

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE CITOCINAS
PROINFLAMATORIAS EN UN MODELO MURINO DE INFECCIÓN POR
DISTINTOS SEROTIPOS DE *Streptococcus agalactiae***

POR

JOSÉ ROBERTO ESTUPIÑAN JIMÉNEZ

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

ENERO, 2020

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE CITOCINAS
PROINFLAMATORIAS EN UN MODELO MURINO DE INFECCIÓN POR
DISTINTOS SEROTIPOS DE *Streptococcus agalactiae*.**

Comité de Tesis



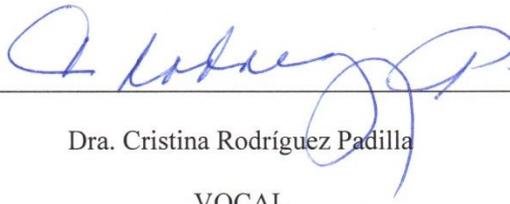
Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales

PRESIDENTE



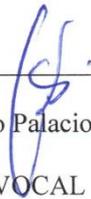
Dra. Itza E. Luna Cruz

SECRETARIO



Dra. Cristina Rodríguez Padilla

VOCAL



Dr. Gerardo Palacios Saucedo

VOCAL



Dr. José Manuel Vázquez Guillén

VOCAL

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE CITOCINAS
PROINFLAMATORIAS EN UN MODELO MURINO DE INFECCIÓN POR
DISTINTOS SEROTIPOS DE *Streptococcus agalactiae*.**

Director de tesis

A handwritten signature in blue ink, reading "Lydia Guadalupe Rivera Morales", is positioned above a horizontal line.

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales

FINANCIAMIENTO

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado como becario (CVU) 893151 durante la duración del proyecto.

Al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) 2019 de la UANL.

Al Fondo de Investigación en Salud No.FIS/IMSS/PROT/PRI0/15/047 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”

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Cristina Rodríguez Padilla**, por permitirme trabajar en el Laboratorio de Inmunología y Virología.

A la **Dra. Lydia Rivera Morales**, por brindarme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo y por jamás dejarme solo durante mi proceso de formación, nada hubiera sido posible sin su valiosa ayuda.

Al **Dr. José Manuel Vázquez Guillén**, siempre dispuesto a dar un consejo valioso, aún en los momentos más difíciles, más que un asesor un gran amigo.

Al **Dr. Gerardo Palacios Saucedo**, por siempre confiar en el proyecto y apoyarme con todo lo necesario para poder realizarlo.

A la **Dra. Itza E. Luna Cruz**, por sus valiosas recomendaciones durante la realización del proyecto.

Al **MC. José Luis Zacarías Hernández**, por ser un gran compañero de trabajo y sobre todo un gran amigo que siempre me ha apoyado en los momentos difíciles, sin tu ayuda el proceso de maestría hubiera sido mucho más difícil.

A la **MC. Melissa Mellado**, por ser una excelente compañera y una gran amiga, gracias por todo tu apoyo y hacer más fácil mi proceso de integración al laboratorio.

A **Ángel Torres**, por sus valiosos consejos y volverse un gran amigo en muy poco tiempo.

A todo el equipo de trabajo del **L3**, en especial a **Meme**, que siempre fue mi mano derecha durante la realización del proyecto.

DEDICATORIAS

A mi prometida **Jesica Ramírez**, por ser un apoyo incondicional en todo momento, por jamás dejarme solo y por cuidarme siempre. Te amo y ahora vamos por el siguiente paso juntos. Be my Forever 🎵

A mis **Padres**, por siempre confiar en mí. El proceso de cambiar de ciudad no fue nada sencillo, pero con su apoyo todo fue más fácil, nada sería posible sin su valiosa ayuda, este logro es de ustedes. Los quiero mucho.

A mi **Abuelita**, por siempre estar presente en los momentos más difíciles, aunque no te pueda ver jamás me dejas solo y nunca te voy a olvidar.

A mi hermana **Alejandra Merino**, por siempre darme valiosos consejos y por creer en mí, también por jalarme las orejas cuando es necesario. Siempre estás presente en todo lo que hago y así será siempre. Te quiero mucho.

A mis grandes amigos **Zaca** y **Ángel** por hacer que todos los días sean más divertidos y por cantar una que todos se saben.

A mis **Chapas (Chapa, Wilma y Bony)** por siempre hacerme sonreír cuando no tengo ganas de hacerlo.

“Es tu derecho escuchar a tu destino, nadie tiene el derecho de decir que no después de que te hayas ganado el derecho de ser lo que quieres ser y hacer lo que quieres hacer”

“Si sabes lo que vales, ve y consigue lo que mereces, pero tendrás que aguantar los golpes”

Rocky Balboa

Anything but ordinary

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Género <i>Streptococcus</i>	3
2.2 Taxonomía.....	4
2.3 <i>Streptococcus agalactiae</i>	5
2.4 Características de <i>S. agalactiae</i>	6
2.5 Antígeno de Lancefield	7
2.6 Polisacárido capsular	8
2.7 Patogénesis de <i>S. agalactiae</i>	9
2.8 Enfermedad de inicio tardío, tardío.....	13
2.9 <i>S. agalactiae</i> en adultos	13
2.10 Serotipos	14
2.11 Transmisión.....	16
2.12 Diagnóstico.....	17
2.13 Tratamiento	18
2.14 Epidemiología.....	20
2.15 Epidemiología en México.....	21
2.16 Nuevas estrategias contra <i>S. agalactiae</i>	22
2.16.1 Detección ultra rápida, sensible y cuantitativa en chip de <i>S. agalactiae</i>	23
2.16.2 Aplicación de bacteriófagos para la detección de <i>S. agalactiae</i>	25
2.17 Citocinas.....	27
2.18 Modelo murino de <i>S. agalactiae</i>	29
3. JUSTIFICACIÓN	32
4. HIPÓTESIS	33

5. OBJETIVO	34
5.1 Objetivos particulares	34
6. MATERIAL Y MÉTODOS	35
6.1 Lugar de trabajo	35
6.2 Diseño del estudio.....	35
6.3 Consideraciones éticas.....	35
6.4 Aislamiento de <i>S. agalactiae</i>	35
6.5 Serotipificación	36
6.6 Modelo murino	37
6.7 Inoculación vaginal de la bacteria.....	37
6.8 Pureza de los inóculos.....	38
6.9 Hisopados del lumen vaginal	38
6.10 Medición de citocinas mediante citometría de flujo	39
6.10.1 Preparación del Standard.....	39
6.10.2 Mezcla de las perlas de captura.....	39
6.10.3 Procedimiento de la prueba	39
6.11 Cuantificación de IgG total.....	40
6.11.1 Obtención de suero.....	40
6.12 ELISA.....	40
6.12.1 Preparación de los reactivos.....	40
6.12.2 Preparación de las muestras.....	42
6.13 Análisis estadístico	43
7. RESULTADOS	44
7.1 Aislamiento y Serotipificación.....	44
7.2 Modelo murino	45
7.2.1 Colonización vaginal.....	45
7.2.2 Expresión de citocinas proinflamatorias.....	48
7.3 IgG total.....	55
8. DISCUSIÓN	56
9. CONCLUSIONES	66
10. PERSPECTIVAS	67
11. BIBLIOGRAFÍA	68
12. RESUMEN BIOGRÁFICO	87

13. RECONOCIMIENTOS	88
14. CARTA DE APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN Y BIENESTAR ANIMAL.....	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Características fenotípicas de los estreptococos	5
2	Factores de virulencia de <i>S. agalactiae</i> y su papel en la transición de colonización a enfermedad invasiva	10
3	Características clínicas y demográficas por estado de <i>S. agalactiae</i>	20
4	Prevalencia de colonización ocasionada por <i>S. agalactiae</i> en mujeres embarazadas	21
5	Preparación y concentración del estándar en la prueba de ELISA	42
6	Serotipos de <i>S. agalactiae</i> encontrados	44
7	Serotipos de <i>S. agalactiae</i> y clase a la que pertenece su polisacárido capsular	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Tipos de hemólisis en placas de agar sangre	4
2	<i>Streptococcus agalactiae</i>	7
3	Estructura del carbohidrato del grupo B	8
4	Unidades estructurales del polisacárido capsular de <i>S.agalactiae</i> .	9
5	Infección ascendente por <i>Streptococcus agalactiae</i>	11
6	Modelo de exfoliación epitelial inducida por <i>S. agalactiae</i> e infección ascendente	12
7	Distribución de serotipos de <i>S. agalactiae</i>	14
8	Transmisión horizontal de <i>S. agalactiae</i>	16
9	Chip de silicón usado para realizar UF-qPCR	24
10	Identificación bacteriana en agar cromogénico después de un co-cultivo enriquecido de <i>S. agalactiae</i> y <i>E. faecalis</i>	26
11	Crecimiento de <i>S. agalactiae</i> en agar cromogénico	45
12	Hisopados vaginales sembrados en Strep B Carrot Broth™ one-step (Hardy Diagnostics).	45
13	Dinámica de colonización vaginal de los distintos serotipos de <i>S. agalactiae</i>	46
14	Evaluación de la dinámica de colonización vaginal en el día 5	47
15	Evaluación de la dinámica de colonización vaginal en los días 10 y 15	47
16	Niveles de IL-6 después de la infección con los distintos serotipos de <i>S. agalactiae</i>	48
17	Niveles de IL-10 después de la infección con los distintos serotipos de <i>S. agalactiae</i>	49

18	Niveles de MCP-1 después de la infección con los distintos serotipos de <i>S. agalactiae</i>	50
19	Niveles de IFN- γ después de la infección con los distintos serotipos de <i>S. agalactiae</i>	51
20	Niveles de TNF- α después de la infección con los distintos serotipos de <i>S. agalactiae</i>	52
21	Niveles de IL-12p70 después de la infección con los distintos serotipos de <i>S. agalactiae</i>	53
22	Diferencias en la expresión de citocinas a distintos puntos después de la infección (casos representativos).	54
23	Concentración de IgG total en respuesta a la infección por cada serotipo de <i>S. agalactiae</i> .	55

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AKT	Proteína quinasa B
APRIL	Ligando inductor de proliferación A
BAFF	Factor activador de célula B perteneciente a la familia del TNF
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Citosina
CAMP	Prueba de Christie- Atkins- Munch- Peterson
CD	Clúster de diferenciación
CDC	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
CFU	Unidades formadoras de colonia
CLR	Receptores de lectina tipo C
CPS	Polisacárido capsular
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
DC	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EMT	Transición epitelial a mesenquimal
FAK	Proteína tirosina quinasa PTK2
Fc	Fracción cristalizable
G	Guanina
GBC	Antígeno específico del grupo B
GSK3β	Glucógeno sintasa quinasa 3 β
IFN-γ	Interferón- γ
Ig	Inmunoglobulina

IL	Interleucina
ILC	Células linfoides
IP	Intraperitoneal
LAMP	Amplificación isotérmica mediada por LOOP
MCP	Proteína quimiotáctica de monocitos
MLST	Tipificación de secuencias multilocus
MLVA	Análisis de repeticiones en tándem de número variable de multilocus
NAM	N-acetil murámico
NK	Natural-Killer
NLR	Receptores tipo NOD
NT	No tipificable
OD	Densidad óptica
OMS	Organización mundial de la salud
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante β
THB	Caldo Todd-Hewitt
TMB	3,3', 5,5'-tetrametilbencidina
TNF-α	Factor de necrosis tumoral- α
TLR	Receptores tipo Toll
UF-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa y ultra rápida
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

RESUMEN

Streptococcus agalactiae es una bacteria de distribución mundial, la cual se desarrolla en el ambiente vaginal de los humanos, su importancia se centra en que es la principal causa de infección neonatal. Es sumamente difícil replicar con fidelidad las complejas interacciones de los factores que existen en el ambiente de la vagina humana en un modelo animal. Sin embargo, los modelos murinos de persistencia bacteriana en el tracto cervicovaginal previamente han producido resultados útiles y permitido el estudio de las interacciones entre el hospedero y el microbioma. El objetivo del estudio fue determinar las variaciones en la expresión diferencial de citocinas proinflamatorias en un modelo murino de infección por distintos serotipos de *S. agalactiae*. La bacteria fue aislada a partir de las muestras disponibles en el laboratorio e identificada mediante pruebas bioquímicas convencionales y finalmente se realizó la serotipificación mediante aglutinación en latex. A continuación, se utilizó un modelo murino de infección por *S. agalactiae*, donde se evaluó el porcentaje de recuperación bacteriana de los distintos serotipos de *S. agalactiae* mediante hisopados vaginales y siembras en strep B carrot brothTM. La expresión de citocinas proinflamatorias fue medida por citometría de flujo con el kit BDTM Cytometric Bead Array y la activación de la respuesta inmune humoral fue evaluada mediante la técnica de ELISA. Se identificaron 5 serotipos de *S. agalactiae* Ib, II, III, IV y V. Se encontró una diferencia altamente significativa ($p=0.0014$) en la capacidad de colonización de cada serotipo, siendo el III y IV los que mejor establecían la infección al día 5, seguidos por el II, V y Ib. El día 15 el único serotipo que seguía siendo detectable era el Ib. Los perfiles de expresión de las citocinas variaron después de la infección con los distintos serotipos. La IL-6 presentó variaciones significativas al día 5 ($p=0.036$), la IL-10 los días 5 ($p=0.0017$) y 15 ($p=0.0225$), MCP-1 el día 5 ($p=0.0197$), por su parte, IFN- γ tuvo variaciones los días 5 ($p=0.0388$) y 15 ($p=0.0399$), mientras que TNF- α y la IL-12p70 no presentaron variaciones significativas entre los grupos. Se observó una diferencia significativa ($p=0.0349$) en los niveles de IgG total después de la infección con distintos serotipos. Los serotipos III y V presentaron una disminución de IgG total, mientras que el Ib, II y IV no mostraron variaciones con respecto al grupo control. Lo anterior en conjunto respalda la idea de que los serotipos de *S. agalactiae* estimulan diferencialmente las respuestas inmunes innata y adaptativa.

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae is a worldwide distribution bacterium, which inhabits the human vaginal cavity, it is important because is the main cause of neonatal infection. It is extremely difficult to replicate the complex interactions among factors that exist in vaginal environment in an animal model, but nevertheless, bacterian-persistence murine models in cervicovaginal tract have produced useful results and allowed to study interactions between microbiome and host. The aim of the present study was to determine the variations in differential expression of pro-inflammatory cytokines in a murine model of infection by different *S. agalactiae* serotypes. To test this, the bacteria was isolated from the available samples in laboratory and identified by conventional biochemical tests, finally the serotyping was done by latex agglutination test. Then, a murine model of *S. agalactiae* infection was used, where the percentage of bacterial recovery of the different serotypes of *S. agalactiae* was evaluated by vaginal swabs which were then inoculated in strep B carrot brothTM. Proinflammatory cytokine expression was measured by flow cytometry with the BDTM Cytometric Bead Array kit and activation of humoral immune response was assessed by ELISA. Five serotypes of *S. agalactiae* Ib, II, III, IV and V were identified. A highly significant difference ($p = 0.0014$) was found in the colonization capacity of each serotype, with III and IV being the ones that best established infection at day 5, followed by II, V and Ib. At day 15 the only serotype that was still detectable was Ib. The cytokine expression profiles varied after infection with the different serotypes. IL-6 showed significant variations at day 5 ($p = 0.036$), IL-10 at days 5 ($p = 0.0017$) and 15 ($p = 0.0225$), MCP-1 at day 5 ($p = 0.0197$), IFN- γ at days 5 ($p = 0.0388$) and 15 ($p = 0.0399$), while TNF- α and IL-12p70 did not show significant variations between the groups. A significant difference ($p = 0.0349$) was observed in total IgG levels after infection with different serotypes. Serotypes III and V showed a decrease in total IgG, while Ib, II and IV showed no variation with respect to the control group. Taken together, these findings supports that *S. agalactiae* serotypes differentially stimulate innate and adaptive immune responses.

1. INTRODUCCIÓN

Streptococcus agalactiae también conocido como estreptococo del grupo B provoca una hemólisis de tipo β , pertenece a las bacterias Gram-positivas y es una causa principal de infecciones neonatales. *S. agalactiae* comúnmente coloniza la región gastrointestinal baja y los tractos genitales, razón por la cual durante el embarazo los neonatos se encuentran en riesgo de infección. A pesar de que la profilaxis con antibióticos durante el parto ha disminuido la incidencia de infecciones neonatales tempranas, no ha logrado prevenir la infección ascendente que ocurre en etapas tempranas del embarazo y que posteriormente da lugar a nacimientos prematuros, mortinatos o infecciones neonatales de inicio tardío. (Vornhagen et al. 2017). La mayoría de los nacimientos prematuros son debido a infecciones microbianas (Romero et al. 2014) y aproximadamente 10% son atribuibles a infección causada por *S. agalactiae* (Han et al. 2009).

Streptococcus agalactiae se encuentra asociado con enfermedades invasivas neonatales tales como sepsis, neumonía y meningitis, las cuales en conjunto afectan alrededor de 2000 neonatos cada año en Estados Unidos. Las tasas de colonización vaginal de la madre por *S. agalactiae* son similares en los países desarrollados y en aquellos en vías de desarrollo, ubicándose entre un 8 y 18%, con un promedio estimado en 12.7% (Patras et al. 2015).

La transmisión transversal de la infección en el útero o durante las labores de parto requiere de la supervivencia de *S. agalactiae* en diversos ambientes del huésped y una evasión del sistema inmune (Patras et al. 2013). Una vez que *S. agalactiae* penetra las barreras celulares para alcanzar el torrente sanguíneo o tejidos profundos, una más amplia respuesta inmune es activada para eliminar la infección, en la cual las células fagocíticas del huésped como macrófagos y neutrófilos juegan un papel crucial. La eliminación de *S. agalactiae* por las células inmunes depende de la opsonización mediante anticuerpos específicos o por complementos séricos, factores que pueden ser deficientes cualitativa y cuantitativamente en recién nacidos, especialmente aquellos nacidos prematuramente (Maisey, 2008).

