropipeta multicanal.

En seguida se retiró la placa del soporte magnético y se añadieron 100 µl de Tagment Wash Buffer (TWB) para repetir el procedimiento de eliminación de sobrenadante en la placa magnética. Éste lavado fue realizado por duplicado y una vez terminado el segundo lavado se re suspendió cada muestra en 100 µl del TWB.

El siguiente paso en el protocolo de preparación de la librería para secuenciación consistió en la realización de una amplificación por PCR con ciclos limitados para añadir los índices-adaptadores 1 (i7) y 2 (i5) (Nextera DNA CD Indexes 24 indexes, 24 samples; Illumina Inc. San Diego, CA. E.U.A.). Se preparó una mezcla maestra de PCR con 22 µl de Enhanced PCR Mix (EPM) y 22 µl de agua libre de nucleasas por cada muestra mas 5 µl de cada uno de los índices-adaptadores siguiendo el protocolo indicado para múltiplex de seis.

Las condiciones de amplificación se programaron en un termociclador y consistieron en 68° C por 3 min y 98° C por 3 min; 5 ciclos de 98°C° por 45 seg, 60° C por 30 seg y 68° C por 2 min; y finalmente 68° C por 1 min para extensión final.

Luego de la amplificación, se realizó una purificación de las librerías amplificadas mediante un procedimiento de lavado con perlas para eliminar contaminantes o índices no amplificados. La placa que contenía la librería fue colocada sobre el soporte magnético durante 5 minutos y se transfirieron 45 µl del sobrenadante a tubos eppendorf para lavar con 45 µl del reactivo Sample Purification Beads (SPB) mas 40 µl de agua libre de nucleasas; se homogeneizó pipeteando repetidamente y se centrifugó a 1,600 rpm por 1 minuto para al final incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se colocaron los tubos en el soporte magnético durante 5 minutos y se colectaron 125 µl del sobrenadante en un tubo nuevo con 15 µl de SPB; se mezclaron mediante pipeteo, se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos y de nuevo se colocaron en el soporte magnético durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y se realizaron 2 lavados con etanol al 80%. Posterior a los lavados, se retiró el etanol y se dejaron secar las perlas para re suspender con 32 µl de Resuspension Buffer (RSB), se incubó durante 2 minutos y para finalizar se colocaron los tubos en el soporte magnético durante 2 minutos para tomar el sobrenadante y almacenarlo a -20° C.

Para determinar el tamaño promedio de los fragmentos etiquetados en cada muestra, así como su concentración y pureza se realizaron electroforesis con cartuchos Agilent DNA 12 000 Kit (Agilent Technologies, Santa Clara California, EUA) en el equipo 2100 Agilent Bioanalyzer. Se preparó una mezcla maestra tomando 5  $\mu$ l de cada librería y ésta fue evaluada de nuevo con cartuchos Agilent DNA 12 000 Kit y se prepararon diluciones para llevar la mezcla maestra a una concentración final de 8 pM; además, se utilizó como control una librería del genoma del bacteriófago PhiX (PhiX Control v3, Illumina Inc.) al 15%. La mezcla de librería y control fue depositada en el cartucho para secuenciación de acuerdo con las condiciones del fabricante (MiSeq Reagen Kit V2, Micro Flow Cell 300 cycles; Illumina Inc.) y éste fue colocado dentro del equipo de secuenciación de nueva generación MiSeq (Illumina Inc.). Para la edición de los parámetros de corrida, monitorear el estatus, así como para la visualización y el análisis inicial de los datos crudos generados se empleó el programa Local Run Manager de Illumina.

### **6.7.3 Análisis bioinformático.**

La calidad de los datos crudos fue evaluada con la versión 0.11.8 del programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) y los genomas fueron ensamblados de novo con el programa A5-miseq (Coil D, et al. Bioinformatics 2014). Para evaluar aspectos de calidad de los ensamblajes generados, como cantidad y longitud, se realizó un análisis con el programa Quast (v 5.0.2; Gurevich A, et al. Bioinformatics 2013). Los ensamblajes que resultaron con parámetros de calidad bajos fueron sometidos a un protocolo de limpieza previo de QC-Filtering. La anotación de los genomas fue realizada con el programa Prokka (v1.12; Seemann T. Bioinformatics 2014), que identifica genes y sus productos mediante análisis de homología en genomas de procariontas. La identificación final y mapeo de los genes que codifican para el polisacárido capsular y los factores de virulencia FbsA, FbsB, Lmb, ACP, PI-1, PI-2a, PI-2b, HvgA,  $\beta$ -H/C y ScpB de EGB se realizó por búsqueda de homologías mediante análisis de Blast con el programa BRIG (v 0.95; Alikhan, et al. BMC Genomics 2011). El conjunto de datos fue depositado en el repositorio BioProject (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject>) con el registro PRJNA551699.

## **6.8 Análisis estadístico.**

Para el análisis de los resultados se utilizaron métodos de estadística descriptiva, que en el caso de variables cuantitativas se utilizaron medianas con valores mínimos y máximos y en el caso de variables cualitativas frecuencias absolutas y porcentajes. Para el análisis inferencial de variables cualitativas la prueba de  $X^2$  o de la probabilidad exacta de Fisher y para variables cuantitativas la prueba de U de Mann-Whitney. Se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$ . Se midió además la RM con su intervalo de confianza al 95%. Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 22.0.

## VII. RESULTADOS

Se realizó un proceso de muestreo en un periodo de tiempo que constó desde enero hasta diciembre del 2018. Las muestras se tomaron como un servicio adicional a la consulta de ginecobstetricia impartida por la UMAE No.23. Hospital de Ginecología y Obstetricia del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), a una población femenina que presentaban entre 35 y 37 semanas de gestación. Se les informó de manera general la finalidad del protocolo, el proceso de muestreo y el seguimiento de las muestras positivas, las mujeres interesadas en participar en el protocolo firmaron un consentimiento informado aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica, con el número de registro R-2014-785-069.

### **7.1 Identificación de *Streptococcus agalactiae* en muestras de mujeres embarazadas.**

Se identificaron 17 muestras positivas de EGB, las cuales se observaron en el Agar Columbia (OXOID®) + 5% de sangre de carnero como colonias beta hemolíticas, con tamaños entre 2-4 mm y de color blanco-transparentes. Se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes mencionadas previamente en la metodología.

En cuanto al estudio transversal analítico y longitudinal se obtuvieron los siguientes resultados: El promedio de la edad de las mujeres colonizadas fue de 25 años, de las cuales la mayoría era menor de 30 años, sin diferencia significativa en comparación con las que no se encontraban colonizadas. Las pacientes positivas viven en un estrato socioeconómico Medio, Medio/bajo o bajo. Además de que la mayoría había tenido 2 o mas gestas previas (52.9%).

Se presentó incidencia en infección urinaria actual en la mayoría de las pacientes (47.6%) a diferencia del 23.5% que habían tenido una infección urinaria previamente y no al momento de la toma de muestra.

Se detectó también que un pequeño porcentaje (11.8%) de las pacientes presentaban obesidad y un porcentaje similar presentó diabetes gestacional.

Mediante la razón de momios se buscó una asociación entre los diversos factores predisponentes descritos anteriormente, para saber si tenían relación con la colonización de las pacientes, por lo que pudimos observar que esto no fue así ya que de acuerdo con la estadística los valores no fueron concluyentes (Tabla 1).

**Tabla 1.** Características sociodemográficas y gineco-obstétricas de 1154 mujeres embarazadas de acuerdo con el estado de colonización por *Estreptococo del grupo B (EGB)*.

	Total (n=1154)	Colonización con EGB		RM (IC95%)	p
		Sí (n=17)	No (n=1137)		
<b>Edad (años)</b>	27 (14-43)	25 (19-37)	0027 (14-43)	-	0.113
<b>Grupo etario</b>					
≤30 años	833 (73.2%)	15 (88.2%)	818 (73.0%)	2.77 (0.63-12.22)	0.125
>30 años	305 (26.8%)	02 (11.8%)	303 (27.0%)		
<b>Nivel socioeconómico</b>					
Medio-medio/bajo	0138 (12.0%)	04 (23.5%)	0134 (11.8%)	2.30 (0.74-7.16)	0.135
o bajo					
Otros	1016 (88.0%)	13 (76.5%)	1003 (88.2%)		
<b>No. de gestaciones</b>					
1	352 (30.9%)	08 (47.1%)	344 (30.6%)	2.01 (0.77-5.26)	0.118
2 o más	789 (69.1%)	09 (52.9%)	780 (69.4%)		
<b>Infección urinaria</b>					
Previa	345 (29.9%)	04 (23.5%)	341 (30.0%)	0.71 (0.23-2.21)	0.391
Actual	549 (47.6%)	08 (47.6%)	541 (47.7%)	0.76 (0.29-2.03)	0.389
<b>Comorbilidades</b>					
Obesidad	051 (4.4%)	02 (11.8%)	049 (4.3%)	2.96 (0.65-13.30)	0.171
Diabetes mellitus	021 (1.8%)	-	021 (1.8%)	-	0.730
tipo 2					
Diabetes gestacional	211 (18.3%)	02 (11.8%)	209 (18.4%)	0.59 (0.13-2.60)	0.373

Los resultados se presentan en mediana (mínimo-máximo) o frecuencia absoluta (porcentaje).

**Tabla 2.** Características clínicas y obstétricas de 17 mujeres embarazadas colonizadas por *Estreptococo del grupo B (EGB)*.

No.	SDG	Vía de parto	Tipo de parto	Asfíxia	Sero tipo	Col. en RN	Eventos infecciosos por EGB <sup>a</sup>	
							Madre	RN
18	38	Vaginal	Eutócico	No	Ib	No	No	No
73	38	Vaginal	Eutócico	No	IV	No	No	No
141	40	Vaginal	Eutócico	No	V	No	No	No
204	38	Abdominal <sup>b</sup>	FPTP	No	III	-	No	No
210	39	Abdominal	FPTP	No	III	No	No	No
414	38	Abdominal <sup>b</sup>	Iterativa	No	V	-	No	No
423	39	Abdominal	Iterativa	No	III	-	No	No
480	38	Abdominal <sup>c</sup>	Incierto	Si <sup>c</sup>	II	-	No	No
610	38	Vaginal	Eutócico	No	II	-	No	No
685	38	Vaginal	Eutócico	No	II	-	No	No
688	40	Vaginal	Eutócico	No	IV	-	No	No
725	38	Vaginal	Eutócico	No	III	-	No	No
755	38	Vaginal	Eutócico	No	IV	-	No	No
833	39	Abdominal	Incierto	No	II	No	No	No
840	38	Abdominal	Iterativa	Si	II	No	No	No <sup>d</sup>
865	39	Vaginal	Eutócico	No	IV	-	No	No
1038	39	Vaginal	Eutócico	No	Ib	-	No	No

<sup>a</sup> Eventos infecciosos por EGB en los 3 meses postparto o postnatales.

<sup>b</sup> Cesárea fuera del IMSS.

<sup>c</sup> Uso de anestesia general balanceada durante intervención quirúrgica. Apgar 6/7.

<sup>d</sup> Hospitalización por neumonía secundaria a asfixia neonatal sin microorganismo identificado, egresa a los 20 días por mejoría clínica.

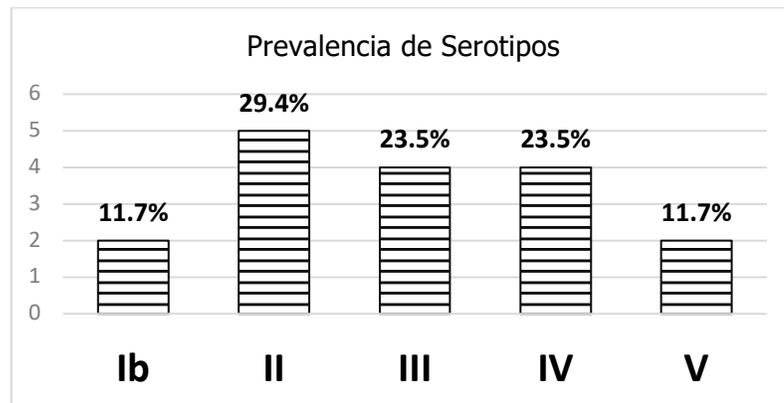
SDG: Semanas de gestación al nacimiento; Asfíxia: Asfíxia al nacimiento; RN: Recién nacido; FPTP: Falta de progresión de trabajo de parto.

El embarazo en las 17 mujeres colonizadas por EGB ya concluyó (Tabla 2). En todas ellas el parto fue de término y solo en una ocurrió ruptura prematura de las membranas de 48 horas de evolución. Diez fueron por vía vaginal y fueron eutócicos. En dos de las 17 mujeres colonizadas el parto no fue atendido en la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 23 del IMSS. De los 7 recién nacidos obtenidos por vía abdominal, las indicaciones de la cesárea fueron: cesárea iterativa (n=3), falta de progresión del trabajo de parto (n=2), y estado fetal incierto (n=2).

Fueron dos los casos en los cuales se presentó asfixia neonatal, ambos fueron obtenidos por vía abdominal, en uno de ellos se administró anestesia general balanceada durante la intervención quirúrgica y el segundo, la madre cursó con diabetes gestacional e infección cervicovaginal no tratada durante la gestación, asimismo, presentó ruptura prematura de membranas de 48 horas de evolución al término de la gestación.

## 7.2 Identificar los serotipos del EGB.

Una vez que se obtuvieron los aislados fueron identificados y purificados como EGB, las muestras fueron serotipificadas mediante el Kit de aglutinación en látex Strep B Latex (Staten Serum Institute). Los serotipos encontrados fueron; dos muestras del serotipo Ib (11.7%), cinco muestras del serotipo II (29.4%), cuatro muestras del serotipo III (23.5%), cuatro muestras del serotipo IV (23.5%) y por último dos muestras del serotipo V (11.7%). (Figura 10)

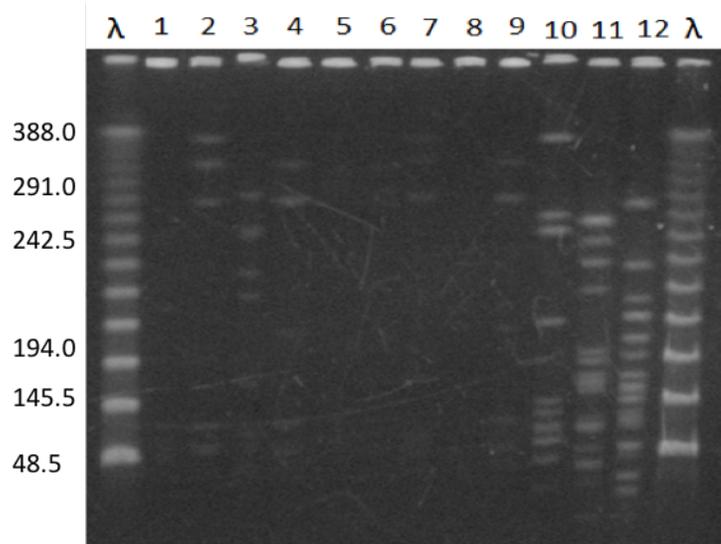


**Figura 10. Porcentajes de prevalencia de cada serotipo.** Se pueden observar los porcentajes de cada uno de los serotipos y en el eje de las Y, el número de muestras de estos.

Al realizar la serotipificación en latex para la muestra uno, se encontró que reacción de aglutinación con dos serotipo Ia y Ib, lo cual nos indicó que podría estar contaminado con dos cepas diferentes de EGB o que podría ser otro tipo de microorganismo, lo cuál se corroboró con los siguientes objetivos.

### 7.3 Evaluar la distribución y la existencia de clonas de EGB.

Para tratar a las cepas de los diferentes serotipos se utilizó una enzima de restricción, la cual nos permitió diferenciar entre los patrones de bandeo de las muestras positivas. Los aislados se corrieron por medio de una Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE), en donde las 19 muestras fueron tratadas con la enzima de restricción SmaI. Una vez corridos los geles, las bandas pudieron ser comparadas mediante los criterios de Tenover et al. (1995)



**Figura 11. Patrones de banda para las muestras positivas corridas PFGE.** Se utilizó la enzima SmaI. Corrido por 23h a 14°C, a 6.0 V/cm, utilizando un intervalo de tiempo entre pulsos de 3 a 55 s. Marcador lambda, **Carril 1**, *S. agalactiae* ATCC 12386. **Carril 2**, P1038 (serotipo Ib). **Carril 3**, PGS (serotipo Ib). **Carril 4**, P685 (serotipo II). **Carril 5**, P108 (serotipo III). **Carril 6**, P725 (serotipo III). **Carril 7**, P688 (serotipo IV). **Carril 8**, P755 (serotipo IV). **Carril 9**, P865 (serotipo IV). **Carril 10**, P414 (serotipo V). **Carril 11**, P18 (serotipo Ib). **Carril 12**, *Enterococcus faecalis*. Marcador lambda.

El gel muestra únicamente 7 muestras de 12 que se corrieron, en donde se alcanza a observar un patrón muy tenue. Los discos de agarosa con DNA de este gel se prepararon bajo las condiciones iniciales del protocolo previamente descrito (crecimiento de la bacteria en 3 ml de medio BHI, inoculando 3 colonias, adicionando 5 µl de RNAsa y 10 µl de lisozima). Para la restricción del DNA con enzima SmaI se utilizó B-mercaptoetanol.

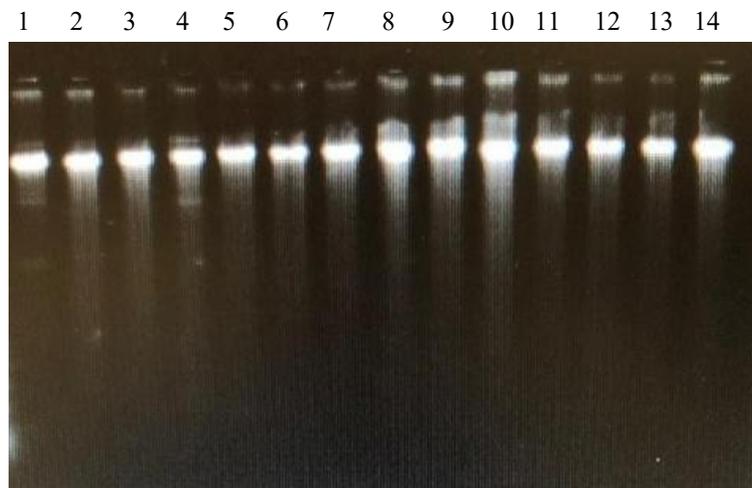
El gel se corrió con un tiempo inicial de 3 seg, tiempo final 55 seg, a 6 volts por 21 horas como lo indica su procedimiento. El marcador de peso molecular corrió correctamente (Figura 11).

Cabe señalar que la cepa No. 18 del carril 11 se procesó obteniendo un crecimiento muy pobre en los 6 ml de BHI con levadura, sin embargo, se observa un patrón de PFGE muy bueno, mientras que en el resto de las cepas se obtuvo muy buen crecimiento y no se logró buen bandeo excepto para la cepa de *Enterococcus faecalis*.

#### 7.4 Identificación de factores de virulencia de los aislados de EGB.

##### 7.4.1 Calidad y concentraciones de DNA de las muestras.

La purificación de ADNg fue realizada a partir los 17 aislados de EGB. En general, las concentraciones del ADNg de cada aislado obtenidas utilizando el nanodrop oscilaron entre 20 y 35 ng/ $\mu$ L, pero, al ser necesario hacer una cuantificación más exacta se utilizó el reactivo picogreen con el cual las concentraciones de ADNg oscilaban entre 17 y 38 ng/ $\mu$ L. Además, en la evaluación del ADNg por electroforesis en agarosa se consideró que la integridad de cada una de las muestras era la óptima, aunque para las muestras 8, 9 y 10 (Carriles 8, 9 y 10 respectivamente) se podía observar un ligero barrido en la banda (Figura 12).



**Figura 12. Corrimiento de electroforesis del DNA previamente extraído de las muestras positivas para EGB.** Se pueden observar los corrimientos de las muestras, donde el DNA se encuentra integro, excepto en las muestras 8, 9 y 10 donde se encuentra ligeramente barrida la banda. Agarosa 1% en solución TBE 1x y revelado con colorante GelRed (Biotium).

#### **7.4.2 Análisis bioinformático de los datos generados. Características de las lecturas y los ensamblados.**

En la tabla 3 se muestran los datos del análisis de calidad de los contigs procesado con los programas Quast y Prokka. El análisis del aislado No. 18 mostro 100% de identidad para *Enterococcus spp.* y para los aislados 685 y 688 no se obtuvieron lecturas de secuenciación por lo que no fue posible continuar con el protocolo de ensamblado y análisis bioinformático con éstos tres.

El número de contigs ensamblados en los aislados restantes es el ideal; en dichos datos es importante resaltar la similitud de %GC y la longitud del ensamblado para todos los aislados comparado con el %GC (35.4%) y longitud del genoma (2,081,580 pb) de *Streptococcus agalactiae* con excepción de las muestras 73, 204 y 840, donde se encontró un número de contigs bajo, además de decirnos que el ensamblado de las lecturas fue el correcto, nos facilita el manejo de los datos para su posterior análisis. En general el ensamblado resultante de cada muestra fue correcto, a pesar de que las muestras 3, 4 y 13 presentaban una gran cantidad de contigs el valor de L50 (contig en el cual se llegó al 50% del ensamblado) es bajo, lo cual podría decirnos que la mayoría de contigs poseen un tamaño muy pequeño. La anotación se realizó usando Prokka, de los datos y en la tabla 4 se reportaron la cantidad de tRNA, CDS y regiones repetidas, en donde se puede observar una mayor variación es en la cantidad de regiones repetidas, mientras que tRNA y CDS fue muy constante.