Sin embargo, no se conocen a profundidad cuáles son los factores tanto del huésped como de la bacteria que influyen en la colonización de la vagina por *S. agalactiae*.

Es muy complicado tratar de replicar con fidelidad la compleja interacción de los factores que actúan en el ambiente de la vagina humana en un modelo experimental. Sin embargo, los modelos murinos de persistencia bacteriana en el tracto cervicovaginal previamente han producido resultados útiles y permiten un estudio de las interacciones microbio-huésped en una forma más representativa (Sheen et al. 2011).

2. ANTECEDENTES

El desarrollo de las enfermedades bacterianas siempre ha estado relacionado con una incesante lucha entre el sistema inmune del hospedero tratando de eliminar la infección bacteriana, mientras que en el polo opuesto encontramos a la bacteria tratando de sobrevivir y evadir los mecanismos de defensa. La gran mayoría de las bacterias no provoca ningún tipo de enfermedad, incluso muchas son benéficas y necesarias, sin embargo, unas pocas cuentan con la habilidad de provocar enfermedades. Justo en medio de esta marcada polaridad existe un grupo de bacterias que puede coexistir con el humano, pero que bajo las condiciones apropiadas puede provocar una patología. Los estreptococos son un excelente ejemplo de esta clase de microbios. (Mitchell 2003).

Usualmente los estreptococos pertenecen a la microbiota de humanos y distintas especies de animales. Aparecen, por ejemplo, en la piel, boca, intestinos y tracto respiratorio, la mayoría causa infecciones oportunistas, sin embargo, algunos son virulentos, lo que significa que pueden causar serias infecciones a pesar de los mecanismos de defensa del hospedero (Baron 1996). Lo anterior resalta la necesidad de comprender mejor sus mecanismos de acción y biología.

2.1 Género *Streptococcus*

Las bacterias del género *Streptococcus* son catalasa-negativa, cocos Gram-positivos de menos de 2 μm que tienden a crecer en cadenas en medio líquido. La mayoría de las especies del género tiene un bajo contenido de G+C en su DNA, con un rango entre 34 y 46%. La composición de la pared celular es típica de las bacterias Gram-positivas y consiste principalmente de peptidoglicano con glucosamina y ácido murámico. Una variedad de carbohidratos y antígenos proteínicos de superficie. El ácido teicoico está anclado a la pared celular y junto con otras características es responsable de las diferencias entre las distintas especies de estreptococos. Algunas de las especies de estreptococos son anaerobias facultativas y algunas son anaerobias obligadas (Versalovic et al. 2011), ya que carecen del compuesto de Hem y por lo tanto son incapaces de tener un metabolismo respiratorio (Spellerberg y Brandt 2015).

2.2 Taxonomía

El género *Streptococcus* comprende actualmente más de 100 especies, un número que en los próximos años aumentará gracias a las técnicas de secuenciación de nueva generación. Los estreptococos son Firmicutes del orden Lactobacillales y pertenecen a la familia Streptococcaceae (Spellerberg y Brandt 2015).

La identificación de las especies de estreptococos se basa en distintos factores como la reacción de hemólisis, tamaño que presenta la colonia y la presencia de los antígenos de Lancefield (Tabla 1), por tal motivo surgen diversas limitaciones para una identificación con un alto grado de precisión, sin embargo, este sistema continúa siendo muy valioso y utilizado en el sector salud, ya que las características anteriores al ser combinadas con cuadros clínicos causados por diferentes especies permiten una primera distinción de una amplia variedad de estreptococos que es sumamente útil para seleccionar pruebas posteriores y guiar tratamientos (Spellerberg y Brandt 2015). Los estreptococos pueden dividirse en alfa, beta y gamma según el tipo de actividad hemolítica que presentan (Figura 1) (Versalovic et al. 2011).

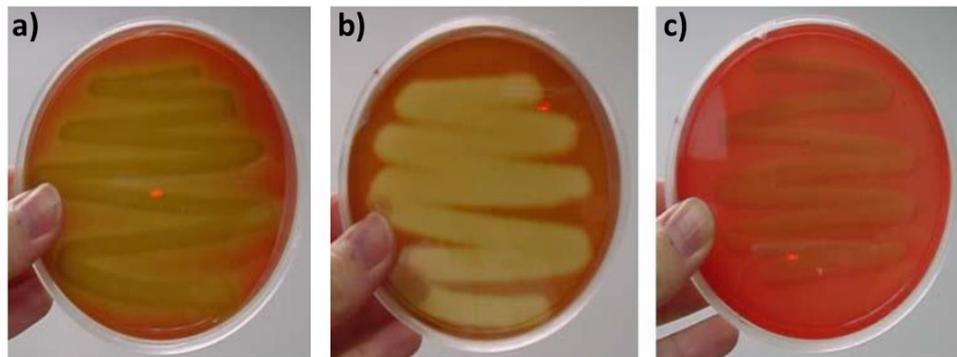


Figura 1. Tipos de hemólisis en placas de agar sangre (Maben 2014). a) La alfa presenta una zona de tonalidad verde alrededor del crecimiento bacteriano, la cual es ocasionada por una lisis incompleta de los eritrocitos. b) La beta se caracteriza por una zona clara de hemólisis alrededor del crecimiento de la bacteria, la cual es ocasionada por la lisis de los eritrocitos. c) La gamma se define como la ausencia de hemólisis.

La diferenciación clásica de estreptococos separa al grupo betahemolítico de las especies que no son betahemolíticas. Los estreptococos betahemolíticos, también conocidos como estreptococos piogénicos, incluyen especies que son patógenas de humanos como *S. pyogenes*, *S. agalactiae* (el antígeno B se limita a *S. agalactiae*), *S. dysgalactiae subsp. equisimilis* y un número de especies de interés veterinario (Spellerberg y Brandt 2015).

Tabla 1. Características fenotípicas de los estreptococos (Spellerberg y Brandt 2015).

Species	Lancefield group(s)	Colony size ^e	Hosts ^d	Bacitracin susceptibility	PYR ^f	CAMP ^g	VP ^h	Hippurate hydrolysis	Trehalose	Sorbitol
<i>S. pyogenes</i>	A	Large	Humans	+	+	-	-	-	+	-
<i>S. agalactiae</i>	B	Large	Humans, cows	-	-	+	-	+	v	-
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> ^b	C	Large	Animals	-	-	-	-	-	+	v
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	A, C, G, L	Large	Humans (animals)	-	-	-	-	-	+	-
<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i>	C	Large	Animals	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ^c	C	Large	Animals (humans)	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. canis</i> ^e	G	Large	Dogs (humans)	-	-	+	-	-	v	-
<i>S. anginosus</i> group ^d	A, C, G, F, none	Small	Humans	-	-	-	+	-	+	-
<i>S. porcinus</i> ^e	E, P, U, V, none	Large	Swine (humans)	-	+	+	+	v	+	+

2.3 *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus. agalactiae fue identificado por primera vez en 1887 como el agente causal de la mastitis bovina (Vornhagen et al. 2017). En 1935, se identificó en frotis vaginales (Lancefield 1935) y se descubrió como un patógeno humano en 1938, este evento fue muy importante debido a que previamente todas las infecciones estreptocócicas graves en ese entorno habían sido atribuidas al estreptococo del grupo A (Fry 1938).

La enfermedad causada por *S. agalactiae*, también referido como estreptococo del grupo B de Lancefield, emergió en la década de los 70s como una causa principal de morbilidad y mortalidad neonatal en los Estados Unidos (Melin y Efstratiou 2013). Los ensayos clínicos a mediados de los 80s demostraron que la profilaxis con antibióticos

durante la labor de parto a madres colonizadas con *S. agalactiae* fue altamente efectiva en prevenir la enfermedad en recién nacidos (Boyer y Gotoff 1986). A pesar de los resultados obtenidos la estrategia no fue implementada de forma inmediata en todas las madres afectadas (Schrag et al. 2000). En 1989 Los Centros para Control y prevención de Enfermedades (CDC) establecieron una vigilancia activa para la infección por *S. agalactiae* (Hirvonen 2017). En la década de los 90s, del 4 al 6% de los recién nacidos afectados murieron de infección. Los infantes sobrevivientes comúnmente desarrollaron discapacidades como retraso mental, pérdida de la vista o audición. Posteriormente se evaluó el costo beneficio de las estrategias de prevención (Mohle-Boetani et al. 1993).

En 1996 se creó un lineamiento para la prevención de la infección perinatal por *S. agalactiae* emitido por la Academia Americana de Pediatría (1997), Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (1996) y por los CDC (Schuchat et al. 1996). El lineamiento se basaba en un monitoreo que permitiera identificar candidatas para el tratamiento profiláctico con antibióticos, mujeres que presentaran factores de riesgo durante la labor de parto por ejemplo fiebre, ruptura prolongada de las membranas o un inminente parto prematuro. Todas las mujeres eran monitoreadas por la infección con *S. agalactiae* entre la semana 35 y 37 de gestación, y el tratamiento profiláctico era ofrecido a las portadoras (Schrag et al. 2000). *S. agalactiae* se ha mantenido como una causa central de morbilidad y mortalidad en Norte América, Australia y Europa (Melin y Efstratiou 2013). La incidencia de la infección por *S. agalactiae* también es elevada entre mujeres de edad avanzada (Schrag et al. 2000).

2.4 Características de *S. agalactiae*

Streptococcus agalactiae, es un coco Gram-positivo encapsulado que existe en pares de cadenas cortas, presenta una hemólisis beta débil (Hirvonen 2017) (Figura 2). Comparte un antígeno común, el antígeno del grupo B de Lancefield y cuenta con un polisacárido capsular (CPS) que sirve para clasificarlo en 10 serotipos, con características antigénicas particulares los cuales se clasifican como Ia, Ib, II-IX (Baker 2000; Slotved et al. 2007). La cápsula presente en *S. agalactiae* es uno de sus mayores factores de virulencia, la cual ayuda a que la bacteria sea capaz de evadir las defensas del hospedero al interferir con la actividad fagocítica de las células inmunes, excepto en presencia de anticuerpos

específicos (Melin y Efstratiou 2013). Una pequeña proporción de cepas ha sido identificada como no-tipificables, dicha porción representa un 1% de los aislados de infección neonatal invasiva y un 8% en aislados de colonización vaginal, estos datos fueron obtenidos gracias a los estudios de “The DEVANI european project” (Rodríguez-Granger et al. 2012). Los aislados no tipificables muy probablemente se convertirán en serotipos nuevos, así como ocurrió con el serotipo IX, el cual fue descrito hasta el año 2007.



Figura 2. *Streptococcus agalactiae* (Hirvonen 2017). Cultivo puro en placas de agar sangre.

2.5 Antígeno de Lancefield

Rebecca Lancefiel originalmente definió dos carbohidratos antigénicos en la pared celular de *S. agalactiae*: el antígeno específico del grupo B (GBC) común en todas las cepas y el antígeno capsular (Lancefield 1934). La compleja estructura de GBC basada en el arreglo de 4 diferentes oligosacáridos (rhamnosa, galactosa, N-acetilglucosamina y glucitol) fue resuelta en una serie de estudios a finales de los 80s (Michon et al. 1987, 1988). Después se demostró que el polisacárido capsular y GBC estaban covalentemente unidos al peptidoglicano (Figura 3) (Deng et al. 2000).

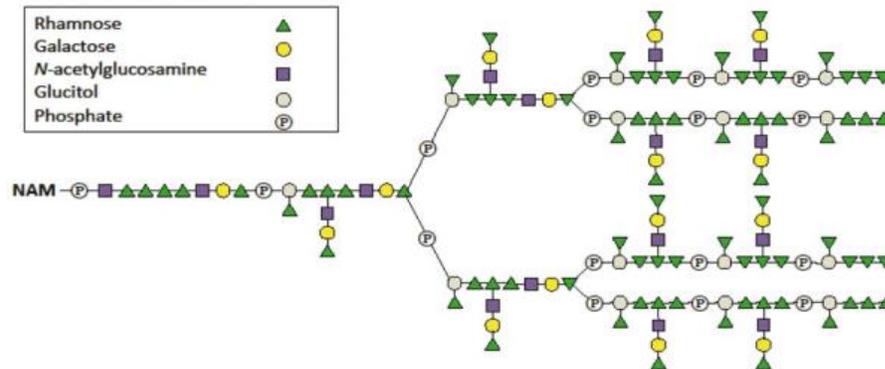


Figura 3. Estructura del carbohidrato del grupo B (Caliot et al. 2012). El carbohidrato se encuentra unido al N-acetil murámico (NAM), un componente del peptidoglicano.

2.6 Polisacárido capsular

El polisacárido capsular que encapsula a *S. agalactiae* es un factor de virulencia, cuenta con múltiples residuos de ácido siálico, los cuales permiten clasificarlo en serotipos, a la fecha 10 han sido identificados, siendo el IX el más reciente (Slotved et al. 2007) (Figura 4) (Cieslewicz et al. 2005; Paoletti y Kasper 2003). Existen diversos métodos para identificar los serotipos, por ejemplo: aglutinación en látex y PCR multiplex (Imperi et al. 2010). Los serotipos más comunes a nivel global son Ia, Ib, II, III y V.

El polisacárido capsular es codificado en el locus *cps* y está compuesto de 16-18 genes (Cieslewicz et al. 2005). Los genes *cpsA* a *F* se encuentran localizados en un extremo distal a los *cpsL*, *NeuB*, *D*, *A* y *C* en el otro, estos genes se encuentran altamente conservados entre los 10 serotipos (Kapatai et al. 2017).

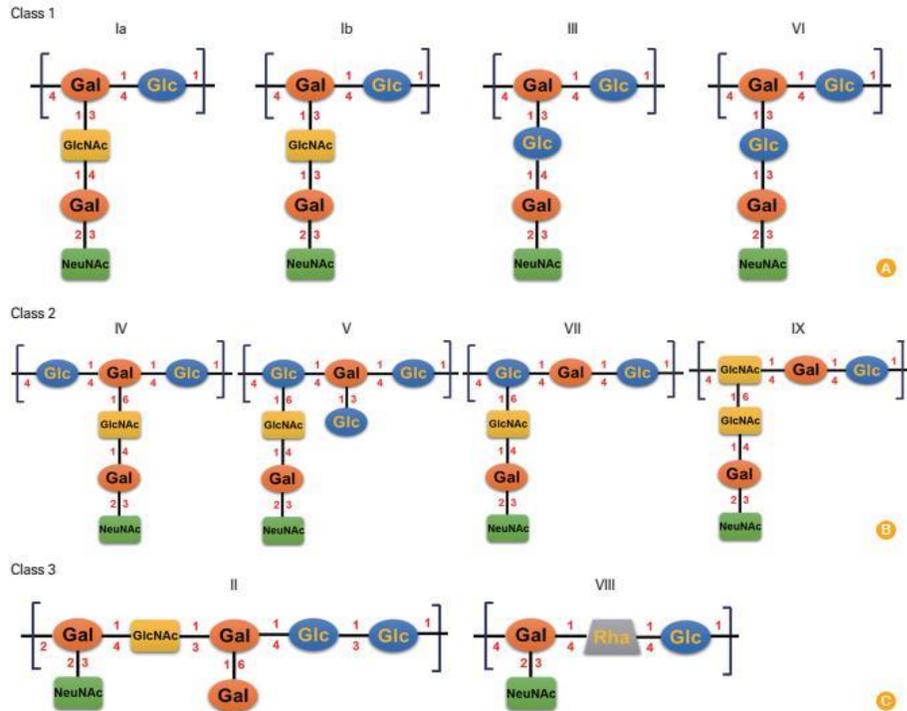


Figura 4. Unidades estructurales del polisacárido capsular de *S. agalactiae*. (Lin et al, 2018). El polisacárido se clasifica en 3 clases dependiendo de la similitud de sus estructuras químicas y las enzimas implicadas en el ensamble de las unidades de repetición. (A) clase 1: la unidad de repetición consiste en dos azúcares que contienen un enlace $\beta(1-3)$. Clase 2: la unidad de repetición consiste en 3 azúcares que contienen un enlace $\beta(1-6)$. Clase 3: no tiene similitud con ningún otro serotipo.

2.7 Patogénesis de *S. agalactiae*

Streptococcus agalactiae es una bacteria que se encuentra distribuida a nivel global y es la responsable directa de la infección neonatal temprana y uno de los programas de prevención más relevantes de la medicina perinatal (Figuroa et al. 2007). *S. agalactiae*, junto con *Listeria monocytogenes* y las enterobacterias, son la justificación para la aplicación del tratamiento de antibióticos (ampicilina-aminoglucósidos) para la sepsis neonatal temprana (Baker y Edwards 1995).

El proceso de infección humana por *S. agalactiae* es complejo y multifactorial. La patogénesis es mejor comprendida desde un punto de vista evolutivo de la relación existente entre la bacteria y su hospedero. La presión selectiva ha obligado a la bacteria a establecer una colonización transitoria o de larga duración en el humano y por lo tanto

asegurar una transmisión exitosa a un nuevo individuo que sea susceptible (Nizet et al. 2000).

Las complejas interacciones de la bacteria y el recién nacido que llevan a la manifestación de la enfermedad pueden ser divididas en varias categorías importantes (Tabla 2). El carácter multifuncional de los diversos factores de virulencia de *S. agalactiae*, representa un gran desafío para los mecanismos de defensa inmunitaria que no se encuentran del todo desarrollados en el recién nacido. Se ha identificado que en particular el polisacárido capsular, el cual permite al microorganismo evadir mecanismos de defensa como la fagocitosis (Hood et al. 1961) y la hemolisina secretada son de gran importancia para la virulencia (Palacios et al. 2017).

Tabla 2. Factores de virulencia de *S. agalactiae* y su papel en la transición de colonización a enfermedad invasiva (Palacios et al. 2017).