**Tabla 3.** Características de ensamblajes obtenidos mediante Quast.

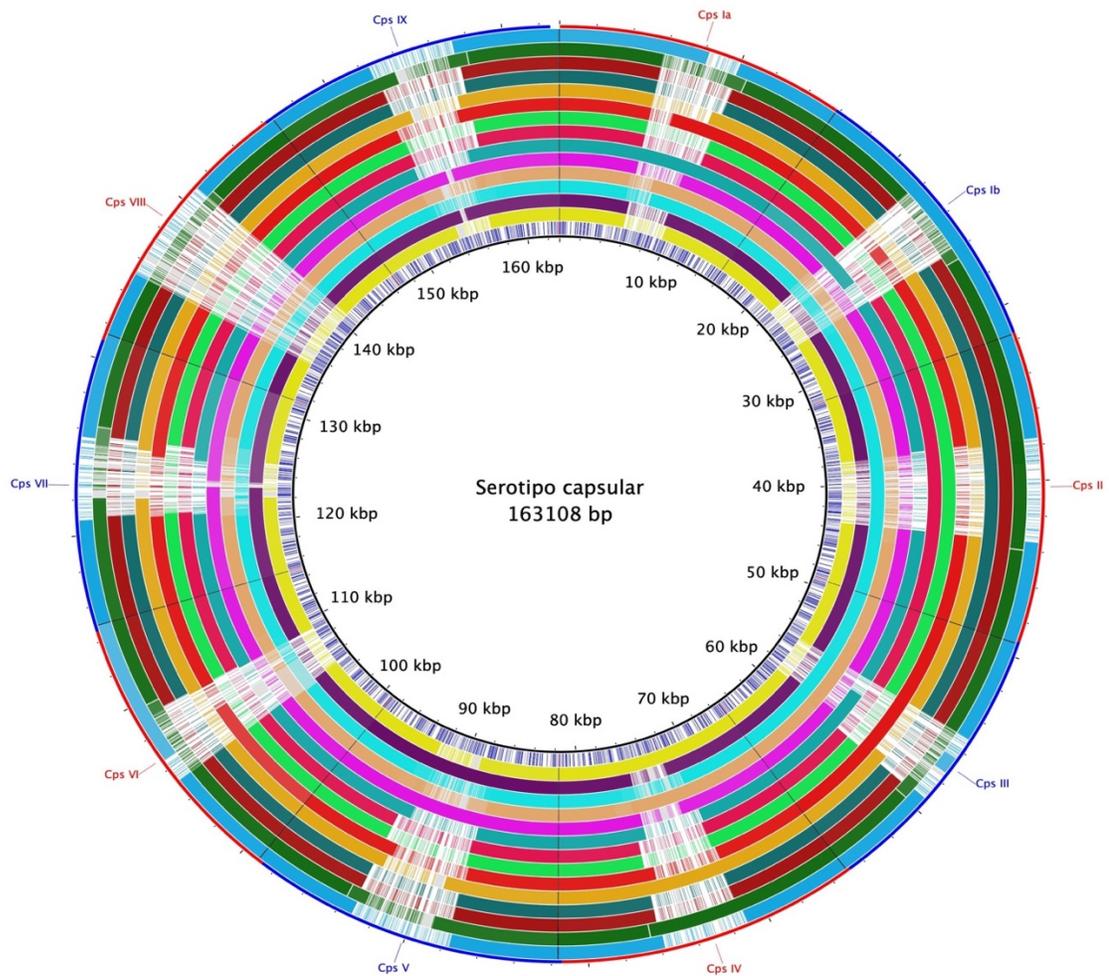
Aislado EGB	%GC	#Contigs	Contig más grande	Longitud de ensamble	N50	L50	tRNA	CDS
18	37.49	66	684,367	2,895,680	137,926	5	56	2819
73	35.33	36	324,265	2,071,209	111,611	6	47	2034
141	35.47	31	266,689	2,110,689	116,391	7	48	2077
204	35.36	219	97,087	2,442,122	47,310	18	49	2428
210	35.47	234	205,859	2,404,356	46,663	11	52	2410
414	35.43	32	195,685	2,072,152	102,521	8	48	2014
423	35.31	21	555,769	2.063188	495,889	2	46	2021
480	35.22	30	369,187	2,028,510	170,634	4	46	1981
610	35.26	24	320,640	2,102,333	193,324	5	47	2047
685	-	-	-	-	-	-	-	-
688	-	-	-	-	-	-	-	-
725	35.45	47	280,741	2,046,582	89,700	7	47	2001
755	35.34	38	284,106	2,079,007	105,094	6	47	2030
833	35.33	29	371,209	2,133,722	211,237	4	46	2080
840	35.22	30	369,187	2,028,427	170,634	4	46	1981
865	35.29	141	161,991	2,349,574	58,894	13	48	2338
1038	35.29	30	369,184	2,096,786	207,432	4	46	2043

CDS, secuencias codificantes. Quast (v 5.0.2; Gurevich A, et al. Bioinformatics 2013) y Prokka (v1.12; Seemann T. Bioinformatics 2014).

### 7.4.3 Identificación y mapeo de los genes que codifican para el polisacárido capsular de aislados de EGB.

Los aislamientos de EGB presentaron el polisacárido capsular que pertenecían a los siguientes serotipos: Ia, 1 (7.1%); Ib, 1 (7.1%); II, 4 (28.6%); III, 2 (14.3%); IV, 2 (14.3%); V, 2 (14.3%) y no tipificables, 2 (14.3%). Como se muestra en la figura 13, para los aislados 73 y 755 se identificaron regiones variables del polisacárido capsular de 2 serotipos distintos (Aislado 3 presentó el polisacárido capsular II y III, mientras que el aislado 13 presentó el polisacárido capsular II y IV). El polisacárido capsular perteneciente a los serotipos VI, VII, VIII y IX no se encontró en ninguno de los aislados.

<b>Aislado 18</b>	<b>Aislado 73</b>	<b>Aislado 141</b>	<b>Aislado 204</b>	<b>Aislado 210</b>
■ 100% Identidad				
■ 90% Identidad				
■ 70% Identidad				
<b>Aislado 414</b>	<b>Aislado 423</b>	<b>Aislado 480</b>	<b>Aislado 610</b>	<b>Aislado 725</b>
■ 100% Identidad				
■ 90% Identidad				
■ 70% Identidad				
<b>Aislado 755</b>	<b>Aislado 833</b>	<b>Aislado 840</b>	<b>Aislado 865</b>	<b>Aislado 1038</b>
■ 100% Identidad				
■ 90% Identidad				
■ 70% Identidad				



**Figura 13. Figura circular del Polisacárido Capsular** obtenida mediante alineamiento de secuencias con el programa BRIG; se muestran las identidades BLASTn del 70, 90 y 100%. (v 0.95; Alikhan, et al. BMC Genomics 2011).

#### 7.4.4 Identificación y mapeo de los factores de virulencia FbsA, FbsB, Lmb, ACP, PI-1, PI-2a, PI-2b, HvgA, $\beta$ -H/C y ScpB de aislados de EGB.

En total, 14 (100%) de los aislamientos fueron positivos para Lmb, CylE y ScpB. En cambio, se encontró PI-1, 12 (85.71%); PI-2a, 11 (78.57%); PI-2b, 5 (35.71%); FbsA, 11 (78.57%); FbsB, 6 (42.86%); bca, 10 (71.43%) y HvgA, 5 (35.71%).

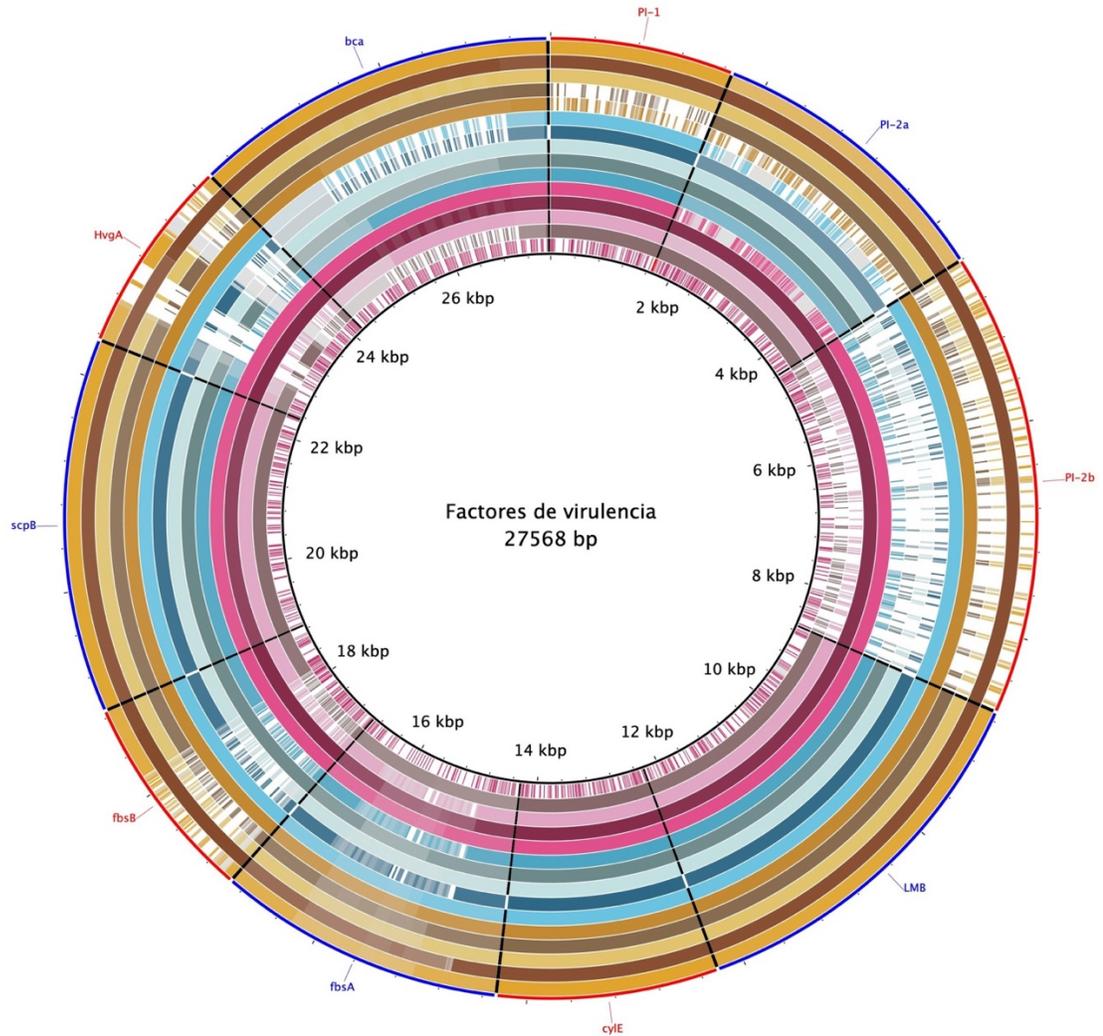
Es importante resaltar que existen 3 gen que codifican para el pili y se puede encontrar en el genoma 1 o 2 de ellos, en este caso se encontraron las siguientes combinaciones PI-1 + PI-2a, 9 (64.3%); PI-1 + PI-2b, 2 (14.3%); PI-2a, 1 (7.1%) y PI-1 + PI-2a + PI-2b, (2, 14.3%), siendo este último algo nada común (Figura 14).

Las muestras 3 y 13 poseen todos los factores de virulencia buscados, en cambio, la muestra 8 solo presento 5 factores de virulencia (PI-1, PI-2a, LMB, CylE y ScpB).

**Tabla 4.** Presencia de los factores de virulencia en cada una de las muestras positivas.

Aislado EGB	Serotipo	Factores de Virulencia									
		PI-1	PI-2a	PI-2B	Lmb	CylE	fbsA	fbsB	scpB	hvgA	bca
480	II										
610	II										
833	II										
840	II										
204	III										
210	III										
423	III										
725	III										
141	IV										
755	IV										
865	IV										
73	V										
414	V										
1038	Ib										
18	Ib	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<b>Aislado 18</b>	<b>Aislado 73</b>	<b>Aislado 141</b>	<b>Aislado 204</b>	<b>Aislado 210</b>
■ 100% Identidad				
■ 90% Identidad				
■ 70% Identidad				
<b>Aislado 414</b>	<b>Aislado 423</b>	<b>Aislado 480</b>	<b>Aislado 610</b>	<b>Aislado 725</b>
■ 100% Identidad				
■ 90% Identidad				
■ 70% Identidad				
<b>Aislado 755</b>	<b>Aislado 833</b>	<b>Aislado 840</b>	<b>Aislado 865</b>	<b>Aislado 1038</b>
■ 100% Identidad				
■ 90% Identidad				
■ 70% Identidad				



**Figura 14. Figura circular de factores de virulencia** obtenida mediante alineamiento de secuencias con el programa BRIG; Se muestran las identidades BLASTn del 70, 90 y 100% (v 0.95; Alikhan, et al. BMC Genomics 2011).