Factor de virulencia	Colonización	Adhesión	Invasión	Evasión del sistema inmunitario	Neurotropismo
Proteína A de unión a fibrinógeno (FbsA)	+	+			
Proteína B de unión a fibrinógeno (FbsB)			+		
Proteína de unión a laminina (Lmb)			+		+
Proteína alfa C (ACP)	+	+	+	+	
Proteína de repetición rica en serina (Srr)	+	+	+		
Pili	+	+	+	+	+
Adhesina hipervirulenta (HvgA)	+	+	+	+	+
Hemolisina-citolisina beta (β -H/C)	+	+	+	+	+
Polisacáridos capsulares (CPS)				+	
C5a peptidasa (ScpB)				+	
Factor H				+	
Antígeno beta de unión a IgA				+	
D-alanilación				+	
Superóxido dismutasa				+	
Hialuronato liasa				+	
Factor CAMP				+	
Ácido lipoteicoico		+		+	
Receptor de fibrinógeno		+		+	

La infección neonatal por *S. agalactiae* comienza con una colonización asintomática del tracto genital femenino. Aproximadamente entre 20-30% de mujeres sanas se encuentran colonizadas en el recto o la vagina por esta bacteria, lo que posteriormente da lugar a un

porcentaje elevado de niños colonizados por la bacteria (50-70%) que nacieron de las mujeres infectadas (Baker y Edwards 2001).

La infección neonatal por *S. agalactiae* se presenta en dos formas: aparición temprana y aparición tardía. Las infecciones de aparición temprana se clasifican epidemiológicamente por una aparición antes de los 7 días de edad, pero presenta una media de aparición de entre 6-8 h de vida del neonato, dando lugar a neumonía y falla respiratoria, las cuales suelen complicarse debido a la infección en el torrente sanguíneo y septicemia (Doran y Nizet 2004). La infección ascendente es la ruta ampliamente aceptada por la cual las bacterias presentes en la vagina se desplazan a través del cérvix hacia dentro del útero y penetran los tejidos gestacionales. (Figura 5). Una vez que *S. agalactiae* ha invadido la cavidad amniótica o entrado en contacto con la placenta existe el potencial para una corioamnionitis o inflamación de las membranas de la placenta que es asociada comúnmente con nacimientos prematuros y mortinatos (Romero et al. 2014), alternativamente la infección puede ocurrir por la aspiración de fluidos vaginales infectados durante el nacimiento (Doran y Nizet 2004). En contraste la infección tardía ocurre en infantes mayores de 7 días de edad, con síntomas graduales relacionados a la bacteriemia, sin compromiso pulmonar y una alta incidencia de meningitis (Baker y Edwards 2001). Una gran interrogante es ¿Cómo una bacteria inmóvil es capaz de subir hasta el útero mientras evade las respuestas inmunes del hospedero?

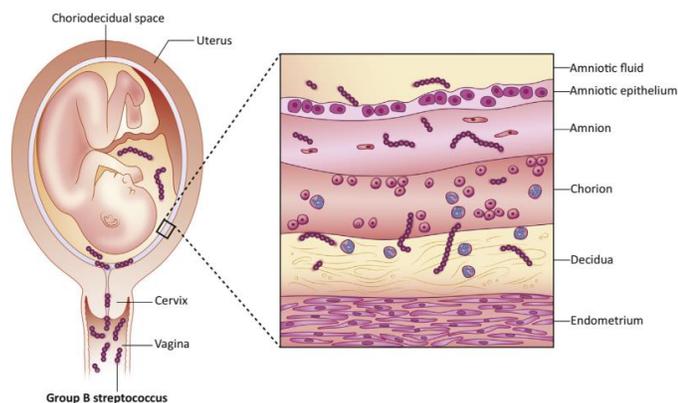


Figura 5. Infección ascendente por *Streptococcus agalactiae* (Vornhagen et al. 2017). La colonización vaginal incrementa el riesgo de infección ascendente durante el embarazo. La infección involucra el tráfico de bacterias desde la vagina que en últimas instancias lleva a la invasión bacteriana de las

membranas de la placenta (corion y amnios), la cavidad amniótica y finalmente el feto. *Streptococcus agalactiae* expresa diversos factores de virulencia que promueven la colonización vaginal, adhesión e invasión de las células del hospedero y por lo tanto activación o supresión de las respuestas inflamatorias.

En 2016, el grupo de Vornhagen et al, encontró que la actividad de la hialuronidasa permite a *S. agalactiae* subvertir las respuestas inmunes uterinas, dando lugar a un mayor número de infecciones ascendentes y partos prematuros, más tarde el mismo grupo describió que *S. agalactiae* induce exfoliación epitelial la cual se asocia con infección ascendente de un nicho comensal a uno invasivo (Figura 6) (Vornhagen et al. 2018).

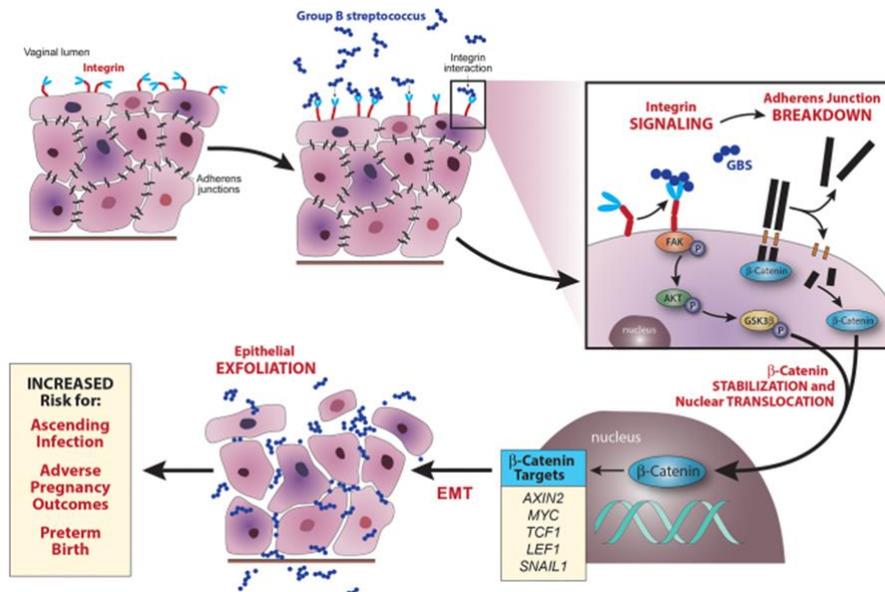


Figura 6. Modelo de exfoliación epitelial inducida por *S. agalactiae* e infección ascendente (Vornhagen et al. 2018). Después de la colonización por *S. agalactiae*, las integrinas son activadas directa o indirectamente por la bacteria. La activación de las integrinas induce la fosforilación de FAK, que a su vez fosforila AKT, el cual fosforila GSK3β. Mientras las uniones adherentes se rompen, β-catenina es liberada en el citoplasma. En su forma desfosforilada, GSK3β marca a β-catenina para su degradación, así previene la estabilización de la molécula, translocación al núcleo y su señalización. Sin embargo, cuando se encuentra fosforilada, no puede marcar a la β-catenina, dando lugar a su estabilización y transporte nuclear. Una vez en el núcleo la β-catenina estimula la expresión de diversos genes, incluyendo aquellos que desencadenan la transición epitelial a mesenquimal (EMT) y la exfoliación epitelial. En lugar de eliminar a *S. agalactiae*, la exfoliación permite la diseminación de la bacteria a

través de la pérdida de función de barrera. Esto lleva a un incremento en la infección ascendente, la cual aumenta las tasas de resultados adversos durante el embarazo y partos prematuros.

2.8 Enfermedad de inicio tardío, tardío

Se ha identificado otra forma de infección que se presenta después de los 90 días de vida y es causada principalmente por los serotipos III, Ia y V. Ocurre principalmente en lactantes que fueron prematuros, es decir que nacieron antes de las 32 semanas de gestación, también se ha observado en aquellos que permanecieron por un largo periodo de tiempo hospitalizados después del parto y en los que tienen alguna inmunodeficiencia, como son los infectados por el VIH, debido al estado de supresión inmune en que se encuentran. Clínicamente es similar a la enfermedad de inicio tardío, pudiendo presentarse una bacteriemia, meningitis, osteoartritis, celulitis, adenitis, etc. Su letalidad es menor del 5% (Pannaraj y Baker 2014; Wilson y Vaudry 1990).

2.9 *S. agalactiae* en adultos

Las infecciones causadas por *S. agalactiae* son notablemente más comunes en recién nacidos, pero también pueden causar infecciones en adultos, en los cuales puede provocar infección del tracto urinario, sepsis, artritis, neumonía y meningitis. Las personas de edad avanzada y aquellas con alguna enfermedad crónica, como la diabetes, cáncer o VIH, se encuentran más expuestas a sufrir severas infecciones causadas por *S. agalactiae* (Hirvonen 2017). Los síntomas de la enfermedad dependen significativamente de qué parte del cuerpo esté infectada.

Streptococcus agalactiae se encuentra implicada en diversas presentaciones clínicas, por ejemplo: infecciones de tejido blando y piel, así como infecciones del tracto urinario (Kerneis et al. 2017). La preocupación por la infección en adultos ha crecido en el ámbito clínico y se ha convertido en un centro de atención en salud pública, ya que la prevalencia de la bacteria ha aumentado debido a factores de riesgo como la diabetes y la vejez (Collin et al. 2019), lo cual implica aumentos considerables en los costos de programas sociales y de salud (Badia et al. 2017). Un reporte reciente encontró que *S. agalactiae* es un agente causal de un amplio rango de infecciones asociadas con el sistema de salud, entre las que destacan cesárea, cirugía vascular, ortopedia y cirugías de

busto (Collin et al, 2019). Lo cual se vuelve de interés debido a la normalidad con que se realizan estos procedimientos.

2.10 Serotipos

Los serotipos difieren en su potencial de virulencia. El serotipo III por ejemplo está asociado con una gran proporción de enfermedad en neonatos, particularmente la enfermedad de aparición tardía, la cual se presenta entre los 7 y 89 días de edad (Kapatai et al. 2017). En 1974, en países desarrollados se demostró que, si bien todos los serotipos de *S. agalactiae* eran capaces de causar infección neonatal, los aislamientos del serotipo III habían incrementado significativamente entre los neonatos con meningitis causada por este microorganismo (Baker y Barret 1974).

Adicionalmente el serotipo III se encuentra fuertemente asociado con casos de meningitis neonatal (Kapatai et al. 2017). La mayoría de los aislados del serotipo III pertenecen a una secuencia multilocus que está asociada con un mal pronóstico en el desenlace de la enfermedad (Bolger et al. 2014).

Una asignación precisa de los serotipos es importante particularmente para evaluar la distribución de serotipos en la cobertura de las vacunas y estudios de vigilancia post-vacunación (Kapatai et al. 2017). En un estudio realizado en el 2000 se encontró que el serotipo III y el Ia son los más frecuentes, representando un 75% de los aislados serotipificados. El serotipo V (9%) fue el siguiente con más frecuencia (Figura 7) (Andrews et al. 2000).

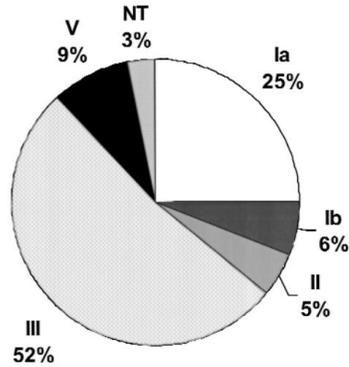


Figura 7. Distribución de serotipos de *S. agalactiae* (Andrews et al. 2000). Aislados colectados de enero de 1997 a diciembre de 1999, como parte del programa de vigilancia de resistencia antimicrobiana. NT, no-tipificable.

En EUA y Europa, los serotipos de *S. agalactiae* que causan enfermedad grave (conocida como invasiva) son predominantemente los Ia, Ib, II, III y V (Palacios et al. 2017). Una revisión global reciente de aislamientos invasivos demostró que el serotipo III es el más frecuentemente identificado en todas las regiones que disponen de datos (48.9%), seguido por los serotipos Ia (22.9%), V (9.1%), Ib (7%) y II (6.2%) (Le Doare y Heath 2013).

Debido a que el serotipo III causa más de dos tercios de los casos de enfermedad neonatal por *S. agalactiae*, la serotipificación fue propuesta como un método para predecir el riesgo de enfermedad grave o invasiva (del Pilar et al. 2014; Phares et al. 2008; Palacios et al. 2007). Sin embargo, el serotipo III también es aislado frecuentemente en recién nacidos colonizados asintóticamente, otros serotipos diferentes del III son aislados a menudo en la enfermedad de inicio temprano y hasta en un 10-15% de los casos las cepas han sido registradas como no-tipificables (Palacios et al. 2017). Sin embargo, la distribución de los serotipos cambia constantemente (Farley y Strasbaugh 2001). A diferencia de los datos obtenidos en EUA y Europa, en mujeres japonesas embarazadas se encontró una colonización predominante de los serotipos VI y VIII (Lachenauer et al. 1999), mientras que la enfermedad invasiva era causada principalmente por el serotipo VIII en un estudio realizado en Dinamarca (Ekelund et al. 2003). La distribución de serotipos tanto de cepas colonizadoras como invasivas se

encuentra en constante evolución y demuestra variación no solo regional sino también temporal (Sendi et al. 2008).

2.11 Transmisión

Se cree que *S. agalactiae* puede ser transmitido de persona a persona por múltiples rutas, por ejemplo, la fecal-oral, sexual y la transmisión vertical (Manning et al. 2004). Por otra parte, en la misma mujer, la proximidad de la vagina y el recto puede permitir el tráfico de la bacteria desde el microbioma intestinal hacia la vagina, aunque sigue sin comprenderse como realiza el proceso una bacteria inmóvil. Una vez que *S. agalactiae* entra en la vagina, la colonización requiere que la bacteria supere diversos retos, por ejemplo: barreras físicas creadas por el moco y las capas epiteliales, bajo pH, péptidos antimicrobianos, anticuerpos, células inmunes y el microbioma vaginal que es dominado predominantemente por el género *Lactobacillus*. (Vornhagen et al. 2017). A pesar de que tanto el ganado como los humanos constituyen reservorios naturales para la bacteria, se desconoce la especificidad del hospedero. Recientemente, se identificó mediante análisis filogenéticos que la transmisión horizontal y bidireccional entre humanos y ganado es altamente probable y que algunos casos de mastitis bovina son probablemente de origen antroponótico (Sørensen et al. 2019). Sin embargo, la transmisión horizontal no se limita a ganado, y puede abarcar especies como (Figura 8).

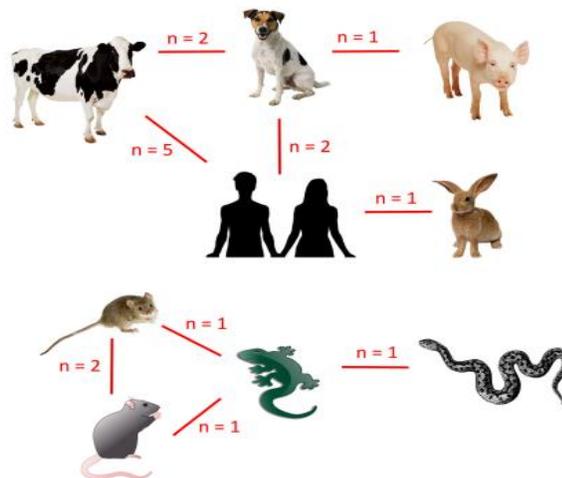


Figura 8. Transmisión horizontal de *S. agalactiae* (Morach et al. 2018). Diversas cepas han sido detectadas en muestras de más de una especie, indicando una transmisión interespecies. La imagen muestra las relaciones detectadas y su frecuencia.

2.12 Diagnóstico

Múltiples métodos para identificar y caracterizar a *S. agalactiae* con fines epidemiológicos y terapéuticos han sido descritos (Imperi et al. 2010). Los cuales incluyen serotipificación basada en el polisacárido capsular, tipificación de proteínas de superficie, tipificación de secuencias multilocus (MLST), análisis de repeticiones en tándem de número variable de multilocus (MLVA) y más recientemente ensayos utilizando CRISPR. (Furfaro et al. 2018).

Streptococcus agalactiae puede ser diagnosticado a partir de muestras clínicas de diferentes maneras. El cultivo es el método más utilizado para identificar a la bacteria, Sin embargo, también se pueden utilizar diversas técnicas moleculares. Mientras que los ensayos inmunológicos pueden ser usados principalmente para la identificación presuntiva de *S. agalactiae* (Baron 1996; Hirvonen 2017).

Streptococcus agalactiae es generalmente detectada de muestras cultivadas. Puede crecer tanto en placas de agar como en medio líquido de crecimiento. Usualmente se utiliza el medio agar sangre para poder identificar si existe una hemólisis de tipo beta. Su temperatura óptima de crecimiento es alrededor de 37°C (Versalovic et al. 2011). Puede crecer a partir de muestras en agar sangre no-selectivo. El uso de medio de crecimiento selectivo que contenga antibióticos, que inhiban el crecimiento de otras bacterias, incrementa la especificidad de muestras genitales y rectales (Eschenbach 2017). El cultivo generalmente es hecho utilizando la técnica de estría en placa, la cual es utilizada para aislar colonias individuales (Hirvonen et al. 2017). Después de la inoculación el medio de crecimiento es incubado a 35°C-37°C de 18 a 24 h (Versalovic et al. 2011).

El estreptococo puede ser identificado a partir de placas de cultivo, mediante pruebas como ELISA, inmunoensayo antigénico de Lancefield, CAMP, catalasa, hipurato y pruebas de aglutinación de latex. El agrupamiento de Lancefield es una forma confiable de identificar a *S. agalactiae*, ya que es la única especie de estreptococo que presenta el antígeno de Lancefield en su superficie (CDC, 2017). La prueba de CAMP puede ser utilizada para la identificación presuntiva de la bacteria ya que la mayoría de los aislados

de *S. agalactiae* producen una proteína extracelular llamada factor CAMP. La hemólisis beta de *Staphylococcus aureus* y el factor CAMP de *S. agalactiae* lisan a los eritrocitos de forma sinérgica, por tal motivo es posible observar una hemólisis beta potenciada sobre placas de agar sangre (Versalovic 2011; Picard y Bergeron 2004). *S. agalactiae* tiene la habilidad de hidrolizar el hipurato, sin embargo, no es la única especie de estreptococo que puede hacerlo, por lo tanto, esta prueba solo puede ser utilizada como identificación presuntiva (Versalovic et al. 2011). A pesar de que se cree que el cultivo es el estándar de oro para el diagnóstico, no es 100% sensible y resultados falso negativo pueden ocurrir debido a que otras bacterias de la muestra pueden inhibir el crecimiento de *S. agalactiae*, incluso en un medio selectivo (Meehan et al. 2015).