## VIII. DISCUSIÓN

A pesar de ser un microorganismo perteneciente a la microbiota normal del tracto gastrointestinal y genitourinario, el *Streptococcus agalactiae* es una de las causas más frecuentes de la infección perinatal, sepsis neonatal, pulmonía y meningitis, esto al colonizar de manera patógena, al área vaginal y/o perianal de las mujeres en estado de gestación (Dermer et al. 2004). Existen diversos factores que incrementan la posibilidad de una transmisión vertical o ascendente, de la madre al recién nacido (Palacios et al. 2009). Hasta ahora se cuenta con información internacional acerca de la prevalencia del EGB en el binomio madre-hijo, así como también se cuentan con referencias acerca de los serotipos, clonas y genomas completos de diferentes cepas ya estudiadas (Sharmila et al. 2011; Diseases 2006). Aún se desconoce parcialmente la prevalencia de la colonización tanto en mujeres como en neonatos, la diversidad de las clonas y su virulencia, así como los mecanismos de infección en los pacientes y su patogenicidad, solo se cuenta con la comparativa de estudios previamente realizados en América Latina y el centro de México (Corzo y Flores 2004; Palacios et al. 2009). Entre otros estudios, se ha dilucidado la presencia de características específicas de cada cepa de EGB, que le confiere patogenicidad, permitiendo que colonice el área vaginal de la mujer embarazada, su transmisión y su evasión al sistema inmune, las cuales se han reconocido como genes asociados a factores de virulencia que se encuentran dentro del genoma del *S. agalactiae* (Rajagopal 2009). Actualmente se cuenta con información y protocolos para la búsqueda intencional del EGB en las muestras de pacientes embarazadas y sus recién nacidos, que van desde la detección microbiológica en diferentes medios de cultivo, así como también el uso de Kits especializados en esta bacteria. Además, se cuenta con información acerca de metodologías moleculares que ayudan a la pronta detección del EGB y sus componentes patogénicos (Álvarez et al. 2014).

La importancia de conocer cuál es la prevalencia de la colonización por EGB tuvo auge desde que fue considerado como uno de los factores de riesgo para la infección perinatal en el RN, por lo que los primeros estudios fueron realizados en algunos países de Europa y en Estados Unidos (Le Doare y Heath 2013).

Entre los datos obtenidos en los primeros reportes, se indicó una prevalencia del 20% en Estados Unidos y de ahí fue se optó por seguir realizando estudios de este tipo para la búsqueda intencional del EGB en mujeres embarazadas y sus recién nacidos (Dillon et al. 1987).

Después se consideró estudiar su papel patogénico en diversas poblaciones del centro de México en donde los estudios mas recientes y significativos comenzaron en el 2000, en donde cronológicamente se observó un aumento considerable de porcentajes, comenzando con el estudio del año 2000, en donde se obtuvo un 8.6% de colonización (Ocampo et al. 2000), seguido del estudio del año 2002, en donde la colonización aumentó a un 14% (González et al. 2002). Dos años mas tarde, el porcentaje de colonización reportado fue de un 13% (Villaseñor et al. 2004) y por otro lado Pedraza reportó un 20.54% en ese mismo año (González et al. 2004). El siguiente reporte fue en el 2006, donde se obtuvo un 38.7% de colonización por parte del EGB en mujeres embarazadas, siendo esta el porcentaje mas alto registrado en los estudios de México (Hernández y Soriano 2006).

Todos estos porcentajes se han mostrado diferentes a la prevalencia de los datos obtenidos en este estudio, ya que estos indican un 1.4% de colonización, es decir 17 de 1154 pacientes muestreadas, lo cual muestra una notable disminución en cuanto presencia de esta bacteria en mujeres embarazadas, abriendo paso a mas cuestionamientos a cerca de la epidemiología de este microorganismo.

También en el resto de América Latina se han encontrado porcentajes diferentes de colonización como es el caso de Brasil, en donde se muestran estudios con diferentes tasas de colonización como 24.3%, 21.6%, 17.9% y 27.6%, las cuales entre ellas parecen ser muy similares, pero aún así diferentes a las de este estudio (Tavolaro et al. 2013; Pogere et al. 2005; Zusman et al. 2006; Nomura et al. 2006).

En África se ha registrado un porcentaje de colonización del 31.6%, en Dinamarca en un periodo de tiempo de un año y medio, recibieron 386 pacientes colonizadas por EGB.

La variación en los porcentajes presentados a lo largo del tiempo en México y en el resto del mundo, han demostrado que el EGB, puede ser considerado un microorganismo con baja-media prevalencia pero que no debe ser manejado como un problema de poca importancia en el área de salud pública, al contrario, estos números indican la importancia de la búsqueda de mayor información a cerca del *S. agalactiae*, así como también conocer cuales son sus componentes, sus variables y que es lo que permite que sea mas frecuente en algunas poblaciones a diferencia de otras (Figueroa et al. 2007).

Además de que es importante tomar en cuenta algunos factores como la edad, el estrato socioeconómico, la ubicación geográfica, la raza, los factores ambientales, la higiene, la educación y los cuidados prenatales, ya que todo esto en conjunto tiene una gran influencia en la prevalencia de la colonización por EGB (Sharmila et al. 2011). En este estudio se encontró que la edad promedio de las mujeres colonizadas fue del 25 años, sin embargo esto no se contempló como un factor de riesgo (Razón de Momios IC95%) para la incidencia de la colonización en las pacientes, al hacer la comparación con un estudio realizado en Colombia en el 2012, Ortiz y colaboradores realizaron un estudio similar en donde muestrearon mujeres adscritas al control prenatal en un hospital, de las cuales no encontraron colonización por EGB en ninguno de los recién nacidos y pero las pacientes positivas tenían un promedio de edad mayor a 31 años (Ortiz et al. 2012).

Se han realizado estudios a lo largo del mundo, para saber cual es la frecuencia de la aparición de los diferentes serotipos ya descubiertos y cuales están presentes con mayor frecuencia para saber si es posible asociarlos con la transmisión y/o la infección perinatal, por lo que en 2013, se describió que en EUA y Europa, los serotipos que eran con mayor predominio eran el Ia, Ib, II, III y V (Le Doare y Heath 2013), mientras que estudios en África indican que los serotipos mas comunes son el Ia (28.1%), V (27.1%) y III (21.9%) (Vinnemeier et al. 2015).

Por otro lado, en una revisión mundial reportaron que el serotipo que era identificado frecuentemente era el III, seguido de los serotipos Ia (22.9%), V (9.1%), Ib (7.0%) y I (6.2%) (CID 2012).

En un análisis mundial, de donde se tomaron 6500 reportes, se pudo concluir que los serotipos mas frecuentes eran el III con 3951 casos (61.5%) y el Ia con 1249 casos (19.1%) (Madrid et al. 2017).

Después de ver estas cifras, es importante compararlas con los últimos reportes en donde se indica la frecuencia de los serotipos en México, ya que 2004, en donde a partir de 286 muestras positivas a EGB se pudo dilucidar que los serotipos más comunes eran I (48.6%), III (32.9%) y II (14%) (Palacios et al. 2005).

Al comparar estos resultados, especialmente los que pertenecen a México, el serotipo II se encuentra en segundo lugar de frecuencia (4 casos, 23.5%), al igual que el serotipo IV, de tal manera que el serotipo más frecuente es el II con 5 casos (29.4%). Como se puede observar, el serotipo II no es tan prevalente en otros estudios a comparación de este, lo cual podría indicar una variación en cuanto a la distribución de estos, pero hay que tomar en cuenta también el tamaño de la población muestreada.

En este estudio, se presentaron dos casos en donde las pacientes, por medio de la serotipificación con partículas de latex, se encontraban colonizadas por los serotipos III y IV respectivamente, pero al momento de utilizar la secuenciación para la búsqueda de uno de los factores de virulencia como lo es el polisacárido capsular, se demostró que ambas pacientes, además de estar colonizadas con el serotipo previamente mencionado, también mostraban la coexistencia del serotipo II.

En comparación con un estudio del 2003 se encontró que de 441 mujeres embarazadas, 71 se encontraban colonizadas (16%) y en dos muestras específicamente, se logró identificar dos diferentes serotipos en la misma paciente, en una de ellas se aisló el serotipo VIII a las 20 semanas de gestación y el serotipo III a las 30 semanas de gestación (Ekelund et al. 2003).

Tres factores de virulencia fueron identificados en todos los aislados de EGB. El *lmb*, que codifica para una proteína de unión a laminina y es responsable de la adherencia a la célula del huésped; el *ScpB* (C5a peptidasa) que es responsable de escindir el factor de complemento C5a y que se ha reportado separado del *lmb* por una región intergénica de aproximadamente 200 pb y, finalmente, el gen *CylE* que codifica para la toxina  $\beta$ -hemolisina / citolisina asociada a la superficie celular (Al Safadi et al., 2010; Nizet 2002; Rajagopal 2009). Estos genes son comúnmente reportados e incluso han sido utilizados como control durante la detección de factores de virulencia (Rosenau et al. 2007).

Un estudio reportó la presencia de los genes *lmb* y *ScpB* en un total de 139 muestras analizadas y otro más encontró la presencia del gen *CylE* en 83 muestras positivas para EGB ((Udo y Boswihi 2013; Otaguiri et al. 2013).

Por otro lado, se encontró también el gen *HvgA*, que codifica para una adhesina de hipervirulencia, en 5 aislados (29.4%). Esto es comparable con la literatura ya que en un estudio donde se analizaron 965 muestras de EGB, solamente 321, es decir el 33.29% tenían el gen para *HvgA* en su secuencia. Aunque también hay reportes en donde se menciona un menor porcentaje de muestras positivas que presentan este gen, tal es el caso de Teatero y colaboradores, quienes en el 2014 encontraron un porcentaje menor, reportaron 91 (15.1%) muestras positivas a *HvgA* de 600 muestras de EGB, pero en comparación con este resultado, Tibussek y colaboradores en el 2015 reportaron la presencia del gen en 5 (55.6%) de 9 muestras de positivas.

## IX. CONCLUSIONES

En una muestra de 1154 pacientes embarazadas entre las 35 y 37 semanas de gestación, se encontraron 17 pacientes colonizadas por EGB, lo que equivale a una prevalencia de colonización del 1.47% y colonización neonatal de 0%.

Las mujeres embarazadas en Nuevo León poseen una baja colonización por EGB en nuestro muestreo. Colonización materna por EGB de 1.4%.

No hubo casos de transmisión materno-infantil.

Los serotipos identificados en nuestro estudio fueron Ib, II, III, IV y V. que aunque considerados como causantes de enfermedades en el recién nacido, no hubo casos de enfermedad neonatal.

Se identificaron los genes codificantes para factores de virulencia PI-1, PI-2A, PI-2B, Lmb, CylE, fbsA, fbsB, scpB, hvgA, y bca.

Estos datos sugieren que la búsqueda intencionada de colonización por EGB no está justificada en esta población y que la indicación de PAI puede ser guiada por factores de riesgo.

## **X. PERSPECTIVAS**

Buscar un porcentaje de transmisión vertical del EGB, así como también observar cuales son los serotipos que son responsables de este suceso y hacer la identificación de los factores de virulencia.

Llegar a un resultado positivo puede tomar alrededor de una semana, además que hay que tomar en cuenta el costo del material utilizado y las manos necesarias para finalizar la identificación de cada muestra, por lo que es importante buscar métodos que faciliten y agilicen el aislamiento de las muestras positivas, esto puede ser con el uso de agares específicos y pruebas bioquímicas mas sensibles tales como el agar cromogénico especial para Estreptococos, Kits como el Strep B Carrot o Agares adicionados con antibióticos que inhiban el crecimiento de otras bacterias que pudieran opacar el crecimiento de EGB.

Dar a conocer que tan necesaria es la profilaxis antimicrobiana intraparto en esta población y si no es así, tener el conocimiento de los factores de riesgo que están involucrados para este procedimiento.