Debido a que no existe una vacuna disponible comercialmente contra *S. agalactiae* (de Zoysa et al. 2012), un diagnóstico rápido es importante y por lo tanto existe una necesidad por un método de detección rápido y específico. Existen múltiples kits de PCR comerciales que actúan sobre diversos genes como *dltR*, *sip*, *cfb*, y *cylB* para la detección de *S. agalactiae*. Su sensibilidad y especificidad es superior al 90% (Meehan et al. 2015; Alfa et al. 2010; Burke et al. 2016), adicionalmente la PCR es mucho más rápida que el cultivo ya que da un resultado en alrededor de 2 horas a partir de la recepción de las muestras (Burke et al. 2016). Otra prueba basada en ácidos nucleicos es LAMP, donde el DNA es amplificado a 60-65°C sin ciclos térmicos. La prueba actúa sobre distintos genes, por ejemplo, *cfb* y *sip*. su sensibilidad y especificidad es mayor a la PCR, alcanzando un 95% de especificidad, además tarda entre 45 y 75 minutos en emitir un resultado (McKenna et al. 2017; Acharya 2015).

2.13 Tratamiento

Grandes esfuerzos se han dirigido hacia la prevención de la infección por *S. agalactiae*. las recomendaciones actuales se centran en el monitoreo de la madre para buscar a la bacteria y en la profilaxis con antibióticos intraparto (ACOG 2011). El tratamiento depende de la enfermedad que apareció debido a la infección por *S. agalactiae*, la bacteria se trata con antibióticos como la penicilina o ampicilina, según el reporte realizado por los CDC en 2017. La profilaxis con antibióticos intraparto ha demostrado ser altamente eficiente para prevenir la transmisión del patógeno al recién nacido, sin

embargo, se ha reportado que, a pesar de recibir el tratamiento de forma adecuada, las complicaciones por *S. agalactiae* aparecerán en algunas ocasiones de forma inevitable (Kao et al. 2019).

Recientes esfuerzos se han enfocado en la vacunación de la madre contra *S. agalactiae*, lo cual también tendría beneficios en el neonato (Donders et al. 2016). La colonización de la madre ha sido asociada con diversos problemas de salud como fiebre, corioamnionitis, endometritis, complicaciones en cesárea e infecciones post quirúrgicas (Edwards et al. 2019).

En un estudio publicado por Edwards et al. en 2019 se analizaron los datos históricos de 60,029 pacientes entre 2003 y 2015. Los datos muestran que un 21.6% de la población se encontraba colonizada por *S. agalactiae* y 0.1% desarrolló enfermedad invasiva. La colonización se encontró asociada con las madres de menor edad, raza negra, etnicidad no hispánica, hipertensión crónica, diabetes previa y el uso de tabaco (Tabla 3).

Tabla 3. Características clínicas y demográficas por estado de *S. agalactiae* (Edwards et al. 2019).

	GBS Negative (N=47,013)	GBS Colonized (N=12,952)	Invasive GBS (N=64)	P Value ¹	P Value ²
Age at delivery (years)					
Mean (SD)	28.7 (6.2)	28.0 (6.2)	28.1 (6.4)	<.001	0.95
Race, n (%)					
Black or African American	14012/44293 (31.6%)	5660/12379 (45.7%)	39/64 (60.9%)	<.001	0.05
White or Caucasian	20325/44293 (45.9%)	4740/12379 (38.3%)	19/64 (29.7%)	-	-
Other	9956/44293 (22.5%)	1979/12379 (16.0%)	6/64 (9.4%)	-	-
Ethnicity, n (%)					
Hispanic	7506/44657 (16.8%)	1467/12443 (11.8%)	2/63 (3.2%)	<.001	0.08
Not Hispanic	35580/44657 (79.7%)	10611/12443 (85.3%)	58/63 (92.1%)	-	-
Other	1571/44657 (3.5%)	365/1244 (2.9%)	3/63 (4.8%)	-	-
Antibiotic use					
Inpatient antibiotic administered during pregnancy prior to delivery	1590/47013, 3.4%	1271/12952, 9.8%	3/64, 4.7%	<0.001	0.17
Risk factors, n (%)					
Chronic hypertension	3366/47013 (7.2%)	1112/12952 (8.6%)	16/64 (25.0%)	<0.001	<.001
Pre-existing diabetes	1294/47013 (2.8%)	456/12952 (3.5%)	10/64 (15.6%)	<0.001	<.001
Autoimmune disorder	310/47013 (0.7%)	72/12952 (0.6%)	0/64 (0%)	0.19	1.00
Chronic infectious disease ³	368/47013 (0.8%)	106/12952 (0.8%)	1/64 (1.6%)	0.69	0.41
Tobacco use	5887/33129 (17.8%)	2010/9674 (20.8%)	14/51 (27.5%)	<0.001	0.23

¹ P value for comparison of GBS negative versus GBS colonized.

² P value for comparison of GBS colonized versus invasive GBS.

³ Human immunodeficiency virus, hepatitis B, and hepatitis C.

P value from t-test or Chi-square or Fisher's exact test.

A pesar de los distintos enfoques, no ha sido posible eliminar la infección neonatal, debido a que las estrategias de prevención no toman en cuenta el riesgo de una infección ascendente, la cual puede ocurrir potencialmente en cualquier momento del embarazo, llevando a un embarazo prematuro o a un mortinato. (Lawn et al. 2017) El monitoreo de la región recto vaginal en mujeres embarazadas y la profilaxis intraparto con antibióticos a las mujeres positivas es una de las principales opciones preventivas. Sin embargo, la estrategia presenta algunas limitaciones por lo que existe una necesidad de enfoques alternos. Recientemente se ha reportado que el consumo de *Lactobacillus salivarius* CECT9145 parece ser un eficiente método para reducir el número de mujeres embarazadas positivas para *S. agalactiae* (Martin et al. 2019).

2.14 Epidemiología

La aplicación de herramientas moleculares a problemas epidemiológicos se ha vuelto cada vez más popular e importante para los proveedores de servicios de salud, científicos e investigadores de diferentes áreas. La epidemiología molecular puede ser utilizada para examinar patrones de enfermedades, investigar brotes, describir la

transmisión, dinámica de las poblaciones, entender la evolución, patogénesis y para identificar organismos no cultivables (Foxman y Riley 2001; Skuce y Neill 2001).

Análisis recientes sugieren una tasa de colonización a nivel global en mujeres embarazadas de 18%, con variaciones regionales desde 11 hasta 35%. Los países en el sur y este de Asia tienen reportadas las prevalencias más bajas (11 a 12.5%), mientras que el Caribe cuenta con la prevalencia más alta (34.7%) (Russell et al. 2017). La estimación de enfermedad neonatal a nivel mundial es de 0.49 por cada 1000 nacimientos, con la incidencia más alta en África 1.12 por cada 1000 nacimientos y la más baja en Asia con 0.30 por cada 1000 nacimientos (Madrid et al. 2017). Cinco serotipos (Ia, Ib, II, III y V) comprenden aproximadamente el 97% de los problemas causados por la bacteria, sin embargo, es importante estudiar todos debido a que la dinámica de los serotipos tiene el potencial de cambiar (Furfaro et al. 2018).

2.15 Epidemiología en México

Las cifras de infección neonatal en México por *S. agalactiae* son bajas (Reyna et al. 2005). En la década de los 80s se identificaron los primeros casos de mujeres colonizadas en nuestro país (Collado et al. 1981), sin embargo, eso no fue suficiente para comenzar a buscar al patógeno de forma intencional. Los pocos estudios publicados sobre el tema presentan una elevada variabilidad entre ellos (Tabla 4), dificultando la obtención de datos concluyentes sobre la epidemiología en el país.

Tabla 4. Prevalencia de colonización ocasionada por *S. agalactiae* en mujeres embarazadas (Figuroa et al. 2007).

<i>Estudio</i>	<i>Colonizados</i>	<i>No colonizados</i>	<i>Total muestra</i>	<i>Prevalencia (%)^a</i>	<i>p^b</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	-

^a Prevalencia (%) = colonizados x 100/total de la muestra

^b 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.

Las tasas de colonización en Latinoamérica oscilan entre el 2 y 20.4% (Reyna-Figueroa et al. 2008; SLIPE 2014; Palacios et al. 2017), mientras que la infección neonatal grave alcanza valores que oscilan entre el 0.3-1% de los recién nacidos vivos. La baja incidencia ha provocado que no se utilice de forma rutinaria la profilaxis con antibióticos durante el parto, lo cual ayudaría a prevenir la transmisión del patógeno al recién nacido (Reyna et al. 2005; Villaseñor et al. 2004). Por otra parte, algunos estudios han sugerido porcentajes de colonización vaginal en mujeres embarazadas de hasta un 20% y una tasa de infección neonatal de 1/1500 recién nacidos vivos con una letalidad del 38.5% (Palacios et al. 2017). Una encuesta seroepidemiológica de alcance nacional en la que se evaluó la presencia de anticuerpos contra el antígeno del grupo de *S. agalactiae* en mujeres entre los 15 y los 40 años de edad demostró una elevada frecuencia de exposición al estreptococo en la población mexicana, con una seroprevalencia del 90% (Palacios-Saucedo et al. 2002), lo cual se esperaría de un componente de la microbiota del humano.

2.16 Nuevas estrategias contra *S. agalactiae*

Durante los últimos años se han logrado múltiples avances en el diagnóstico y tratamiento de *S. agalactiae*, sin embargo, ha continuado siendo un problema de salud global. Por tal motivo en el año 2014, la Organización Mundial de la Salud (OMS) convocó al primer encuentro para consultar sobre el desarrollo de una vacuna efectiva contra el patógeno (Giersing et al. 2015). La vacunación parece ser la estrategia de prevención más prometedora para prevenir la infección por *S. agalactiae*, sin embargo, actualmente no existe ninguna en el mercado. Lo anterior, la falta de especificidad por parte de las pruebas de detección actuales y la prevalencia de la bacteria en diversas poblaciones resaltan la importancia de desarrollar una vacuna para controlar la infección lo antes posible (Lin et al. 2018). Debido a la importancia del polisacárido capsular en la patogénesis de *S. agalactiae* es considerado el principal candidato para el desarrollo de la vacuna, basándose en los 5 serotipos de mayor prevalencia 1a, 1b, II, III y V (Madrid et al. 2017). Novartis ha desarrollado una vacuna conjugada trivalente (Ia, Ib y III) y conducido un ensayo clínico de fase 1b/2 (NCT01193929) en infantes nacidos de mujeres inmunizadas con la vacuna (Madhi et al. 2017). En los bebés nacidos de las madres inmunizadas el nivel de anticuerpos específicos contra el polisacárido fue mayor

al momento de nacer que a los 43 y 91 días, indicando que la inmunización de la madre protege a los infantes con transferencia de anticuerpos específicos a través de la placenta. Por su parte en 2017, Pfizer comenzó a evaluar una vacuna pentavalente (Ia, Ib, II, III y V) en fase clínica 1 en voluntarios sanos (NCT03170609) (Lin et al. 2018).

Lamentablemente no todos son resultados positivos y la estrategia de vacunación aún cuenta con diversas limitaciones por ejemplo interferencia inmune con vacunas similares como *Hemophilus influenzae* tipo b, meningococo y vacunas conjugadas de neumococo, problemas con el reemplazo y cambio de serotipos, así como una diversa distribución entre las regiones geográficas (Teatero et al. 2017). Por otra parte, han aumentado los reportes que muestran cepas de *S. agalactiae* no encapsuladas, lo cual es una limitante para el uso de una vacuna contra el polisacárido capsular (Toyofuku et al. 2017). A pesar de que existen ciertos problemas sin resolver con respecto a la vacuna, su aplicación es la estrategia más prometedora en la prevención de las infecciones por *S. agalactiae* tanto en recién nacidos como en adultos afectados.

2.16.1 Detección ultra rápida, sensible y cuantitativa en chip de *S. agalactiae*

El diagnóstico de las infecciones microbianas tradicionalmente se basa en las técnicas de cultivo, seguidas por pruebas bioquímicas o de susceptibilidad a antibióticos para así tomar decisiones clínicas. Recientemente, se han utilizado pruebas moleculares después del enriquecimiento (El-Aila et al. 2011), especialmente, en casos donde una detección rápida o tratamiento es necesario.

Nuevas tecnologías integran la preparación de la muestra y la PCR en un flujo de trabajo automatizado con poca manipulación como Xpert® de Cepheid, con un tiempo aproximado de 1 h para obtener un resultado (Farrar et al. 2015). El reto para disminuir los tiempos de amplificación en PCR depende de los equipos y no de la naturaleza química de la reacción, algunos ejemplos de intentos por lograr el objetivo son el uso de un fluido oscilatorio (Brunklau et al. 2012), mezclas de reacción estáticas (Neuzil et al. 2006) o termalización con base líquida (Wheeler et al. 2011) las cuales han disminuido los tiempos de PCR a 15 s (Farrar et al. 2015), sin embargo, no han sido probadas a profundidad en la clínica y se desconoce su preciso valor diagnóstico. Por tal motivo, el

grupo de Cai et al. en 2019 diseñó un chip UF-qPCR de silicón (Figura 9) para la detección de *S. agalactiae*. El monitoreo actual para *S. agalactiae* es realizado durante la última etapa del embarazo, en la semana 35 de gestación, las mujeres positivas reciben profilaxis con antibióticos cuando entran en labor de parto. Sin embargo, debido a la colonización por parte de la bacteria, *S. agalactiae* puede aparecer o desaparecer en un día, lo que hace que muchas mujeres reciban antibióticos innecesariamente y otras que lo necesitan no lo reciban, afectando directamente a la salud de la madre y del recién nacido, lo cual resalta la importancia de una técnica para detectar a la bacteria cuando la mujer llega al hospital para labor de parto y tomar una decisión correcta sobre administrar o no el tratamiento (Cools et al. 2017).

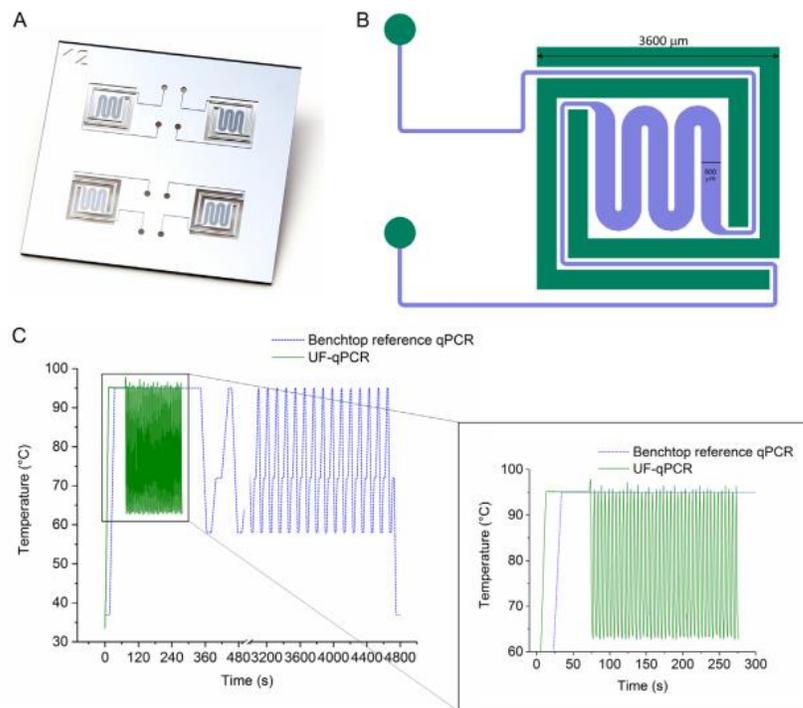


Figura 9. Chip de silicón usado para realizar UF-qPCR (Cai et al, 2019). A) Fotografía del chip de silicón con 4 cámaras de reacción, rodeadas por trincheras aislantes. B) Diseño del chip de silicón con un reactor aislado de 3600 µm. C) Temperatura contra tiempo del ensayo de referencia qPCR contra UF-qPCR. El recuadro muestra que la UF-qPCR ha concluido antes de que finalice la desnaturalización inicial de la qPCR de referencia.

Un ensayo regular de qPCR toma al menos 1h en completarse, mientras que la prueba UF-qPCR en chip tarda aproximadamente 4m 36s. La reducción del tiempo solo fue posible al incrementar la concentración de polimerasa y primers (Montgomery et al. 2013). Es importante resaltar que la velocidad de la reacción no disminuyó la especificidad de la prueba. Los resultados obtenidos en el estudio indican que es posible cuantificar y detectar ácidos nucleicos de *S. agalactiae* mediante qPCR en 5m (Cai et al. 2019). Lo cual de ser incorporado en la clínica tendría un valor incalculable en el beneficio a las mujeres afectadas y sus hijos, previniendo el uso innecesario de antibióticos, los cuales pueden ser sumamente dañinos en las primeras etapas de la vida y por otra parte se eliminarían las decisiones basadas en guías o señalamientos que en muchas ocasiones no son precisos y pueden llevar a las personas involucradas en los servicios de salud a tomar decisiones erróneas en padecimientos perfectamente tratables.

2.16.2 Aplicación de bacteriófagos para la detección de *S. agalactiae*

Para el cultivo de *S. agalactiae*, Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), recomiendan un cultivo enriquecido, seguido de una identificación convencional de *S. agalactiae* (Rosa-Fraile y Spellerberg 2017). En la prueba de cultivo, se realiza un hisopado de la vagina y las áreas anorrectales, después las muestras son inoculadas y cultivadas en un caldo de cultivo enriquecido que sea selectivo para *S. agalactiae*. Después del cultivo enriquecido la identificación de la bacteria se realiza mediante la prueba de CAMP, identificación serológica, crecimiento en agar cromogénico y amplificación de ácidos nucleicos (Rosa-Fraile y Spellerberg 2017). Sin embargo, a pesar de utilizar un caldo enriquecido, *S. agalactiae* es pobremente recuperado junto con un crecimiento excesivo de *Enterococcus faecalis*. Esto puede llevar a un resultado falso negativo en la identificación, por tal motivo los agentes antimicrobianos pueden ser una opción para obtener resultados más precisos (Uchiyama et al. 2018).

Los bacteriófagos, son virus que infectan bacterias. Algunos fagos infectan y lisan bacterias con una especificidad que alcanza el nivel de especie, lo cual los hace útiles para eliminar bacterias no deseadas que se encuentren en una muestra y facilitar el aislamiento de bacterias menos prevalentes (Kurtböke 2005). Por lo tanto, la aplicación

de fagos puede ser utilizada para reducir el crecimiento indeseado de *E. faecalis* en un cultivo para la detección de *S. agalactiae*. Previamente, se han aislado fagos que infectan específicamente a *E. faecalis* de muestras ambientales como aguas residuales y canales de agua (Khalifa et al. 2015; Uchiyama et al. 2008). Por tal motivo, el grupo de Uchiyama *et al.* en 2018 examinó la utilización de fagos específicos contra *E. faecalis* para suprimir su crecimiento en cultivos que buscan la identificación de *S. agalactiae*. Para determinar la eficiencia de los fagos, evaluaron el crecimiento de co-cultivos de *S. agalactiae* y *E. faecalis* en un agar cromogénico (Figura 10).

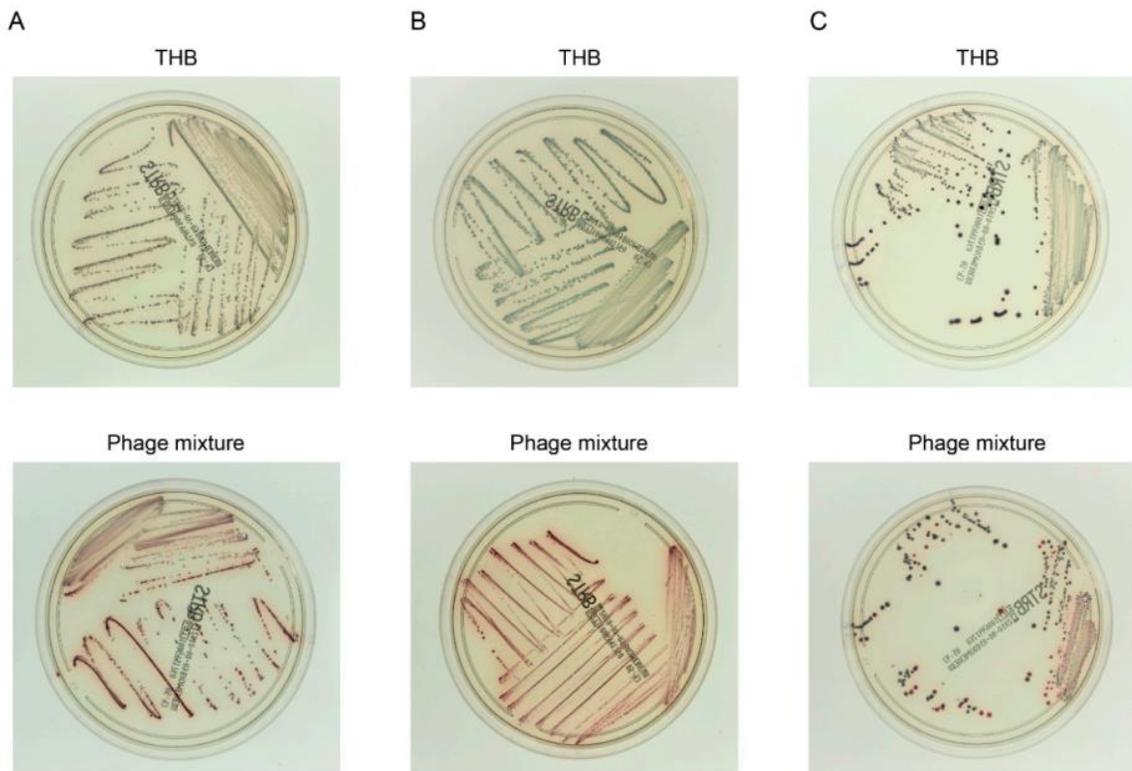


Figura 10. Identificación bacteriana en agar cromogénico después de un co-cultivo enriquecido de *S. agalactiae* y *E. faecalis* (Uchiyama et al. 2019). Combinaciones de una cepa de *E. faecalis* y *S. agalactiae* fueron usadas para inocular GtB (agar granada) y fueron cultivadas en presencia de la mezcla de fagos o en caldo Todd-Hewitt (THB). Después del enriquecimiento, alícuotas fueron sembradas en agar cromogénico y las colonias resultantes fueron evaluadas. Las colonias de *S. agalactiae* y *E. faecalis* son rojas y azules, respectivamente. Cepas de fagos utilizadas (A) KUGBS2-KUEF08, (B) KUGBS1-KUEF24 y (C) KUGBS6-KUEF26.

Con los experimentos anteriores se demostró que una mezcla específica de fagos es efectiva para inhibir el crecimiento de *E. faecalis* en un co-cultivo con *S. agalactiae*. Sin

embargo, otras consideraciones deben ser contempladas si se pretende introducir de forma comercial. Por ejemplo, la presencia de cepas que no sean sensibles a la mezcla de fagos, lo cual requiere una evaluación constante de los componentes presentes en la muestra de fagos y de ser necesario reemplazar cada cierto tiempo los fagos utilizados (Ando et al. 2015).

Por otra parte, la calidad de los fagos debe permitir su comercialización, los cuales son estables generalmente a 4°C en medio de cultivo (Lobočka y Glowacka 2018), lo cual sugiere que podrían ser comercializados sin problema. Finalmente, el uso de la mezcla de fagos debe ser costo-efectiva, lo cual es posible gracias al uso de biorreactores empleados por el reciente interés en distintas terapias que utilizan fagos, el precio calculado se encuentra estimado en $\$4.4 \times 10^{-13}$ por partícula (Agboluaje y Sauvageau 2018).

2.17 Citocinas

Mecanismos de defensa específicos y no específicos se encuentran involucrados en la respuesta a la infección por *S. agalactiae*. Es bien sabido que las citocinas juegan un rol central en la inducción de las respuestas inmunes específicas y no específicas contra bacterias (Rosati et al. 1998).

La respuesta inmune en vertebrados utiliza un arreglo de receptores en células del sistema inmune para reconocer a los patógenos invasores. Estos receptores específicos de antígeno incluyen los expresados por las células B y T, los cuales detectan epítopos específicos (antígenos). Adicionalmente, grupos específicos de patógenos son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) expresados principalmente por células del sistema inmune innato. PRR actúan como un sensor de microbios, detectando patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Algunos PRR bien caracterizados incluyen receptores tipo Toll (TLR) y receptores de lectina tipo C (CLR), así como receptores tipo NOD (NLR) citoplasmáticos. Patrones moleculares asociados a daño (DAMP) son liberados por células sometidas a diversos tipos de estrés, se unen a PRR y contribuyen en general a la respuesta inmune (Rivera et al. 2016).

Algunos microbios patógenos, incluyendo muchos virus, bacterias y parásitos intracelulares, desencadenan una inmunidad de tipo 1, con elevación en la expresión de citocinas específicas como IL-17, IFN- γ . En contraste, patógenos multicelulares, como los helmintos, estimulan una respuesta inmune de tipo 2, con elevaciones en IL-4 e IL-13 (Gause et al. 2013). El ligando específico reconocido por células del sistema inmune innato no tiene que ser procesado o presentado, por lo tanto, la respuesta innata se desarrolla más rápidamente que la adaptativa. Así, el tipo de respuesta inmune que se desarrolla durante la infección es comúnmente determinado antes de la activación de las células T y B. Por lo tanto, los eventos en microambientes tejido-específicos que inician una respuesta inmune innata, incluidas las interacciones entre células del sistema inmune innato, son críticos para entender la naturaleza de la respuesta inmune (Rivera et al. 2016). Células del sistema inmune innato incluyen células mieloides y células linfoides (ILC). Al igual que las células T y B, las ILC incluyen a las células NK, desarrolladas a partir de un progenitor linfoide común. De cualquier manera, las células NK no expresan receptores específicos de antígeno (Sonnenberd y Artis 2015).

Las células mieloides incluyen monocitos, macrófagos, células dendríticas y granulocitos (eosinófilos, basófilos y neutrófilos). A pesar de que históricamente los macrófagos y neutrófilos fueron asociados con infecciones microbianas y los basófilos, mastocitos y eosinófilos con infecciones por helmintos, se ha vuelto más claro que cada uno de estos tipos celulares es comúnmente activado en respuesta a un amplio rango de estímulos como microbios y patógenos multicelulares. Por ejemplo, los macrófagos son activados clásicamente (M1) en respuesta a muchos microbios patogénicos, pero son activados alternativamente (M2) en respuesta a helmintos (Murray et al. 2014).

Las citocinas liberadas de las células inmunes innatas juegan roles centrales en la regulación de la respuesta inmune. Estos mensajeros intracelulares son la fuente de las señales regulatorias solubles que inician y restringen las respuestas inflamatorias en respuesta a patógenos y heridas (Lacy y Stow 2011). La producción y liberación de citocinas a partir de células inmunes innatas son respuestas críticas a la inflamación y a la infección del individuo, estos mediadores comprometen a las poblaciones de glóbulos blancos tales como células dendríticas (DC), neutrófilos, células NK, monocitos,

eosinófilos y basófilos, junto con mastocitos residentes de tejido y macrófagos (Iwasaki y Medzhitov 2010). Residiendo en la primera línea de defensa en la inmunidad, estas células controlan las invasiones oportunistas de una amplia gama de virus, hongos, bacterias y parásitos, en parte por la liberación abundante de citocinas y quimiocinas para comunicarse con otras células y por lo tanto orquestar la respuesta inmune (Lacy y Stow 2011). Esta colección de mediadores solubles secretados por diferentes células inmunes innatas incluye TNF- α , IFN- γ , interleucinas IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, CCL4/RANTES, MCP-1 y TGF- β . La liberación de citocinas puede ser directamente evocada por inmunoglobulinas o señalización mediada por receptores del complemento o por patógenos a través de un diverso arreglo de receptores celulares, incluyendo PRR (Iwasaki y Medzhitov 2010; McGettrick y O'Neill 2007).

Para que el sistema inmune funcione apropiadamente, la síntesis y liberación de citocinas debe estar altamente regulada, secuencial y temporalmente orquestada. Así, la cascada de citocinas liberadas por las células inmunes innatas inicialmente monta una respuesta inflamatoria o alérgica y después asegura que la respuesta disminuya de manera oportuna (Hu y Ivashkiv 2009). Las citocinas pro-inflamatorias también sirven para reclutar y activar linfocitos T y otras células para montar una respuesta inmune adaptativa (Iwasaki y Medzhitov 2010).

2.18 Modelo murino de *S. agalactiae*

Es sumamente difícil replicar con fidelidad las complejas interacciones de los factores que existen en el ambiente de la vagina humana en un modelo animal. Sin embargo, los modelos murinos de persistencia bacteriana en el tracto cervicovaginal previamente han producido resultados útiles y permitido el estudio de las interacciones entre el hospedero y el microbioma en un ambiente más representativo (Sheen et al. 2011). Modelos de colonización vaginal e infección han sido utilizados para demostrar la susceptibilidad de los ratones a múltiples microbios, incluyendo *Neisseria gonorrhoeae* (Jerse 1999), *Chlamydia* (Vonck et al. 2011), *Mycoplasma genitalium* (McGowin et al. 2010), *Escherichia coli* (Pascual et al. 2010), *Candida albicans* (Riley y McGregor, 1986), virus de herpes simple tipo 2 (Parr et al. 1994), *Trichomonas vaginalis* (Escario et al. 2010) y *Trichomonas foetus* (Agnew et al. 2008). Experimentos de colonización

confirman que *S. agalactiae* puede ser inoculado dentro de la cavidad vaginal del ratón y ser aislada a niveles cuantificables en un periodo entre 8 y 12 días después de la inoculación (Sheen et al. 2011), estos datos corresponden con reportes previos en modelos murinos de infección vaginal para otros patógenos (Pascual et al. 2010; Zarate y Nader-Macias 2006).

Una limitación del modelo murino es que la microbiota de la vagina del ratón parece ser diferente a la de los humanos; sin embargo, estudios previos han demostrado que los estreptococos pueden ser aislados de la vagina del ratón (Agnew et al. 2008; McGrory y Garber 1992; Noguchi et al. 2003). No se sabe si el ratón alberga de forma natural a *S. agalactiae*, pero es probable que dependa de la cepa del ratón, otros microbios presentes y la etapa del estro (Sheen et al. 2011).

En un estudio previo se encontró que la expresión citolisina/beta-hemolisina en *S. agalactiae* es crítica para la enfermedad fetal y el parto prematuro en un modelo de embarazo murino (Randis et al. 2014). Sin embargo, los mecanismos moleculares que gobiernan la persistencia vaginal por *S. agalactiae* esperan ser elucidados.

En 2014, Carey et al. caracterizaron el primer modelo murino de colonización crónica del tracto vaginal con *S. agalactiae*. Encontrando una activación local de sistemas de vigilancia inmune, los cuales indujeron un infiltrado celular de linfocitos y polimorfonucleares en las capas superficiales de la mucosa vaginal e indujeron la producción de múltiples mediadores inflamatorios.

Patras et al. en 2015 evaluaron la actividad de tres diferentes cepas de *S. agalactiae* para colonizar el tracto vaginal en un modelo murino y descifrar aspectos de su respuesta inmune, encontraron que las cepas de *S. agalactiae* activan de forma diferente la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedero. Por primera vez, se examinó la presencia de *S. agalactiae* y la respuesta inmune del hospedero en el cérvix y en el útero de un ratón no embarazado.

S. agalactiae es única, cuenta con la habilidad de causar una enfermedad aguda pero también puede colonizar el tracto vaginal de forma asintomática por largos periodos de

tiempo. El estilo de vida de la bacteria no se ha comprendido por completo y el papel de los factores de virulencia y las respuestas del hospedero aún son desconocidos en gran parte (Carey et al. 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

La infección por *Streptococcus agalactiae* es un problema de salud global, su patogénesis puede evolucionar de distintas maneras y dar origen a escenarios tan diversos en el neonato como la enfermedad de aparición temprana, enfermedad de aparición tardía y la enfermedad de aparición tardía – tardía, sin embargo, sus efectos no se limitan a los recién nacidos, también puede ocasionar distintos problemas de salud en mujeres adultas.

Los factores que determinan la forma de evolución de la enfermedad aún no se encuentran bien esclarecidos, y la evidencia actual sugiere que elementos tanto de la bacteria como del hospedero desempeñan un papel clave en el desarrollo de la infección. *S. agalactiae* cuenta con un antígeno capsular específico que permite clasificarlo en 10 serotipos diferentes, cada uno de los cuales tiene propiedades particulares. Por tal motivo, es de suma importancia identificar las variaciones que pudieran existir al montarse una respuesta inflamatoria por parte del hospedero en respuesta a la infección por la bacteria.

Diversos modelos murinos previamente han mostrado su eficacia en el estudio de enfermedades infecciosas, ya que brindan una plataforma que permite evaluar de una mejor manera las interacciones que ocurren entre el hospedero y el patógeno, permitiendo obtener resultados muy valiosos que ayudan a esclarecer los procesos involucrados en el proceso infeccioso. Por tal motivo un modelo murino permitirá evaluar de forma adecuada si existen diferencias en la activación de una respuesta inflamatoria, en respuesta a las diferentes configuraciones del polisacárido capsular de distintos serotipos de *S. agalactiae*.

El entender cómo los distintos serotipos de la bacteria impactan en la expresión de las citocinas proinflamatorias por parte del hospedero, ayudará a que en un futuro se puedan proporcionar tratamientos personalizados, que sean más eficientes a las mujeres infectadas y por lo tanto mejoren el pronóstico de la infección tanto en ellas como en sus hijos.

4. HIPÓTESIS

La infección por distintos serotipos de *S. agalactiae* se relaciona con una expresión diferencial de citocinas proinflamatorias en un modelo murino de infección por *S. agalactiae*.

5. OBJETIVO

Determinar la expresión diferencial de citocinas proinflamatorias en un modelo murino de infección por distintos serotipos de *S. agalactiae*.

5.1 Objetivos particulares

1. Identificar al menos 5 serotipos de *S. agalactiae*.
2. Analizar la capacidad de los serotipos de *S. agalactiae* de colonizar el tracto vaginal de ratones BALB/c.
3. Evaluar la expresión de citocinas inflamatorias involucradas en la respuesta inmune contra distintos serotipos *S. agalactiae*.
4. Analizar los niveles de IgG total en respuesta a la infección por *S. agalactiae* en el modelo murino.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Lugar de trabajo

Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

6.2 Diseño del estudio

El estudio consiste en realizar un modelo murino de infección por *S. agalactiae* y evaluar si existe una expresión diferencial de citocinas proinflamatorias en respuesta a distintos serotipos de la bacteria.

6.3 Consideraciones éticas

Todo el trabajo experimental realizado en ratones fue autorizado por el Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas, (CEIBA) de la UANL, con No. De registro CEIBA-2018-027.

6.4 Aislamiento de *S. agalactiae*

Streptococcus agalactiae fue aislado a partir de las muestras de hisopados vaginales de mujeres embarazadas con que se contaba en el laboratorio de infectología molecular L3. Las muestras se dejaron descongelar a temperatura ambiente y posteriormente fueron incubadas en caldo Todd Hewitt (Oxoid, Hapshire, UK) a 37°C durante 18 h. Después se evaluó la presencia de turbidez en el medio, las muestras que fueron positivas fueron sembradas mediante estría en placas de agar sangre (Oxoid, Hapshire, UK), se utilizaron las mismas condiciones para la incubación. Posteriormente, se observó el tipo de hemólisis presente en las diferentes colonias, aquellas con una hemólisis tipo β fueron resembradas en placas de agar sangre como se describió anteriormente. Al finalizar las 18 h de incubación se procedió a realizar las pruebas de identificación requeridas para *S. agalactiae*. Primero se realizó la prueba de la catalasa, la cual fue negativa (sin presencia de burbujas), ya que *S. agalactiae* no cuenta con la enzima requerida para la degradación del peróxido de hidrógeno. La prueba permite diferenciar de una manera simple entre

Staphylococcus (+) y *Streptococcus* (-). Después se realizó la tinción de Gram, donde se observaron cocos Gram positivos.