## XI. BIBLIOGRAFIA

- Altaie SS, Dryja D. 1994. Detection of group B Streptococcus. Comparison of solid and liquid culture media with and without selective antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 18:141-4.
- Alvarez A, Toraño G, Llanes R. 2014. Colonización vaginal/rectal por *Streptococcus agalactiae* en gestantes de Melena del Sur, Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 66(3), 415–423.
- Baker JA, Lewis EL, Byland LM, Bonakdar M, Randis TM, Ratner AJ. 2017. Mucosal vaccination promotes clearance of *Streptococcus agalactiae* vaginal colonization. *Vaccine*, 35(9), 1273–1280.
- Bergseng H, Rygg M, Bevanger L, Bergh K. 2008. Invasive group B streptococcus (GBS) disease in Norway 1996-2006. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 27(12), 1193-1199.
- Berti F, Campisi E, Toniolo C, Morelli L, Crotti S, Rosini R, Margarit I. 2014. Structure of the type IX group B Streptococcus capsular polysaccharide and its evolutionary relationship with types V and VII. *J Biol Chem*, 289(34), 23437-23448.
- Blanco JD, Gibbs RS. 1980. Infections following classical cesarean section. *Obstet Gynecol*, 55, 167-169.
- Bliss SJ, Manning SD, Tallman P, Baker CJ, Pearlman MD, Marrs CF, Foxman B. 2002. Group B streptococcus colonization in male and nonpregnant female university students: a cross-sectional prevalence study. *Clinical Infectious Diseases*, 34(2), 184-190.
- Bosch J, Martín RM, Jiménez MT. 2003. Estudio comparativo de tres medios de cultivo para detectar la colonización por estreptococo del grupo B en la mujer embarazada. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(7), 346–349.
- Boyer KM, Gotoff SP. 1985. Strategies for chemoprophylaxis of GBS early-onset infection. *Antibiot Chemother*, 35, 567-280.
- Brizuela M. 2007. *Estreptococo agalactiae* Grupo B (EGB). Patógeno emergente de infección grave en neonatos y niños. *Revista Bioanálisis*, 8–10.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2010. CDC. Obtenido de CDC: <http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/gbs09.pdf>
- Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. *MMWR* 2002; 51 (No. RR-11): 1-22.
- Cieslewicz MJ, Chaffin D, Glusman G, Kasper D, Madan A, Rodrigues S, Rubens CE. 2005. Structural and Genetic Diversity of Group B Streptococcus Capsular Polysaccharides. *Infect. Immun.*, 73(5), 3096-3103
- Dagnew AF, Cunningham MC, Dube Q, Edwards MS, French N, Heyderman RS, Clemens SA. 2012. Variation in reported neonatal group B streptococcal disease incidence in developing countries. *Clin Infect Dis*, 55(1), 91-102.
- Collado LM, Kretschmer RR, Becker I, Guzmán A, Gallardo L, Lepe CM. 1981. Colonization of Mexican pregnant women with group B Streptococcus. *J Infect Dis*, 143(1), 134.

- González AA, Ortiz MC, Madrigal HG, Corzo MT, Flores P. 2004. Colonización por *Streptococcus* grupo B en mujeres de un centro de atención primaria de la ciudad de México. *Arch Med Fam*, 6, 44-47.
- Cowgill K, Taylor TH, Schuchat A, Schrag S. 2004. Report from the CDC. Awareness of perinatal Group B *Streptococcal* infection among women of childbearing age in the United States, 1999 and 2002. *Journal of Women's Health*, 12(6), 527-532.
- Cruz OM, Doren VA, Tapia JL, Abarzúa CF. 2008. Sepsis neonatal por *Streptococcus* Grupo B. *Rev Chil Pediatr*, 79(5), 462-470.
- Dagnew AF, Cunnington MC, Dube Q, Edwards MS, French N, Heyderman RS, Clemens SA. 2012. Variation in reported neonatal group B streptococcal disease incidence in developing countries. *Clin Infect Dis*, 55(1), 91-102.
- 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*, 19(5), 357-363.
- Diedrick MJ, Flores AE, Hillier SL, Creti R, Ferrieri P. 2010. Clonal analysis of colonizing group B *Streptococcus*, serotype IV, an emerging pathogen in the United States. *J Clin Microbiol*, 48(9), 3100-3104.
- Domelier AS, Van der Mee N, Arnault L, Mereghetti L, Lanotte P, Rosenau A, Quentin R. 2008. Molecular characterization of erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(6), 1227-1233.
- Edmond KM, Kortsalioudaki C, Scott S, Schraq SJ, Zaidi AK, Cousens S, Heath PT. 2012. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 379(9815), 547-546.
- Edwards MS, Baker CJ. 2005. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clinical Infectious Diseases*, 41(6), 839-847.
- Edwards MS, Nizet W. 2011. Group B streptococcal infections. (7a ed.). (J. Remington, J. Klein, & C. Wilson, Eds.) Philadelphia, PA: Saunders.
- Edwards MS, Kasper DL, Jennings HJ, Baker CJ, Nicholson W. 1982. Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B streptococci. *J. Immunol*, 128, 1278-1283.
- Eickhoff TC, Klein JO, Daly AK, Ingall D, Finland M. 1964. Neonatal sepsis and other infections due to group B beta-hemolytic streptococci. *New England Journal of Medicine*, 10(271), 1221-1228.
- Ekelund K, Slotved HC, Nielsen HU, Kaltoft MS, Konradsen HB. 2003. Emergence of invasive serotype VIII group B streptococcal infections in Denmark. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4442-4444
- Emmons SL, Krohn M, Jackson M, Eschenbach DA. 1988. Development of wound infections among women undergoing cesarean section. *Obstet Gynecol*, 72, 559-564.
- Kong F, Gowan S, Martin D, James G Gilbert G. 2002. Serotype identification of group B streptococci by PCR and sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1), 216-226.
- Ferrieri P, Lynfield R, Creti R, Flores AE. 2013. Serotype IV and invasive group B *Streptococcus* disease in neonates, Minnesota, USA, 2000-2010. *Emerg Infect*, 19(4), 551-558.

- Figuerola JR, Ibarra FJ, Jaramillo AE, Román GC. 2007. Colonización materna por *Streptococcus* del grupo B en México: Estimación de la prevalencia basada en la revisión bibliográfica. *Ginecología y Obstetricia de México*, 75(7), 399–403.
- Flores AR, Galloway J, Sahasrabhojane P, Saldaña M, Yao H, Su X, Shelburne SA. 2015. Sequence type 1 group B *Streptococcus*, an emerging cause of invasive disease in adults, evolves by small genetic changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(20), 6431–6436.
- Florindo C, Damiao V, Silvestre I, Farinha C, Rodrigues F, Nogueira F. Group for the Prevention of Neonatal GBS Infection. 2014. Epidemiological surveillance of colonizing group B *Streptococcus* epidemiology in the Lisbon and Tagus Valley regions, Portugal (2005 to 2012): emergence of a new epidemic type IV/clonal complex 17 clone. *Euro Surveill*, 19
- Fry RM. 1938. Fatal infections by hemolytic streptococcus group B. *Lancet*, 1, 199–201.
- Gibbs RS, Schrag S, Schuchat A. 2004. Perinatal Infections Due to Group B *Streptococci*. *Obstetrics & Gynecology*, 104 (5, Part 1), 1062–1076.
- Glaser P, Rusniok C, Buchrieser C, Chevalier F, Frangeul L, Msadek T, Kunst F. 2002. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease, 45, 1499–1513.
- González AA, Ortiz MC, Madrigal HG, Corzo MT, Flores P. 2004. Colonización por *Streptococcus* grupo B en mujeres de un centro de atención primaria de la ciudad de México. *Arch Med Fam*, 6, 44–47.
- Gupta C, Briski LE. 2004. Comparison of two culture media and three sampling techniques for sensitive and rapid screening of vaginal colonization by group B *Streptococcus* in pregnant women. *J Clin Microbiol.*;42:3975–7.
- Hansen SM, Uldbjerg N, Kilian M, Sørensen UB. 2004. Dynamics of *Streptococcus agalactiae* Colonization in Women during and after Pregnancy and in Their Infants. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), 83–89.
- Hernandez M. 2006. High prevalence of group B *Streptococcus* colonization in Mexican pregnant women Artículo original Elevada prevalencia de colonización por *Streptococcus* del grupo B en mujeres mexicanas embarazadas. *Ginecología y Obstetricia de México*, (May).
- Hickman ME, Rench MA, Ferrieri P, Baker CJ. 1999. Changing epidemiology of group B streptococcal colonization. *Pediatrics*, 104(2 Pt 1), 203–209.
- Jiang SM, Cieslewicz MJ, Kasper DL, Wessels MR. 2005. Regulation of virulence by a two-component system in group B streptococcus. *J Bacteriol*, 187(3), 1105–1113.
- Joubrel C, Tazi A, Six A, Dmytruk N, Touak G, Bidet P, Kernéis S. 2015. Group B streptococcus neonatal invasive infections, France 2007–2012. *Clin Microbiol Infect*, 21(10), 910–916.
- Kapatai G, Patel D, Efstratiou A, Chalker VJ. 2017. Comparison of molecular serotyping approaches of *Streptococcus agalactiae* from genomic sequences. *BMC Genomics*, 18(429), 1–11.
- Kim KS, Kang JH, Cross AS. 1986. The role of capsular antigens in serum resistance and in vivo virulence of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett*, 35, 275–278.

- Lachenauer CS, Kasper DL, Shimada J, Ichiman Y, Ohtsuka H, Kaku M, Madoff LC. 1999. Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. *J Infect Dis*, 179(4), 1030-1033.
- Lancefield BR. 1932. A SEROLOGICAL DIFFERENTIATION OF HUMAN AND (From the Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research). 1919(1), 571–595.
- Larsen JW, Sever JL. 2008. Group B streptococcus and pregnancy: a review. *Am J ObstetGynecol*, 440-448.
- Le Doare K, Heath TP. 2013. An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine*, 31(Supplement 4: S4), D7-D12.
- Libster R, Edwards KM, Levente F, Edwards MS, Rench MA, Castagnini LA, Shah PE. 2012. Long-term outcomes of group B streptococcal meningitis. *Pediatrics*, 130(1), e8-15.
- Lindahl G, Stålhammar M, Areschoug T. 2005. Surface Proteins of *Streptococcus agalactiae* and Related Proteins in Other Bacterial Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(1), 102–127.
- Madrid L, Seale AC, Kohli M, Edmond KM, Lawn JE, Heath PT, Schrag S. 2017. Infant Group B Streptococcal Disease Incidence and Serotypes Worldwide: Systematic Review and. *Clinical Infectious Diseases*, 65(Suppl 2), S160–S172.
- Manning, S. D., Springman, A. C., Lehotzky, E., Lewis, M., Whittam TS, Davies HD. 2009. Multilocus Sequence Types Associated with Neonatal Group B Streptococcal Sepsis and Meningitis in Canada. *J Clin Microbiol*, 47(4), 1143-1148.
- Martins ER, Andreu A, Melo J, Ramirez M. 2013. Distribution of pilus islands in *Streptococcus agalactiae* that cause human infections: Insights into evolution and implication for vaccine development. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(2), 313–316.
- Mavenyengwa RT, Maeland JA, Moyo SR. 2008. Distinctive features of surface-anchored proteins of *streptococcus agalactiae* strains from Zimbabwe revealed by PCR and dot blotting. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(9), 1420–1424.
- Musser JM, Mattingly SJ, Quentin R, Goudeau A, Selander RK. 1989. Identification of a high-virulence clone of type III *Streptococcus agalactiae* (group B Streptococcus) causing invasive neonatal disease. *Proc Natl Acad Sci USA*; 86, 4731-4735.
- Meehan M, Cunney R, Cafferkey M. 2014. Molecular epidemiology of group B streptococci in Ireland reveals a diverse population with evidence of capsular switching. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 33(7), 1155-1162.
- Melin P, Efstratiou A. 2013. Group B streptococcal epidemiology and vaccine needs in developed countries. *Vaccine*, Suppl 4: D31-42.
- Moyo SR, Maeland JA, Bergh K. 2002. Typing of human isolates of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus, GBS) strains from Zimbabwe. *Journal of Medical Microbiology*, 51(7), 595–600.
- Nizet V. 2002. Streptococcal  $\beta$ -hemolysins: Genetics and role in disease pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 10(12), 575–580.