A las muestras que cumplieron con los parámetros anteriores se les aplicó la prueba de hidrólisis de hipurato, la cual consiste en inocular una colonia de la bacteria en un tubo con 40 µL de agua destilada y añadir un disco con hipurato, después se deja incubar 2 h a 37°C. *S. agalactiae* cuenta con la enzima hipuricasa, misma que le permite hidrolizar el hipurato y formar glicina, al finalizar el tiempo de incubación se añade ninhidrina que al combinarse con glicina da lugar a una coloración morada en un lapso de 10 m, indicando la presencia de *S. agalactiae*.

El siguiente paso en el proceso de identificación de *S. agalactiae* fue la prueba de CAMP (Prueba de Christie- Atkins- Munch-Peterson), en la cual se realizó una siembra de *Staphylococcus aureus*, a un costado se inocula *S. agalactiae* (control positivo) y al otro *Enterococcus faecalis* (control negativo), después de incubar a 37°C durante 24 h, las muestras que formaron una figura similar a una punta de flecha se considerarán como *S. agalactiae*, basándose en una comparación con el control positivo.

Finalmente, se procedió a sembrar a la bacteria en el medio selectivo y diferencial Strep B Carrot Broth™ one-step (Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA). El medio es de color blanco y en la presencia de *S. agalactiae* da lugar a una coloración naranja, lo cual indica la presencia del estreptococo.

6.5 Serotipificación

Mediante pruebas serológicas de aglutinación en látex se evaluó la presencia de los dos antígenos característicos de la bacteria, el antígeno B de Lancefield (exclusivo de *S. agalactiae*) con el kit STREPPRO™ GROUPING KIT (Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA) y el polisacárido capsular utilizando el kit comercial Strep-B-Latex (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark), lo que permitió identificar a cuál de los 10 serotipos pertenecen los aislados (Ia, Ib, II – IX).

6.6 Modelo murino

Todo el trabajo experimental en animales fue conducido usando estándares veterinarios aprobados.

Para el desarrollo del modelo murino de infección por distintos serotipos de *S. agalactiae* se utilizaron hembras de la cepa BALB/c, con una edad entre 8 y 12 semanas (n=4 por grupo), a las cuales se les aplicó una inyección intraperitoneal con 0.5 mg de 17 β -estradiol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) disuelto en 100 μ L de aceite de sésamo (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), con la finalidad de sincronizar el estro y promover la colonización bacteriana (Furr et al. 1989; Cheng et al. 2005).

El primer paso fue agitar vigorosamente 0.5mg de 17 β -estradiol por cada ratón utilizado en el experimento, el peso total fue depositado en un tubo cónico de 15 mL hasta eliminar todos los grumos y la hormona se vea como un polvo fino. Después de añadieron 100 μ L de aceite de sésamo microfiltrado con filtros GD/X de 0.2 μ m (Whatman, Maidstone, UK) por cada ratón utilizado. A continuación, se agitó el tubo con la mezcla hasta obtener una suspensión homogénea. Después se tomó la solución con una jeringa de insulina y se administraron 100 μ L por vía IP en el cuadrante inferior derecho del abdomen del ratón.

6.7 Inoculación vaginal de la bacteria

El mismo día de la inyección con la hormona, se prepararon tubos con 5 mL de caldo Todd Hewitt, en los cuales se inoculó 1 colonia del serotipo de interés y se incubó durante 18h a 37°C. Después, se realizó un subcultivo en un volumen equivalente a 1/10 del volumen original en caldo Todd-Hewitt durante 1h y 30 min a 37°C hasta que la bacteria alcance la fase log, lo cual equivale a una OD₆₀₀= 0.4-0.5. Posteriormente, se transfirió el total del subcultivo a un tubo cónico de 15 mL y se centrifugó durante 5 min x 3000g a temperatura ambiente, para obtener el pellet de bacterias. Se resuspendió el pellet en 200 μ L de PBS estéril y se llevó a un volumen total de 1 mL para alcanzar una OD₆₀₀= 0.4. en un nuevo tubo de cultivo de 5 mL. Después, se transfirió el cultivo a un tubo de 15 mL y se centrifugó 5 min x 3000 g a temperatura ambiente. El pellet

resultante se resuspendió en PBS a 1/10 del volumen original (ejemplo 3mL de OD600=0.04 --- en 300 µL de PBS).

Se utilizaron 50 µL de la bacteria para realizar diluciones seriadas y plaqueo en Todd-Hewitt agar y determinar la concentración exacta de CFU del inóculo. Después, se disolvieron 1×10^7 UFC de *S. agalactiae* en 10 µL de PBS y se tomaron con una micropipeta, la puntilla se insertó 5 mm en el lumen vaginal y se depositó la totalidad de la muestra, fue necesario detener al ratón de la cola y elevarlo un poco durante 1 min para evitar reflujo.

6.8 Pureza de los inóculos

A la par de la inoculación vaginal, se evaluó la pureza de los aislados, los cuales fueron sembrados en el medio de cultivo cromogénico CHROMagar™ StrepB (DRG International, Springfield, NJ), en el cual *S. agalactiae* presenta colonias de color rosa.

6.9 Hisopados del lumen vaginal

Después de la inoculación de la bacteria se realizaron hisopados vaginales los días 5, 10 y 15. Se utilizaron hisopos ultrafinos con punta de alginato 5-1/2" (Puritan® Calgiswab®, Canada). Primero se sumergió el hisopo en PBS para humedecerlo. Posteriormente, se inmovilizó al ratón y se insertó la punta del hisopo 10 mm en la cavidad vaginal, rotándolo suavemente 4 veces en el sentido de las manecillas del reloj y 4 en sentido inverso, presionando la pared vaginal. Después, el hisopo se depositó en el medio Strep B Carrot Broth™ one-step (Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA) y se incubó a 37°C en oscuridad, el medio se vuelve de color naranja con la presencia de la bacteria. Se utilizó una escala ordinal para establecer el nivel de colonización de la bacteria, con base en la intensidad de coloración del medio. Los tubos fueron evaluados independientemente por 3 personas.

- 4 = naranja-rojizo
- 3 = naranja-claro
- 2 = trazas naranjas en menos del 50% del tubo
- 1 = pequeños puntos naranjas en el tubo
- 0 = ausencia total de coloración

Antes de la inoculación de la bacteria se hicieron hisopados para descartar la presencia de *S. agalactiae* de forma nativa en los ratones.

6.10 Medición de citocinas mediante citometría de flujo

Para evaluar la concentración de citocinas en la cavidad vaginal se realizaron lavados con 50 μ L de PBS, el volumen total se depositó en la vagina de los ratones y se tomó y volvió a depositar 4 veces. Posteriormente, el volumen se mezcló con 50 μ L de PBS con BSA al 0.1% y se almacenó a -80°C , es importante añadir BSA ya que funciona como proteína acarreadora y evita la degradación de las citocinas a bajas temperaturas.

La medición de las citocinas fue realizada con el kit BDTM Cytometric Bead Array para citocinas inflamatorias de ratón, el kit permite la detección de 6 citocinas simultáneamente (IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF- α e IL-12p70).

6.10.1 Preparación del Standard

El primer paso fue preparar los estándares. Se abrió el vial marcado como “mouse inflammation standards” y las perlas liofilizadas fueron transferidas a un tubo cónico de 15 mL etiquetado como “Top standard”. A las perlas se añadieron 2 ml de “Assay diluent”, después se dejaron disolver 15 min a temperatura ambiente y se mezclaron suavemente mediante pipeteo. Después, se utilizaron 8 tubos para realizar diluciones seriadas, en cada uno se depositaron 300 μ L de “Assay diluent” y se transfirieron 300 μ L desde el “Top standard”, hasta llegar a la dilución 1:256. Un tubo con diluyente fue utilizado como control negativo.

6.10.2 Mezcla de las perlas de captura

Se agitó vigorosamente cada suspensión de perlas de captura durante 7 s. Después, se añadieron 10 μ L de cada perla de captura por cada tubo que fue analizado para crear un mix de las 6 citocinas.

6.10.3 Procedimiento de la prueba

Primero se agita el mix de perlas de captura y se añadieron 50 μ L a todos los tubos que serán evaluados durante la prueba. Adicionalmente, se añadieron 50 μ L del “mouse inflammation standard” a los tubos de ensayo del control. Después se agregaron 50 μ L de cada muestra desconocida en tubos marcados apropiadamente, así como 50 μ L de “Mouse inflammation PE detection reagent” y se dejaron incubar 2 h a temperatura

ambiente, protegidos de la luz. Transcurrido el tiempo se realizaron lavados con 1 mL de “wash buffer” y los tubos se centrifugaron a 200g x 5 min. Finalmente, se aspiró y descartó el sobrenadante de cada tubo, se añadieron 100 µL de “wash buffer” a cada tubo para resuspender el pellet de perlas y se procedió a realizar la lectura en el citómetro de flujo.

6.11 Cuantificación de IgG total

6.11.1 Obtención de suero

La concentración de IgG total fue medida en los ratones inoculados con la bacteria. Para obtener el suero los ratones fueron anestesiados con ketamina y xilacina (IP) (University of Iowa 2017), posteriormente se realizó una prueba para evaluar la reacción de la córnea y una punción en el pie, para confirmar que el animal se encontrara anestesiado correctamente. Después, se procedió a realizar una punción cardíaca terminal mediante un enfoque abierto, el animal fue recostado sobre su espalda (recumbencia dorsal), a continuación, se humedeció el área abdominal con alcohol al 70% y se realizó un corte en V a través de la piel y la pared abdominal a aproximadamente 1 cm de la última costilla. Los órganos se desplazaron hacia un costado y después se insertó la aguja a través del diafragma y dentro del corazón, suavemente se aplicó presión negativa en el émbolo de la jeringa (lentamente para no colapsar el corazón) para obtener entre 0.75 mL y 1.5 mL (University of Delaware 2010). Después de recolectar la sangre, se dejó reposar 30 min a temperatura ambiente para formar el coágulo, el cual fue removido mediante una centrifugación de 1600g x 10 min, el suero obtenido fue almacenado a -80°C hasta su uso (Henry 1979; Thavasu et al. 1992).

6.12 ELISA

La cuantificación de IgG total fue realizada mediante el kit de ELISA ab157719 (abcam, Cambridge, UK). Todos los reactivos y muestras fueron equilibrados a temperatura ambiente durante 40 min antes de ser utilizados.

6.12.1 Preparación de los reactivos

1X solución diluyente

Diluir en una proporción 1/5 con agua destilada (permanece estable durante 1 semana entre 2-8°C).

1X buffer de lavado

Diluir en una proporción 1/20 con agua destilada (permanece estable durante 1 semana entre 2-8).

1X conjugado enzima-anticuerpo

Por cada una de las tiras utilizadas (8 pocillos) se añadieron 10 µL del conjugado enzima-anticuerpo y 990 µL de diluyente 1x. Es necesario mezclar uniformemente y evitar la formación de espuma. La solución debe ser preparada inmediatamente antes de usarse ya que solo es estable por 1 h almacenada en oscuridad.

Calibrador de IgG

El calibrador fue reconstituido con agua destilada y mezclado suavemente hasta ser disuelto, después fue utilizado para la preparación de los estándares. Se marcaron tubos del 1-6 y se añadió el volumen requerido de diluyente y calibrador para obtener una concentración de 200 ng/mL.

Cálculos realizados

Concentración inicial 20200ng/mL. Después, se calculó el factor de dilución entre el stock del calibrados y la concentración final del estándar 1 (200 ng)

$$20200/200=101$$

A continuación, se calculó el volumen final de diluyente requerido para preparar el estándar 1 a 200 ng/mL.

$$4*101=404 \mu\text{L}$$

$$404-4=400 \mu\text{L}$$

Al tubo #1 se añadieron 4 µL del calibrador y 400 µL de 1x diluyente para obtener una concentración de 200 ng/mL. A los tubos del 2-6 se les añadieron 300 µL de diluyente y después se realizaron diluciones seriadas a partir del tubo 1. Un tubo que solo contenía diluyente 1x fue utilizado como el estándar 0 (0 ng/mL) (Tabla 5).

Tabla 5. Preparación y concentración para la preparación del estándar en la prueba de ELISA

<i>Estándar #</i>	<i>Volumen para diluir (μL)</i>	<i>Volumen de diluyente (μL)</i>	<i>Volumen total (μL)</i>	<i>Concentración inicial (ng/mL)</i>	<i>Concentración final (ng/mL)</i>
1					200
2	300	300	600	200	100
3	300	300	600	100	50
4	300	300	600	50	25
5	300	300	600	25	12.5
6	300	300	600	12.5	6.25

6.12.2 Preparación de las muestras

Las muestras de suero obtenidas de los ratones fueron diluidas antes de ser utilizadas.

- Transferir 2 μL de muestra a 1998 μL de diluyente, para obtener una dilución 1/1000.
- De la mezcla anterior, diluir 2 μL en 798 μL de diluyente.

Lo anterior da como resultado una dilución 1/400 000.

Procedimiento

1. Pipetear 100 μL de cada estándar, por duplicado.
2. Pipetear 100 μL de las muestras, por duplicado.
3. Incubar la placa a temperatura ambiente por 60 minutos (cubrir y en oscuridad).
4. Aspirar el contenido de los pozos
5. Llenar completamente cada pozo con buffer de lavado y aspirar. Repetir el proceso 3 veces. Después, invertir la placa y sacudir el contenido.
6. Pipetear 100 μL del conjugado enzima-anticuerpo en cada pozo, incubar a temperatura ambiente 30 min (cubrir y en oscuridad).
7. Repetir el paso 5.
8. Pipetear 100 μL de TMB en cada pozo.
9. Incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 10 min.

10. Añadir 100 μL de solución de paro
11. Determinar la absorbancia a 450 nm.

6.13 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el software GraphPad Prism7. Los resultados de recuperación bacteriana, citometría de flujo y ELISA fueron evaluados utilizando la prueba de Kruskal-Wallis con una comparación múltiple de Dunn. Adicionalmente se realizó la prueba de Friedman para analizar las concentraciones de citocinas a través del tiempo. Se aceptará una significancia estadística de $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Aislamiento y Serotipificación

Se analizaron un total de 17 muestras, el 100% fueron identificadas como *S. agalactiae* por métodos microbiológicos y bioquímicos. Después de confirmar la especie se procedió a determinar el serotipo al que pertenecen (Tabla 6). Los serotipos encontrados cuentan con diferente estructura de su polisacárido capsular, abarcando las 3 clases descritas hasta el momento (Tabla 7), lo cual es de gran interés para evaluar el efecto de los diferentes serotipos después de su inoculación en el modelo murino. Se seleccionó un representante de cada serotipo de forma aleatoria para los experimentos posteriores.

Tabla 6. Serotipos de *S. agalactiae* encontrados.

<i>Muestra</i>	<i>Serotipo</i>
1	Ib
2	IV
3	V
4	III
5	III
6	V
7	III
8	II
9	II
10	II
11	IV
12	III
13	IV
14	II
15	II
16	IV
17	Ib

Tabla 7. Serotipos de *S. agalactiae* y clase a la que pertenece su polisacárido capsular.

<i>Serotipo</i>	<i>Clase de polisacárido capsular</i>
<i>Ib</i>	1
<i>II</i>	3
<i>III</i>	1
<i>IV</i>	2
<i>V</i>	2

Antes de la inoculación vaginal se realizó la siembra de los aislados en agar cromogénico para determinar con precisión la pureza de la bacteria antes de su administración. El crecimiento demostró que *S. agalactiae* se encontraba de forma pura (Figura 11).

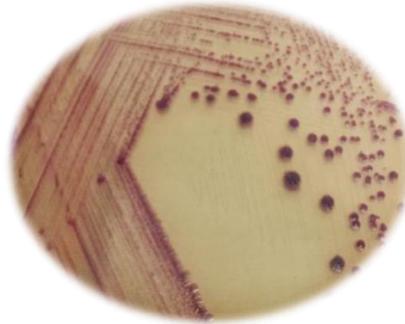


Figura 11. Crecimiento de *S. agalactiae* en agar cromogénico. Caja Petri sembrada con el estreptococo en CHROMagar™ StrepB (DRG International) después de 24 h de incubación a 37°C en oscuridad. *S. agalactiae* es la única bacteria que produce coloración malva en el medio.

7.2 Modelo murino

7.2.1 Colonización vaginal

Los hisopados vaginales previos a la inoculación de la bacteria mostraron que ninguno de los ratones contaba con *S. agalactiae* de forma nativa antes del experimento (Figura 12).

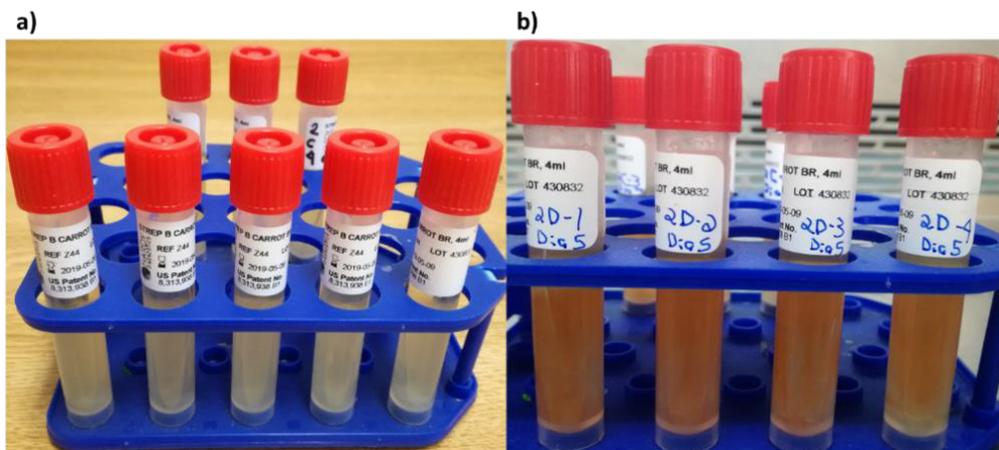


Figura 12. Hisopados vaginales sembrados en Strep B Carrot Broth™ one-step (Hardy Diagnostics). a) Medio negativo después del hisopado vaginal previo a la inoculación de *S. agalactiae*. b) Medio positivo para *S. agalactiae* 5 días después de la inoculación. Ambos fueron incubados 18 h a 37°C protegidos de la luz.

En 20/20 (100%) de los ratones fue posible establecer una infección en su cavidad vaginal, confirmando la eficiencia del modelo en ratones BALB/c. En el 95% (19/20) presentó niveles detectables de la bacteria el día 5 después de la inoculación, únicamente un ratón fue detectable hasta el día 10.

Los distintos serotipos de *S. agalactiae* tuvieron diferente capacidad de colonizar el tracto vaginal de los ratones (Figura 13). Los serotipos III y IV establecieron la infección con una carga bacteriana más elevada, lo cual fue determinado a partir de la coloración observada en Strep B Carrot Broth™ one-step (Hardy Diagnostics) (Figura 12), la intensidad del color naranja es directamente proporcional a la carga bacteriana. El serotipo Ib fue el único que seguía presente en el día 15, a pesar de ser el que estableció la infección con menos carga bacteriana. Sorpresivamente, uno de los ratones pertenecientes al grupo control fue positivo el día 5 (Figura 14). El análisis estadístico muestra que existe una diferencia altamente significativa ($p=0.0014$) entre la dinámica de colonización de los distintos serotipos en el día 5 (Figura 14). No se encontraron diferencias significativas los días 10 y 15 (Figura 15).

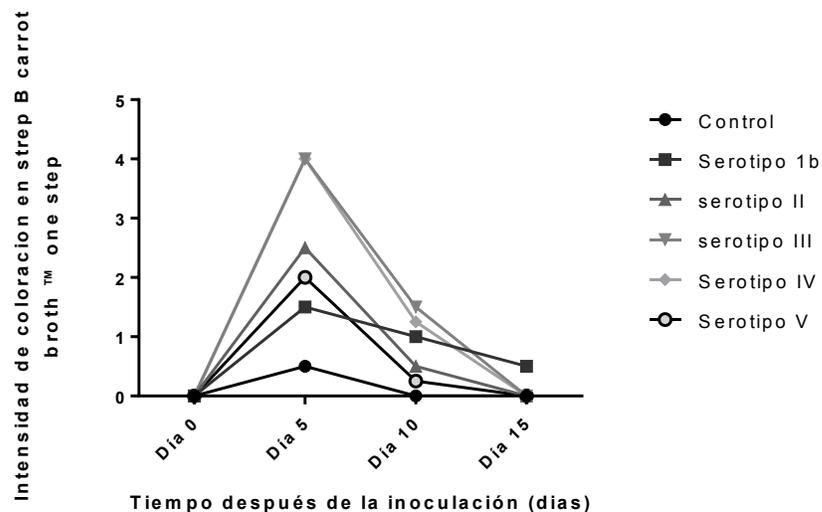


Figura 13. Dinámica de colonización vaginal de los distintos serotipos de *S. agalactiae*. Ratones BALB/c (4 por grupo) fueron colonizados con 1×10^7 UFC de *S. agalactiae* de aislados clínicos que correspondían a los serotipos Ib, II, III, IV y V. La persistencia de la bacteria fue determinada mediante hisopados vaginales los días 5, 10 y 15 que fueron sembrados en Strep B Carrot Broth™ one-step (Hardy Diagnostics). Los puntos representan el promedio de la intensidad de coloración de cada serotipo en el caldo de acuerdo con una escala ordinal (4 a 0).

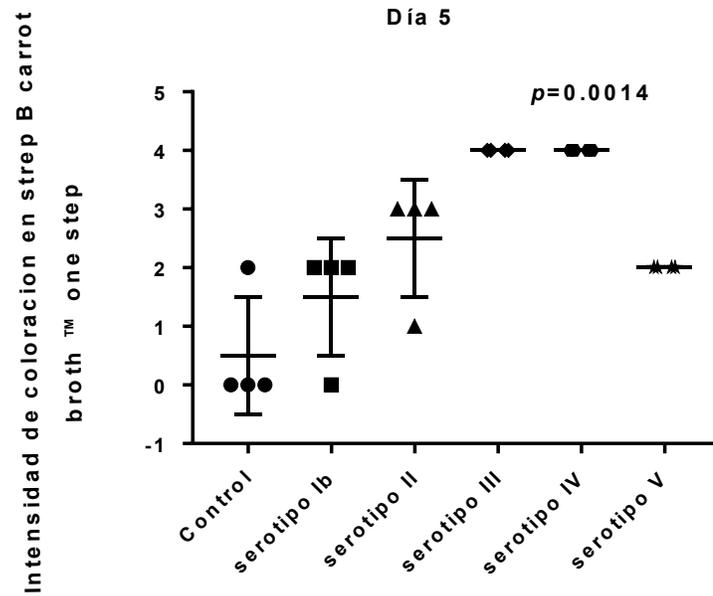


Figura 14. Evaluación de la dinámica de colonización vaginal el día 5. El promedio de la carga bacteriana de cada serotipo fue analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis con la prueba Post Hoc de Dunn. Se tomó como significativo un valor de $p < 0.05$.

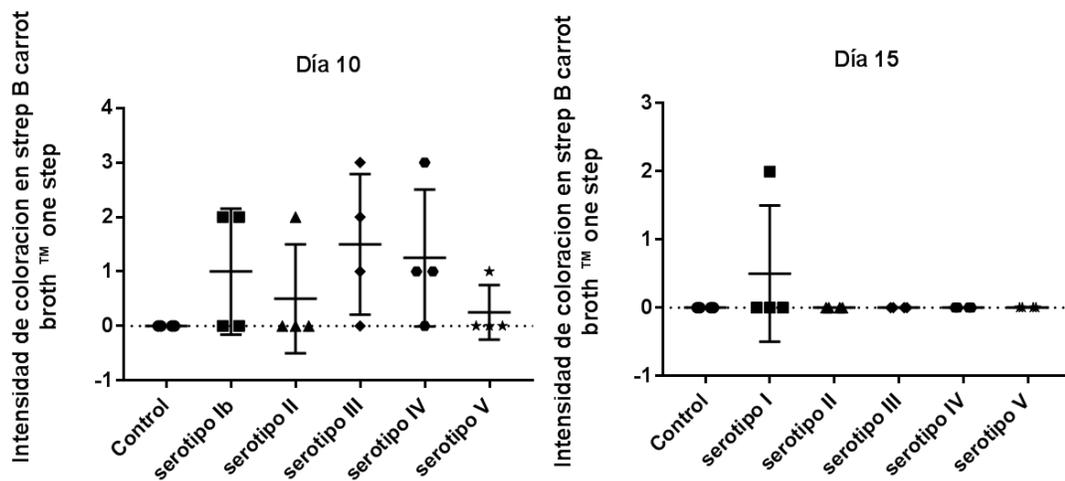


Figura 15. Evaluación de la dinámica de colonización vaginal los días 10 y 15. El promedio de la carga bacteriana de cada serotipo fue analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis con la prueba Post Hoc de Dunn. Se tomó como significativo un valor de $p < 0.05$.

7.2.2 Expresión de citocinas proinflamatorias

Con la finalidad de identificar si los distintos serotipos de *S. agalactiae* eran capaces de inducir una expresión diferencial de citocinas, se evaluó la expresión de: IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF- α e IL-12p70 mediante citometría de flujo.

La expresión de IL-6 tuvo diferencias significativas ($p=0.0366$) el día 5 (Figura 16 b), los serotipos II, III y IV mostraron un incremento de la citocina con respecto a los demás serotipos y al grupo control. Los días 10 y 15 no se encontraron diferencias significativas entre la expresión de los distintos serotipos (Figura 16 c-d).

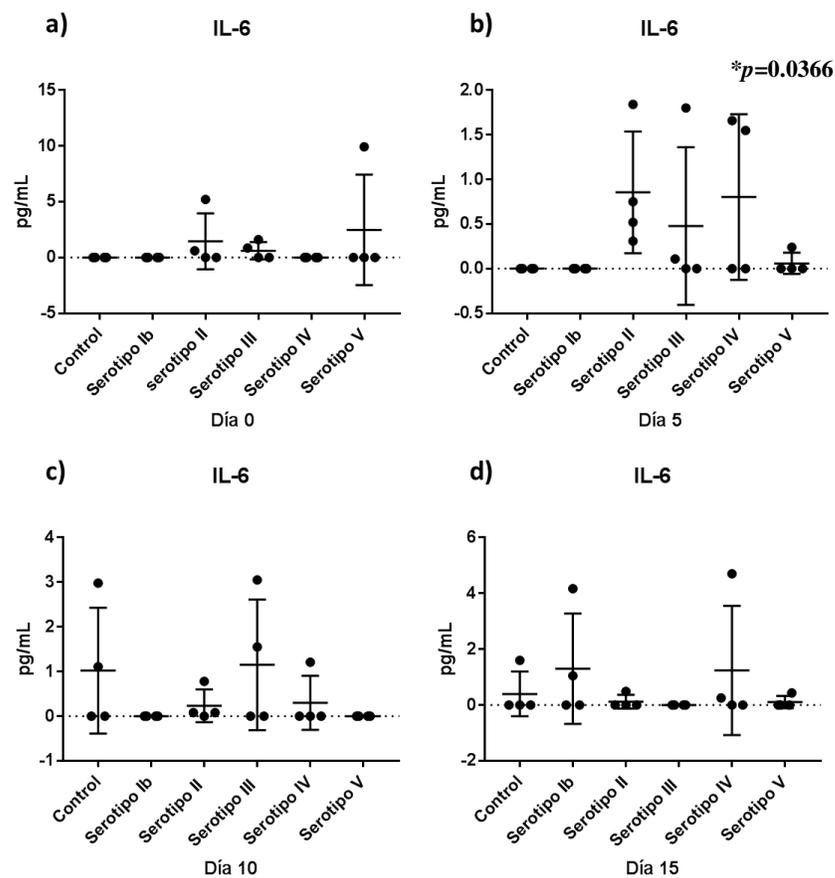
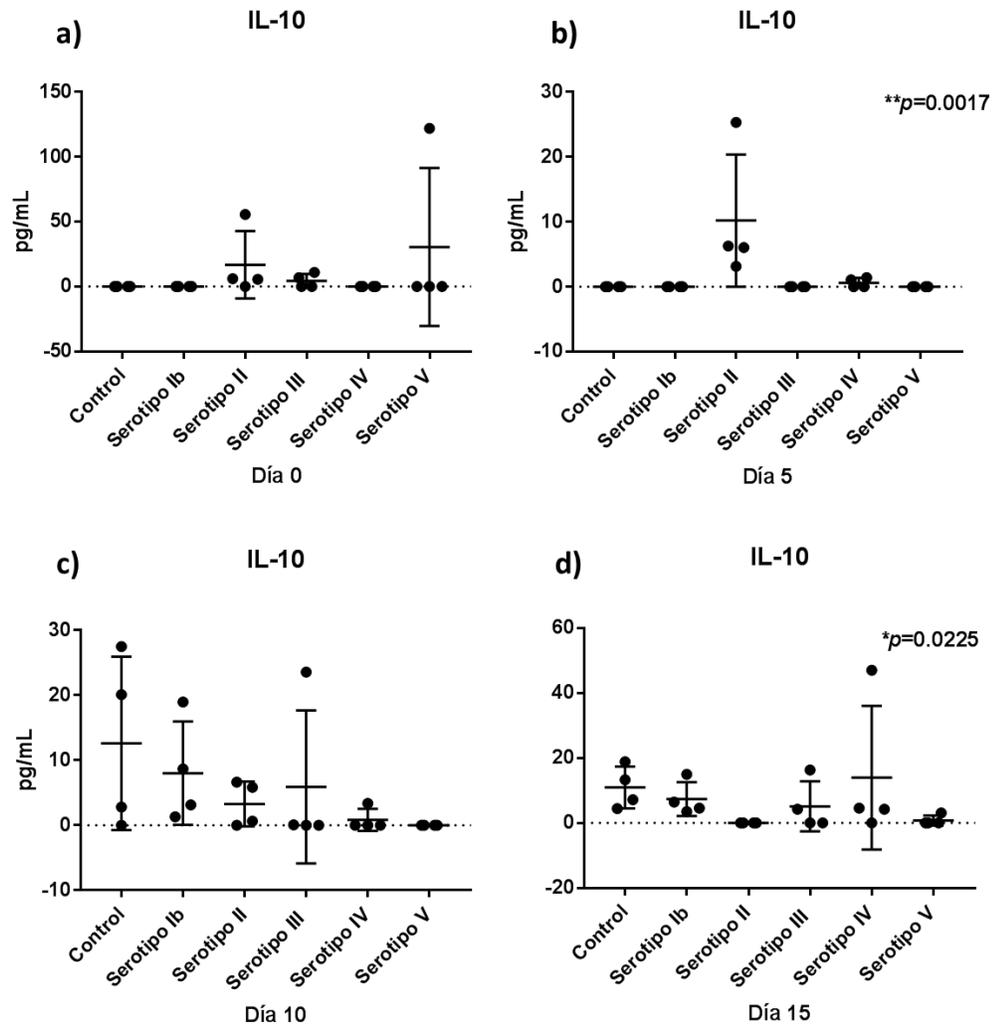


Figura 16. Niveles de IL-6 después de la infección con los distintos serotipos de *S. agalactiae*. Los niveles de la citocina fueron evaluados por citometría de flujo a partir de lavados vaginales en el modelo murino realizados con PBS. Las mediciones se realizaron antes de la inoculación con la bacteria (a) y los días 5 (b), 10 (c) y 15 (d) después de la infección. Cada grupo se encuentra conformado por una $n=4$ y los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal Wallis. Se tomó como significativo un valor de $p<0.05$.

Por su parte, el serotipo II presentó variaciones altamente significativas ($p=0.0017$) en la expresión de la IL-10 el día 5 (Figura 17 b), siendo el único serotipo que mostró un incremento de la citocina. El día 10 no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos (Figura 17 c), mientras que el día 15 se identificó una variación significativa ($p=0.0225$) (Figura 17 d) entre los grupos, observando mayores niveles de



la citocina en los serotipos Ib, III y IV, con respecto al II y al V.

Figura 17. Niveles de IL-10 después de la infección con los distintos serotipos de *S. agalactiae*. Los niveles de la citocina fueron evaluados por citometría de flujo a partir de lavados vaginales en el modelo murino realizados con PBS. Las mediciones se realizaron antes de la inoculación con la bacteria (a) y los días 5 (b), 10 (c) y 15 (d) después de la infección. Cada grupo se encuentra conformado por una n=4 y los

datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal Wallis. Se tomó como significativo un valor de $p < 0.05$.

La siguiente citocina en ser evaluada fue la MCP-1, en la cual se observó un incremento significativo ($p=0.0197$) en su expresión después de la infección con el serotipo II el día 5, también uno de los ratones infectados con el serotipo III presentó incremento, mientras que los demás grupos permanecieron en niveles basales (Figura 18 b). El día 10 y 15 no se observaron diferencias entre los grupos (Figura 18 c-d)

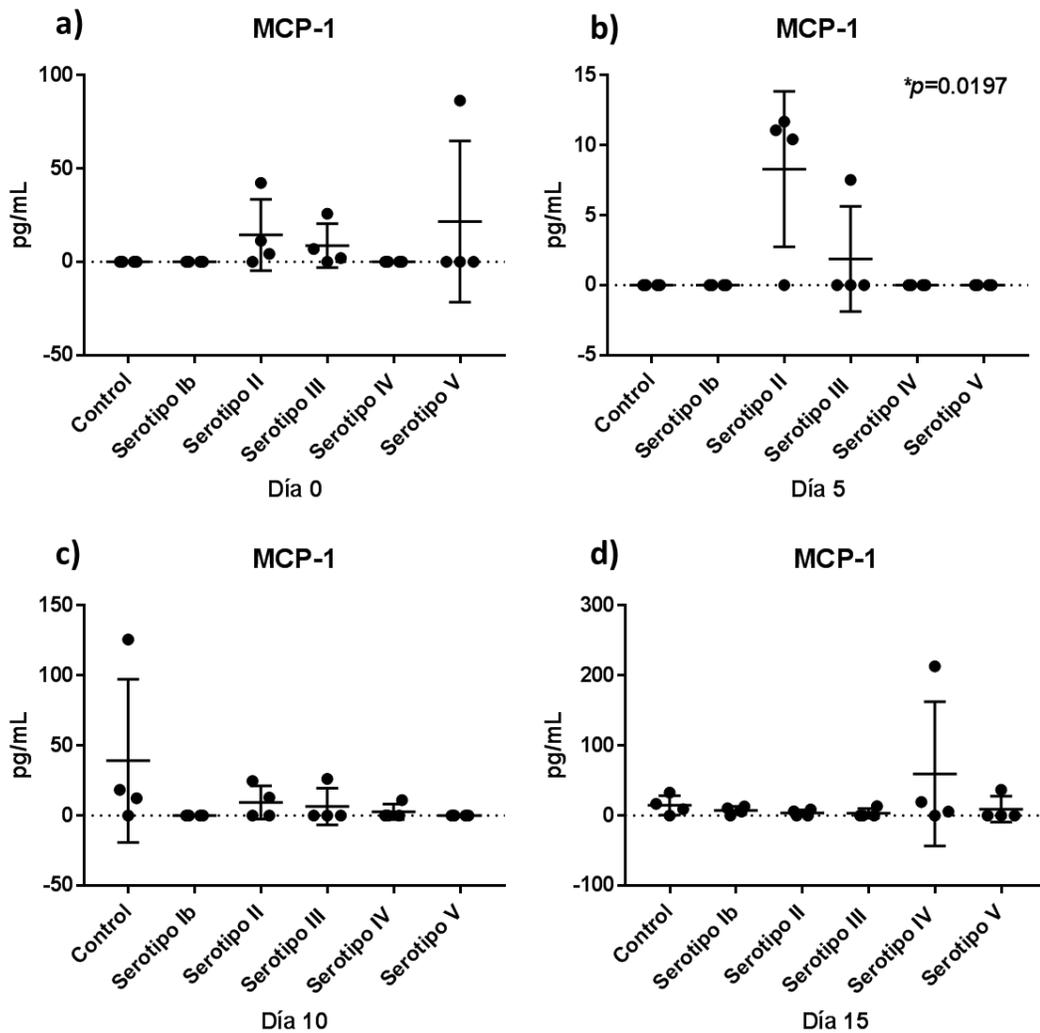


Figura 18. Niveles de MCP-1 después de la infección con los distintos serotipos de *S. agalactiae*. Los niveles de la citocina fueron evaluados por citometría de flujo a partir de lavados vaginales en el modelo murino realizados con PBS. Las mediciones se realizaron antes de la inoculación con la bacteria (a) y los

días 5 (b), 10 (c) y 15 (d) después de la infección. Cada grupo se encuentra conformado por una $n=4$ y los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal Wallis. Se tomó como significativo un valor de $p<0.05$.