- Otaguiri ES, Belotto AE, Tavares ER, Capela PM, Morey AT, Donizete J, Yamada SF. 2013. Commensal *Streptococcus agalactiae* isolated from patients seen at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil: capsular types, genotyping, antimicrobial susceptibility and virulence determinants. BioMed Central.
- Ocampo M, Sánchez HJ, Nazar A, Castro AE, Cordero B. 2000. Factors associated with Streptococcus group B colonization in pregnant women in Los Altos, Chiapas. Salud Publica Mex, 413-421.
- Ortiz MP, Giraldo EA, Chacón LM, Jaramillo MH. 2012. Colonización por *Streptococcus agalactiae* en mujeres gestantes de los centros de atención de la ESE Norte en Cali. Ciencia & Salud, 1(2), 23-31.
- Padilla B, Delgado S, García F, Rodríguez JM, Romero B. 2016. Microbiological diagnosis of bacterial infection associated with delivery and postpartum. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 34(5), 309-314.
- Palacios G, Eskew EK, Solorzano F, Mattingly SJ. 1997. Decreased Capacity for Type-Specific-Antigen Synthesis Accounts for High Prevalence of Nontypeable Strains of Group B Streptococci in Mexico. Journal of Clinical Microbiology, 35(11), 2923-2926.
- Palacios GC, Eskew EK, Solorzano F, Mattingly SJ. 1999. Identification of the high-virulence clone of group B streptococci in Mexican isolates by growth characteristics at 40°C. Current Microbiology, 38(2), 126-131.
- Palacios GC, Caltenco R, Torres J, Tapia R, Muñoz O, Solórzano F. 2002. Exposición a Estreptococo del grupo B en mujeres mexicanas en edad reproductiva. Salud Pública de México, 44, 50-56.
- Palacios GC, González MN, Beltrán M, Arredondo JL, Torres J, Solórzano F. 2005. Serotypes of 286 group B streptococci isolated from asymptomatic carriers and invasive disease cases in Mexico. Revista Latinoamericana de Microbiología, 47(1-2), 21-24.
- Palacios GC, González MN, Beltran M, Arredondo JL, Torres J, Solórzano F. 2007. High-Virulence Clone of Group B Streptococci Unable to Grow at High Temperatures Is Present in Serotypes Other Than Type III. Current Microbiology, 54, 42-47.
- Palacios GC. 2009. Neumonía por Estreptococo del grupo B. En F. J. Ávila-Cortés, Infecciones Respiratorias en Pediatría (págs. 352-358). México: McGraw-Hill Interamericana.
- Palacios GC, Hernández TI, Rivera LG, Briones E, Caballero A, Vazquez JM, Rodríguez C. 2017. Infección perinatal por estreptococo del grupo B : panorama global , en América Latina y en México. Gaceta Medica de México, 153, 361-370.
- Palmeiro JK, Dalla LM, Fracalanza SE, Botelho AC, Nogueira K, Scheffer MC, Madeira HM. 2010. Phenotypic and genotypic characterization of group B streptococcal isolates in Southern Brazil. Journal of Clinical Microbiology, 48(12), 4397-4403.
- Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle J, Harrison LH, Craig AS, Schrag SJ. 2008. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. JAMA, 299(17), 2056-2065.

- Pritzlaff CA, Chang JC, Kuo SP, Tamjura GS, Rubens CE, Nizet V. 2001. Genetic basis for the beta-haemolytic/cytolytic activity of group B Streptococcus. *Mol Microbiol*, 39(2), 236-247.
- Rajagopal L. 2009. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. *Future Microbiology*, 4(2), 201–221.
- Randis TM, Gelber SE, Hooven TA, Abellar RG, Akabas LH, Lewis EL, Ratner AJ. 2014. Group B Streptococcus  $\beta$ -hemolysin/cytolysin breaches maternal-fetal barriers to cause preterm birth and intrauterine fetal demise in vivo. *J Infect Dis*, 210(2), 265-273.
- Reyna J, Ortíz FJ, Esteves A, Casanova G. 2007. Colonización materna por Streptococcus del grupo B en México: estimación de la prevalencia basada en la revisión bibliográfica. *Revista Mexicana de Ginecología y Obstetricia*, 75(7), 399–403.
- Roberts S, Maccato M, Faro S, Pinell P. 1993. The microbiology of post-cesarean wound morbidity. *Obstet Gynecol*, 81(3), 383-386.
- Romero R, Dey SK, Fisher SJ. 2014. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science*, 345(6198), 760-765.
- Rosenau A, Martins K, Amor S, Gannier F, Lanotte P, Mee N, Quentin R. 2007. Evaluation of the Ability of *Streptococcus agalactiae* Strains Isolated from Genital and Neonatal Specimens to Bind to Human Fibrinogen and Correlation with Characteristics of the FbsA and FbsB Genes □. *Infection and Immunity*, 75(3), 1310–1317.
- Schrag SJ, Zywicki S, Farley MM, Reingold AL, Harrison LH, Lefkowitz LB, Schuchat A. 2000. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med*, 342(1), 15-20.
- Schuchat A. 1999. Group B streptococcus. *The Lancet Infectious Diseases*, 353, 51–56.
- Seale AC, Koech AC, Sheppard AE, Barsosio HC, Langat J, Anyango E, Berkley JA. 2016. Maternal colonization with *Streptococcus agalactiae* and associated stillbirth and neonatal disease in coastal Kenya. *Nature Microbiology*, 1(7), 1–10.
- Al R, Souheila A, Hery G, Spellerberg B, Lanotte P, Mereghetti L. 2010. Enhanced Expression of lmb Gene Encoding Laminin- Binding Protein in *Streptococcus agalactiae* Strains Harboring IS1548 in ScpB-lmb Intergenic Region, 5(5).
- Slotved HC, Kong F, Lambertsen L, Sauer S, Gilbert GL. 2007. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2929–2936.
- Sólorzano F, Díaz RD, Arredondo JL. 1990. Diseases caused by group B Streptococcus in Mexico. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 9(1), 66.
- Sólorzano F, Echaniz G, Conde CJ, Calderon E, Arredondo JL, Beltran M. 1989. Cervicovaginal Infection with Group B Streptococci Among Pregnant Mexican Women. *The Journal of Infectious Diseases*, 159(5), 1003-1004.
- Sperling RS, Newton E, Gibbs RS. 1988. Intra-amniotic infection in low birth-weight infants. *J Infect Dis*, 157, 113-117.
- Stevens DL, Kaplan EL. 2000. Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis (1era ed.). Oxford University Press.

- Stoll BJ, Schuchat A. 1998. Maternal carriage of group B streptococci in developing countries. *Pediatr Infect Dis J*, 17, 499-503.
- Tazi A, Disson O, Bellais S, Bouaboud A, Dmytruk N, Dramsi S, Poyart C. 2010. The surface protein HvgA mediates group B streptococcus hypervirulence and meningeal tropism in neonates. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(11), 2313–2322.
- Teatero S, McGeer A, Low ED, Li A, Demczuk W, Martin I, Fittipaldi N. 2014. Characterization of Invasive Group B Streptococcus Strains from the Greater Toronto Area, Canada. *J. Clin. Microbiol*, 52(5).
- Teatero S, McGeer A, Li A, Gomes J, Seah C, Demczuk W, Fittipaldi N. 2015. Population Structure and Antimicrobial Resistance of Invasive Serotype IV Group B Streptococcus, Toronto, Ontario, Canada. *Emerg Infect Dis*, 21(4), 585-591.
- Tenenbaum T, Spellerberg B, Vogel M, Sik K, Schroten H. 2007. *Streptococcus agalactiae* invasion of human brain microvascular endothelial cells is promoted by the laminin-binding protein Lmb, 9, 714–720.
- Udo EE, Boswihi SS, Al N. 2013. Genotypes and Virulence Genes in Group B Streptococcus Isolated in the Maternity Hospital, Kuwait. *Kargen*, 22, 453–457.
- Verani JR, McGee L, Schrag SJ. 2010. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease: Revised Guidelines from CDC. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 59(RR10), 1-32.
- Viegas J, Larre S, Lopreto C. 2004. Detección y caracterización de *Streptococcus agalactiae* en muestras para urocultivo. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 38(4), 459–463.
- Villaseñor A, Morales P, Palacios G, Solórzano F. 2004. Prevalencia de *Streptococcus agalactiae* del serotipo III. *Revista Ginecología y Obstetricia de México*, 72(3), 103-108. Obtenido de
- Vinnemeier CD, Brust P, Owusu E, Sarpong N, Sarfo EY, Bio Y, Cramer JP. 2015. Group B Streptococci serotype distribution in pregnant women in Ghana: assessment of potential coverage through future vaccines. *Tropical Medicine and International Health*, 20(11), 1516–1524.
- Vornhagen J, Waldorf KM, Rajagopal L. 2017. Perinatal Group B Streptococcal Infections: Virulence Factors, Immunity, and Prevention Strategies. *Trends in Microbiology*, 25(11), 919-931.
- Whidbey C, Harrell MI, Burnside K, Ngo L, Becraft AK, Lyer LM, Rajagopal L. 2013. A hemolytic pigment of Group B Streptococcus allows bacterial penetration of human placenta. *J Exp Med*, 210(6), 1265-1281.
- Yancey MK, Schuchat A, Brown LK, Ventura VL, Markenson GR. 1996. The accuracy of late antenatal screening cultures in predicting genital group B streptococcal colonization at delivery. *Obstet Gynecol*, 88(5), 811-815.

## XII. RESUMEN BIOGRÁFICO

Q.F.B Melissa Carolina Mellado Garcia

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS A VIRULENCIA, SEROTIPIFICACIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA DE *Streptococcus agalactiae* EN MUJERES EMBARAZADAS EN UN HOSPITAL DEL TERCER NIVEL DE ATENCIÓN.

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en Saltillo, Coahuila el 27 de mayo de 1994, hija de Beatriz Garcia Orta y Cesar Mellado Siller.

Educación: Egresada de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, grado obtenido de Químico Farmacobiologo en 2017.

Experiencia profesional:

Química Laboratorista de laboratorio del Hospital Universitario de Coahuila.

Química Suplente del laboratorio clínico del ISSSTE.

Docencia a nivel bachillerato en el Instituto del Centro de México

Capacitación y estancia en el Laboratorio de Resistencia bacteriana del Instituto Nacional de Salud Pública en el procedimiento de Electroforesis en Gel de Campos pulsados.

### XIII. ANEXOS

#### Anexo 1

Instituto Mexicano del Seguro Social  
UMAE Hospital de Ginec Obstetricia No. 23

**FORMATO DE RECOLECCION DE DATOS**

**Título del proyecto de investigación:** "Epidemiología clínica y molecular de la infección perinatal por Estreptococo grupo B en una unidad médica de tercer nivel de atención del noreste de México"

**Datos de la mujer embarazada:**  
 Nombre: Apellido Paterno \_\_\_\_\_ Apellido Materno \_\_\_\_\_ Nombres (s) \_\_\_\_\_  
 Edad: \_\_\_\_\_ años Afiliación: \_\_\_\_\_  
 Dirección: Calle y No. \_\_\_\_\_ Colonia \_\_\_\_\_  
 Municipio \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_  
 Teléfono: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_  
 Lugar de nacimiento de los abuelos: Municipio \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_

**Estrato socio-económico:** Escala de Graffar-Méndez Castellano

Variables	Puntaje	Items
1.- Profesión del Jefe de Familia	1	Profesión Universitaria, financistas, banqueros, comerciantes, todos de alta productividad, Oficiales de las Fuerzas Armadas (si tienen un rango de Educación Superior)
	2	Profesión Técnica Superior, medianos comerciantes o productores
	3	Empleados sin profesión universitaria, con técnica media, pequeños comerciantes o productores
	4	Obreros especializados y parte de los trabajadores del sector informal (con primaria completa)
	5	Obreros no especializados y otra parte del sector informal de la economía (sin primaria completa)
2.- Nivel de instrucción de la madre	1	Enseñanza Universitaria o su equivalente
	2	Técnica Superior completa, enseñanza secundaria completa, técnica media.
	3	Enseñanza secundaria incompleta, técnica inferior
	4	Enseñanza primaria, o alfabeta (con algún grado de instrucción primaria)
	5	Analfabeta
3.- Principal fuente de ingreso de la familia	1	Fortuna heredada o adquirida
	2	Ganancias o beneficios, honorarios profesionales
	3	Sueldo mensual
	4	Salario semanal, por día, entrada a destajo
	5	Donaciones de origen público o privado
4.- Condiciones de alojamiento	1	Vivienda con óptimas condiciones sanitarias en ambientes de gran lujo
	2	Viviendas con óptimas condiciones sanitarias en ambientes con lujo sin exceso y suficientes espacios
	3	Viviendas con buenas condiciones sanitarias en espacios reducidos o no, pero siempre menores que en las viviendas 1 y 2
	4	Viviendas con ambientes espaciosos o reducidos y/o con deficiencias en algunas condiciones sanitarias
	5	Rancho o vivienda con condiciones sanitarias marcadamente inadecuadas

Estrato	Total de Puntaje Obtenido
Estrato I	4,5,6
Estrato II	7,8,9
Estrato III	10,11,12
Estrato IV	13,14,15,16
Estrato V	17,18,19,20

**Seleccione el resultado: Puntaje:** \_\_\_\_\_

Estrato I Alto (4-6)	Estrato IV Pobreza relativa (13-16)
Estrato II Medio alto (7-9)	Estrato V Pobreza crítica (17-20).
Estrato III Medio medio y medio bajo (10-12)	

**Antecedentes ginecobstétricos:**  
 G \_\_ P \_\_ C \_\_ A \_\_  
 Corioamniionitis previa: Si ( ) No ( )  
 Infecciones de vías urinarias previas: Si ( ) No ( ) ¿Cuántas por EGB? \_\_\_\_\_  
 Infección por EGB en productos previos: Si ( ) No ( ) ¿Cuántos hijos con infección por EGB? \_\_\_\_\_

**Datos ginecobstétricos actuales:**  
 Corioamniionitis actual: Si ( ) No ( )  
 Infección de vías urinarias actual: Si ( ) No ( ) ¿Por EGB? Si ( ) No ( ) Se desconoce ( )

Fiebre: Si ( ) No ( ) Grados: \_\_\_\_\_  
 Ruptura prematura de membranas: Si ( ) No ( ) Tiempo de ruptura de membranas: \_\_\_\_\_ horas  
 Vía de nacimiento: vaginal ( ) abdominal ( )  
 Tipo de parto: distócico o eutócico Parto pre-término: Si ( ) No ( )  
 Diabetes tipo 2: Si ( ) No ( ) Diabetes gestacional: Si ( ) No ( )  
 Obesidad: Si ( ) No ( ) IMC: \_\_\_\_\_ kg/m<sup>2</sup>  
 Glucosa: \_\_\_\_\_ mg/dl  
 Hemoglobina: \_\_\_\_\_ %  
 Triglicéridos: \_\_\_\_\_ mg/dl  
 HDL: \_\_\_\_\_ mg/dl  
 Presión arterial: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ mm/Hg

**Datos sobre factores genéticos:**

Antecedentes en los progenitores de: Diabetes tipo 2 / Obesidad / Hipertensión Arterial ¿En quién? Madre / Padre / Ambos  
 Edad de los progenitores al momento del inicio: Madre: \_\_\_\_\_ años Padre: \_\_\_\_\_ años  
 Lugar de nacimiento de los abuelos: Abuelo P \_\_\_\_\_ Abuela P \_\_\_\_\_ Abuelo M \_\_\_\_\_ Abuela M \_\_\_\_\_  
 Grupo ABO: \_\_\_\_\_ Rh: \_\_\_\_\_ HLA: \_\_\_\_\_

Colonizada por estreptococo del Grupo B: Si ( ) No ( )

Características del EGB aislado (colonización materna): Serotipo: \_\_\_\_\_ Tipo clonal: \_\_\_\_\_ Síntesis de polisacárido \_\_\_\_\_ µg/dl

**Datos del producto:**

Estado al nacer: \_\_\_\_\_  
 Nombre: \_\_\_\_\_  
 Fecha de nacimiento (dd/mm/aa): \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
 Edad: \_\_\_\_\_ (días) Sexo: \_\_\_\_\_  
 Edad gestacional: \_\_\_\_\_ semanas  
 Asfixia al nacimiento: Si ( ) No ( ) Apgar al nacer y a los 5 minutos: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
 Peso al nacer: \_\_\_\_\_ gramos Bajo peso al nacer: Si ( ) No ( )

Colonizado por estreptococo del Grupo B: Si ( ) No ( )

Características del EGB aislado (colonización producto): Serotipo: \_\_\_\_\_ Tipo clonal: \_\_\_\_\_ Síntesis de polisacárido \_\_\_\_\_ µg/dl

**Seguimiento:**

	Fecha (dd/mm/aa)	Edad del producto (días)	Hallazgos en el producto y/o en la madre:
1ª Consulta	___/___/___	___	_____
2ª Consulta	___/___/___	___	_____
3ª Consulta	___/___/___	___	_____
4ª Consulta	___/___/___	___	_____
5ª Consulta	___/___/___	___	_____

Estado del producto al final del seguimiento: \_\_\_\_\_

La mujer desarrolló enfermedad relacionada a EGB: Si ( ) No ( ) ¿Cuál? \_\_\_\_\_

El RN desarrolló enfermedad grave relacionada a EGB: Si ( ) No ( )

¿Cuál? Meningitis/ Neumonía/Sepsis Otra \_\_\_\_\_ ¿Cuándo (dd/mm/aa)? \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

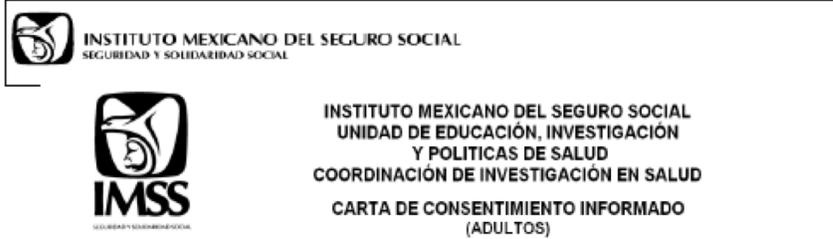
Edad de inicio si presentó enfermedad grave: \_\_\_\_\_ días Resultado de la enfermedad: \_\_\_\_\_

¿Se aisló EGB? Si ( ) No ( ) ¿De dónde? Sangre \_\_\_\_\_ LCR \_\_\_\_\_ Otro \_\_\_\_\_

Características del EGB aislado (enfermedad producto). Serotipo: \_\_\_\_\_ Tipo clonal: \_\_\_\_\_ Síntesis de polisacárido \_\_\_\_\_ µg/dl

Observaciones \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Nombre del investigador \_\_\_\_\_



**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACION EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN**

**Nombre del estudio:** "Epidemiología clínica y molecular de la infección perinatal por *Streptococcus* grupo B en una unidad médica de tercer nivel de atención del Noreste de México"

**Patrocinador externo:** No aplica.

**Lugar y Fecha:** \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_.

**Número de Registro:** \_\_\_\_\_.

**Justificación y objetivo del estudio:** Le estamos invitando a participar en un estudio de investigación clínica que se realiza en la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 23 Hospital de Ginecología y Obstetricia "Dr. Ignacio Morones Prieto" (UMAE 23) del Instituto Mexicano del Seguro Social en Monterrey, el cual tiene como propósito evaluar diversas características clínicas de usted, de la bacteria y relacionadas con la herencia de la infección causada durante el embarazo y el nacimiento por *Streptococcus* del grupo B (EGB), una bacteria que puede infectar a la mujer embarazada y a su recién nacido. Se va a evaluar la presencia de esta bacteria en las mujeres embarazadas, así como los posibles factores que podrían estar condicionando que unas mujeres tengan o no dicha bacteria y desarrollen o no enfermedad por la misma. Usted ha sido invitada a participar en este estudio debido a que usted es una mujer embarazada, y al igual que usted otras pacientes de la UMAE No. 23 que están embarazadas serán invitadas a participar y se incluirán en este estudio si así lo desean. Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Por favor, lea a detalle y detenidamente la información que le estamos proporcionando y haga todas las preguntas que le parezcan necesarias antes de decidir si desea o no participar en este estudio.

**Procedimientos:** Si usted acepta participar en este estudio se le tomará una muestra con un hisopo (raspado con un aplicador de algodón o "cotonete") de la entrada de su vagina y de alrededor de su ano, para determinar si usted tiene la bacteria EGB, y dos muestras de sangre de 5 mililitros cada una para medir su azúcar en la sangre y buscar algunos genes o factores relacionados con la herencia que podrían estar predisponiendo a las personas a tener esta bacteria.

Si se detecta en usted la bacteria EGB, una vez que dé a luz se le estará solicitando su consentimiento, sólo si usted lo permite, para que su hijo recién nacido participe en la siguiente etapa de esta investigación. Si en ese momento usted da su consentimiento, a su hijo también se le tomará una muestra con un aplicador de algodón o "cotonete" de la garganta, de alrededor del ombligo y de alrededor del ano para determinar si también tiene dicha bacteria.

Si usted resultó tener la bacteria EGB, se dará aviso de esto de manera inmediata a su médico tratante y va a ser vigilada después del parto o cesárea con citas mensuales, o antes si es necesario, durante 3 meses para evaluar clínicamente si desarrolla o no enfermedad por EGB. Si ocurre lo anterior se le realizarán de manera inmediata los estudios clínicos, de laboratorio y de rayos X necesarios, y se iniciará inmediatamente el tratamiento específico contra dicha bacteria, como a continuación se detalla. Usted y su esposo serán instruidos para la vigilancia de datos clínicos como los siguientes: aumento de temperatura, molestia o ardor al orinar, urgencia para orinar o aumento en la frecuencia de orinar, dolor en la parte baja del abdomen o espalda, abdomen "inflado", sangrado o flujo anormal por su vagina, puede o no ser mal oliente, enrojecimiento o hinchazón en la herida de la cirugía, con la instrucción de que si se presenta cualquiera de estas manifestaciones acuda inmediatamente a evaluación clínica al Servicio de Infectología en el 6º Piso de la UMAE 23 con el Dr. Amílcar Caballero Trejo. Si se sospecha que usted ha desarrollado enfermedad por EGB de este tipo, se realizarán de manera inmediata los estudios de laboratorio y rayos X necesarios, como examen de glóbulos rojos y blancos de la sangre, estudios para evaluar que su cuerpo está respondiendo a la infección, examen de orina, y en caso de requerirlo radiografía y/o ultrasonido de su pelvis y abdomen. También se le realizarán estudios para buscar la bacteria EGB en diferentes sitios, que pueden incluir dependiendo de la sospecha clínica, cultivo de orina, cultivo de sangre, cultivo de secreción de su vagina o de una muestra obtenida con un aplicador de algodón o "cotonete" del cuello de su matriz, o un aspirado del interior de su matriz y/o un cultivo de un aspirado por punción con aguja del borde inflamado de la herida de la cirugía si estuviere presente. Cada uno de estos estudios, sólo en caso de presentar síntomas de infección en dicho sitio. Además se iniciará también de manera inmediata el tratamiento específico con antibióticos, el cual será indicado por su médico tratante y que puede incluir, entre otros, cualquiera de los siguientes antibióticos: penicilina o ampicilina o clindamicina o eritromicina a las dosis médicamente recomendadas.

Usted también autoriza que los resultados obtenidos sean registrados en una base de datos para los propósitos de este estudio: Conocer la frecuencia de esta bacteria en la mujer embarazada y conocer si existen características de la mujer embarazada, del embarazo, del parto y del *Streptococcus* del grupo B que se relacionen con la presencia o no de esta bacteria y el desarrollo o no de enfermedad. Esto en un futuro podría ayudar a los médicos a establecer si todas las



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

mujeres embarazadas deben ser estudiadas para detectar esta bacteria, y si se justifica o no la administración de antibióticos a ellas en caso de detectarla.

**Posibles riesgos y molestias:** Puede sentir molestia cuando se le tome la muestra de la entrada de su vagina y de alrededor de su ano. Puede haber una molestia cuando se le tome la muestra de sangre y es posible la formación de un moretón en el sitio donde se le tome la muestra. Los investigadores harán todo lo posible por minimizar estos riesgos y molestias.

**Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:** 1) Usted no recibirá ninguna remuneración económica por participar en este estudio, y su participación no implicará ningún gasto extra. 2) Se podrá identificar de manera temprana si usted tiene la bacteria *Estreptococo del grupo B*, y si se detecta en usted, una vez que dé a luz se le estará solicitando su consentimiento si usted lo permite para que también se busque esta bacteria en su hijo. 3) Si se detecta *Estreptococo del grupo B* en usted, se informará de manera inmediata a su médico tratante. Además usted estará bajo vigilancia clínica estrecha por un médico especialista en mujeres embarazadas para detectar de manera temprana si desarrolla o no enfermedad por esta bacteria y así iniciar tratamiento rápido y oportuno. 4) Si durante la vigilancia clínica usted presenta síntomas que sugieran infección por esta bacteria, se realizarán de manera inmediata todos los estudios de laboratorio y de rayos X necesarios, y se iniciará también de manera inmediata tratamiento con los antibióticos adecuados.

**Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:** Durante el transcurso de este estudio le informaremos de cualquier hallazgo nuevo, sea bueno o malo, que sea importante para la decisión de participar o continuar participando en este estudio; por ejemplo, si hubieran cambios en los riesgos o beneficios por su participación en esta investigación o si hubieran nuevas alternativas de tratamiento que pudieran cambiar su opinión sobre su participación en este estudio. Si le llegamos a proporcionar información nueva, nuevamente le solicitaremos su consentimiento para seguir participando en este estudio sólo si usted lo permite.

**Participación o retiro:** Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si usted decide no participar, seguirá recibiendo la atención médica brindada por el IMSS a la que usted tiene derecho, se le ofrecerán los procedimientos establecidos dentro de los servicios de atención médica del IMSS. Es decir, que si usted no desea participar en este estudio, su decisión no afectará su relación con el IMSS y su derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios que como derechohabiente recibe del IMSS. Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento sin que esto modifique de ninguna manera los beneficios que usted tiene como derechohabiente del IMSS.

**Privacidad y confidencialidad:** Para garantizar su privacidad, la información que usted nos proporcione que pudiera ser utilizada para identificarla, como nombre, teléfono y dirección, será guardada de manera confidencial y por separado, al igual que los resultados de sus estudios clínicos y de laboratorio y rayos X obtenidos en esta investigación. El equipo de investigadores y los médicos de la UMAE No. 23 que están a cargo de su atención médica sabrán que usted está participando en este estudio. Nadie más tendrá acceso a la información que usted nos proporcione durante su participación en este estudio, al menos que usted así lo desee. Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias no se dará información que pudiera revelar su identidad, la cual será protegida y ocultada, por lo que le asignaremos un número que utilizaremos para identificarle en nuestras bases de datos.

**Debido a que en este estudio se le tomarán a usted muestras de material biológico, como las muestras para cultivo de la bacteria *Estreptococo del grupo B* y muestra de sangre para estudio de genes (herencia), usted debe decidir si autoriza o no la toma de dichas muestras, y si autoriza la toma de las muestras usted debe decidir si autoriza el uso de las mismas sólo para los fines de este estudio o si autoriza su empleo para este estudio y estudios posteriores. Estas muestras corresponden a la bacteria *Estreptococo del grupo B* si es encontrada en usted. Si usted autoriza el uso de dicha bacteria para estudios posteriores, los investigadores guardarán la bacteria durante cinco años para realizar diversos estudios microbiológicos y genéticos con dicha bacteria. Siéntase libre de tomar la decisión que considere mejor para usted. Por favor marque con una X una de las opciones que se presentan abajo (únicamente debe indicar la opción que usted decida):**

- No autorizo que se tomen las muestras.
- Sí autorizo que se tomen las muestras para este estudio.
- Sí autorizo que se tomen las muestras para este estudio y su empleo para estudios futuros.

**En caso de dudas o aclaraciones sobre el estudio podrá dirigirse a:**

**Investigador responsable y colaboradores:** En caso de que usted o su esposo tengan alguna duda acerca del estudio en el que se encuentra participando o sobre sus derechos o trato que debe estar o está recibiendo, o sobre el sitio al cual debe dirigirse en caso de requerir atención médica, comunicarse de lunes a viernes de 7:30 a 14:00 horas con los investigadores Dr. Amílcar Caballero Trejo o Dra. Evangelina Briones Lara al teléfono (01-81) 8371-4100 ext. 41713 o con el Investigador Responsable Dr. Gerardo del Carmen Palacios Saucedo al teléfono (01-81) 8371-4100 ext. 41315, o con el Médico que fue encargado de obtener el Consentimiento Informado Dr. \_\_\_\_\_ al teléfono \_\_\_\_\_, o bien puede dirigirse a cualquiera de los siguientes correos electrónicos: [dramilcabcaballero@hotmail.com](mailto:dramilcabcaballero@hotmail.com) o [evangelina.briones@imss.gob.mx](mailto:evangelina.briones@imss.gob.mx) o [gerardo.palacios@imss.gob.mx](mailto:gerardo.palacios@imss.gob.mx)



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**  
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante en esta investigación podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la Comisión Nacional de Investigación Científica (CNIC) del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4º piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores, México, D.F., CP 06720. Teléfono 01 (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: [comision.etica@imss.gob.mx](mailto:comision.etica@imss.gob.mx)

**Declaración de consentimiento informado:** Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído o alguien me ha leído el contenido de este formato de consentimiento. Se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato. Al firmar este formato doy libremente mi consentimiento para participar en este estudio de investigación.

\_\_\_\_\_  
**Paciente Participante**

Nombre, firma, dirección y teléfono

\_\_\_\_\_  
**Esposo o Compañero**

Nombre, firma, dirección y teléfono

\_\_\_\_\_  
**Nombre y firma del encargado  
de obtener el consentimiento informado**

\_\_\_\_\_  
**Testigo 1**

Nombre, firma, dirección y teléfono  
Relación con el paciente (familiar, amigo, conocido, etc.)

\_\_\_\_\_  
**Testigo 2**

Nombre, firma, dirección y teléfono  
Relación con el paciente (familiar, amigo, conocido, etc.)

**Clave: 2810-009-014**

**Clave: 2810-003-002**

**Presentación en Cartel:** “Epidemiología clínica y molecular de la infección perinatal por Estreptococo del grupo B en una unidad medica de tercer nivel de atención del noreste de México” XXXVII Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica. Diciembre, 2018. Chihuahua, Chihuahua. **Primer Lugar.**



El Comité Organizador del  
XXXVII Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica

Otorgan el presente

## DIPLOMA A:

**Gerardo del Carmen Palacios Saucedo, Lydia Guadalupe Rivera Morales, Amilcar Caballero Trejo, Melissa Carolina Mellado García, Luis Daniel Ramírez Calvillo, Saraí Yoselín Rubalcava López, José Manuel Vázquez Guillén, Cristina Rodríguez Padilla.**

Por haber obtenido el 1er Lugar en la categoría de Investigación Clínica con el trabajo

**EPIDEMIOLOGÍA CLÍNICA DE LA INFECCIÓN PERINATAL POR ESTREPTOCOCCO DEL GRUPO B EN UNA UNIDAD MÉDICA DE TERCER NIVEL DE ATENCIÓN DEL NORESTE DE MÉXICO.**

Estamos agradecidos por la alta calidad de su presentación, la cual contribuyó al éxito del congreso.

Chihuahua, Chih., a 01 de diciembre de 2018.

ATENTAMENTE,

  
DR. ANTONIO LUEVANOS VELÁZQUEZ  
PRESIDENTE A.M.I.P.

  
DR. PEDRO ANTONIO MARTÍNEZ ARCE  
COORDINADOR TRABAJOS LIBRES

**Presentación en Cartel:** “Epidemiología clínica de la infección perinatal por Estreptococo del grupo B en una unidad medica de tercer nivel de atención del noreste de México” XXIII Foro Delegacional de Investigación. Febrero, 2019. Monterrey, Nuevo León. **Tercer lugar.**

 **GOBIERNO DE MÉXICO** |  **IMSS**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**  
**DELEGACIÓN NUEVO LEÓN**  
**JEFATURA DE PRESTACIONES MÉDICAS**

Otorga el presente

**TERCER LUGAR**

en el área medica

Luis Daniel Ramírez Calvillo, Gerardo del Carmen Palacios Saucedo, Lydia Guadalupe Rivera Morales, Amilcar Caballero Trejo, Melissa Carolina Mellado García, Saraí Yoselín Rubalcava López, José Manuel Vázquez Guillén, Evangelina Briones Lara, Arnoldo Almaguer Molina, Talyha Itzel Hernández Hernández, Karla Mariana Leal Olvera, Ramón Valladares Trujillo, Ricardo Cerda Flores, Miguel Ángel Rivera Alvarado, Cristina Rodríguez Padilla.

Por su trabajo titulado:

**EPIDEMIOLOGÍA CLÍNICA DE LA INFECCIÓN PERINATAL POR ESTREPTOCOCO DEL GRUPO B EN UNA UNIDAD MÉDICA DE TERCER NIVEL DE ATENCIÓN DEL NORESTE DE MÉXICO.**

XXIII Foro Delegacional de Investigación

Monterrey, N. L. 27 de febrero del 2019  
(duración 8 horas)

  
**Dra. Irazema E. Hernández Mancinas**  
Coord. de Planeación y Enlace Institucional

  
**Dra. Ma. Guadalupe Garza Sagastegui**  
Titular Delegacional de Servicios de Prestaciones Médicas

Scanned with CamScanner

**Presentación en Cartel:** “Prevalencia de colonización por *Streptococcus agalactiae* en mujeres embarazadas del Noreste de México” Sexta Expo Científica CTR. Mayo, 2019. Monterrey, Nuevo León. **Quinto Lugar.**



**Presentación en Cartel:** “Epidemiología clínica de la infección perinatal por EGB en una unidad medica de tercer nivel de atención del noreste de México” XLIV Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica. Mayo, 2019 León, Guanajuato.



# Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica, A.C.

Otorga la presente

## Constancia

a

### MELISSA CAROLINA MELLADO GARCÍA

Por haber participado como **PONENTE** con el trabajo titulado "Epidemiología clínica y molecular de la infección perinatal por EGB en el noreste de México" dentro de la sesión de carteles

#### **Autores:**

Gerardo del Carmen Palacios Saucedo, Melissa Carolina Mellado García, Luis Daniel Ramírez Calvillo, Aldo Sebastian Flores Flores, Lydia Guadalupe Rivera Morales, José Manuel Vázquez Guillén, Amlicar Caballero Torres, Evangelina Briones Lara, Arnolfo Almaguer Cerda, Ricardo Cerda Flores, Ramón Valladares Trujillo, Miguel Ángel Rivera Alvarado, Cristina Rodríguez Padilla

  
**Dr. José Juan Donis Hernández**  
Presidente de la AMIMC A.C.

  
**Dra. Patricia Cornejo Juárez**  
Secretaría Académica, AMIMC A.C.

**Estancia de investigación** El Instituto nacional de salud pública, en el area de investigación de Ciencias Médicas. Cuernavaca, Moreos, con la asesoria de la Dra. Gabriela Echániz Aviles.



Centro de Investigación  
Sobre Enfermedades Infecciosas  
(CISEI)

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

Cuernavaca, Morelos, a 6 de mayo de 2019

#### A QUIEN CORRESPONDA

Por éste conducto, informo que la Q.F.B. Melissa C. Mellado García quién está completando sus estudios de Maestría en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, realizó una estancia en el laboratorio a mi cargo del 2 al 12 de abril del presente año.

Durante su estancia, la Quim. Mellado aprendió y realizó la determinación de la distribución clonal de cepas de estreptococos del grupo B mediante el método de electroforesis en campos pulsados. Su responsabilidad y desempeño en la realización de los ensayos fue excelente.

Extiendo la presente a petición de la interesada y le deseo el mayor de los éxitos.

Atentamente

Dra. Gabriela Echaniz-Aviles  
Investigadora en Ciencias Médicas  
Departamento de Evaluación de Vacunas  
Correo electrónico: igechaniz@insp.mx