Los niveles de IFN- γ muestran diferencias significativas ($p=0.0388$) entre los grupos el día 5 (Figura 19 b), donde se observó un incremento de la citocina en el grupo II, el día 10 no se observaron diferencias significativas entre los grupos (Figura 19 c), mientras que el día 15 se observa una diferencia significativa ($p=0.0399$) entre los serotipos (Figura 19 d).

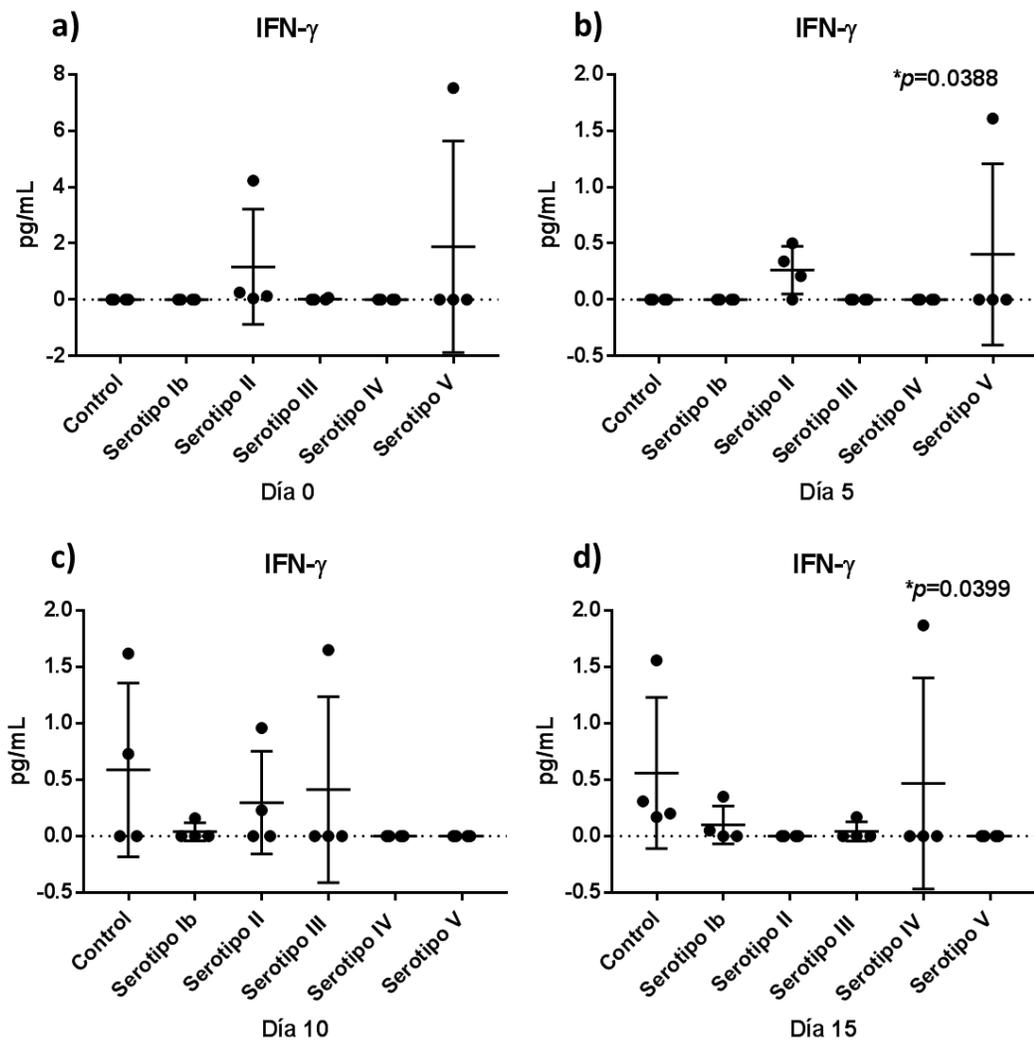


Figura 19. Niveles de IFN- γ después de la infección con los distintos serotipos de *S. agalactiae*. Los niveles de la citocina fueron evaluados por citometría de flujo a partir de lavados vaginales en el modelo murino realizados con PBS. Las mediciones se realizaron antes de la inoculación con la bacteria (a) y los

días 5 (b), 10 (c) y 15 (d) después de la infección. Cada grupo se encuentra conformado por una n=4 y los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal Wallis. Se tomó como significativo un valor de $p < 0.05$.

El análisis de la expresión de TNF- α no mostró diferencias significativas entre los grupos ninguno de los días analizados. Sin embargo, se observa una disminución general en los niveles de la citocina conforme transcurren los días. En la medición correspondiente al día 15 la citocina permanece elevada únicamente en los ratones infectados con el serotipo IV (Figura 20 b-d).

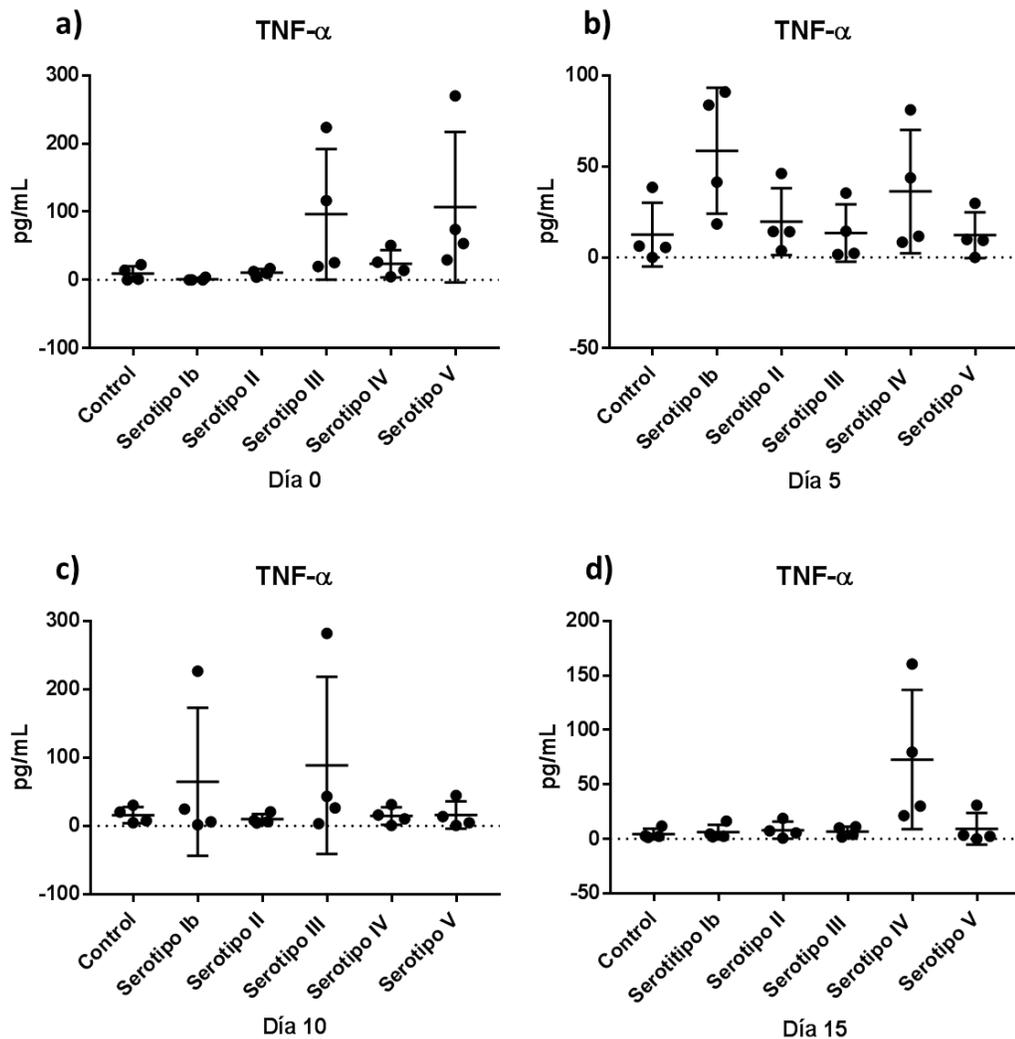


Figura 20. Niveles de TNF- α después de la infección con los distintos serotipos de *S. agalactiae*. Los niveles de la citocina fueron evaluados por citometría de flujo a partir de lavados vaginales en el modelo murino realizados con PBS. Las mediciones se realizaron antes de la inoculación con la bacteria (a) y los días 5 (b), 10 (c) y 15 (d) después de la infección. Cada grupo se encuentra conformado por una n=4 y los

datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal Wallis. Se tomó como significativo un valor de $p < 0.05$.

La última citocina en ser evaluada fue la IL-12p70, en la cual no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos, la citocina se mantuvo en niveles muy bajos durante todas las mediciones realizadas en la cavidad vaginal del ratón (Figura 21 b-d)

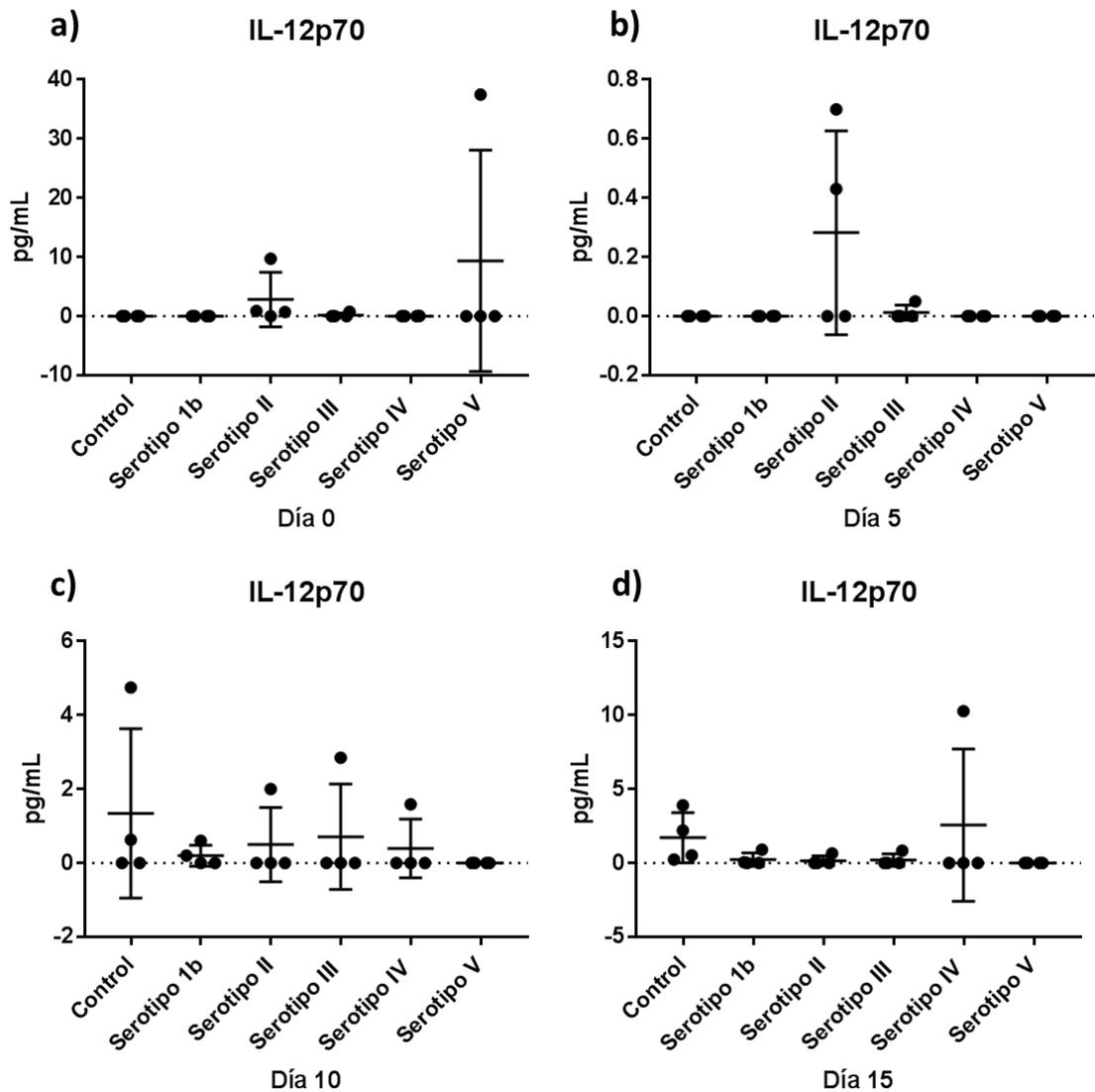


Figura 21. Niveles de IL-12p70 después de la infección con los distintos serotipos de *S. agalactiae*. Los niveles de la citocina fueron evaluados por citometría de flujo a partir de lavados vaginales en el modelo murino realizados con PBS. Las mediciones se realizaron antes de la inoculación con la bacteria (a) y los días 5 (b), 10 (c) y 15 (d) después de la infección. Cada grupo se encuentra conformado por una

n=4 y los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal Wallis. Se tomó como significativo un valor de $p < 0.05$.

Después de analizar las variaciones en la expresión de citocinas entre grupos se procedió a evaluar las variaciones que ocurrían a través del tiempo después de la inoculación con un serotipo determinado (Figura 22). El serotipo Ib fue el que presentó más variaciones, se observó un incremento en los niveles de la IL-10 ($p=0.0046$) los días 10 y 15 después de la inoculación (Figura 22 a), el análisis de la MCP-1 no mostró una diferencia significativa sin embargo se observa una clara tendencia a su incremento el día 15 (Figura 22 b). Por su parte el TNF- α también presentó variaciones significativas ($p=0.0141$) durante todo el experimento después de la inoculación con el serotipo Ib, donde se observa un incremento los días 5 y 10, mientras que el día 15 los niveles de la citocina regresan al estado inicial (Figura 22 c). El serotipo III también provocó variaciones significativas ($p=0.0330$) en los niveles de TNF- α , mostrando una disminución de la citocina el día 5, un pequeño incremento al día 10 y una disminución total el día 15 después de la infección (Figura 22 d).

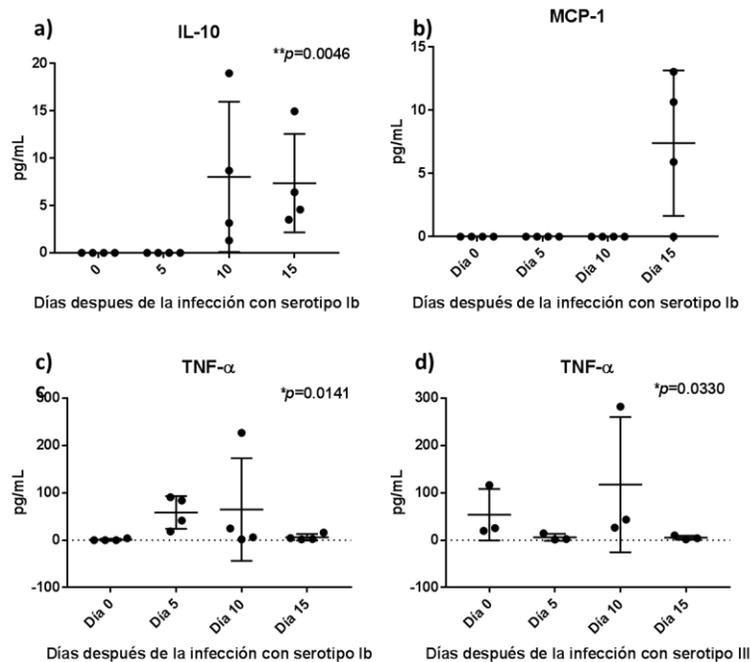


Figura 22. Diferencias en la expresión de citocinas a distintos puntos después de la infección (casos representativos). El análisis en la concentración de citocinas a distintos puntos después de la infección con el serotipo Ib, presentó variaciones significativas en los niveles de citocinas como IL-10 (a) y TNF- α (c), a su vez se observa una tendencia al incremento de MCP-1 el día 15 (b). Por su parte, el serotipo III

indujo variaciones significativas en la expresión de TNF- α . Los datos fueron analizados mediante la prueba de Friedman con la prueba Post Hoc de Dunn. Se tomó como significativo un valor de $p < 0.05$.

7.3 IgG total

Después de concluir la evaluación de las citocinas se procedió a evaluar los niveles de IgG total en muestras de suero de los ratones mediante ELISA. Después de construir la curva de calibración (Figura 23 a), se evaluó la cantidad de IgG total en cada uno de los grupos estudiados. Se observa una diferencia significativa ($p = 0.0349$) entre los niveles de IgG total después de la inoculación con los diferentes serotipos. Los serotipos Ib, II y IV mantuvieron niveles similares a los encontrados en el grupo control, mientras que el III y V muestran una disminución más marcada en la concentración de IgG (Figura 23 b).

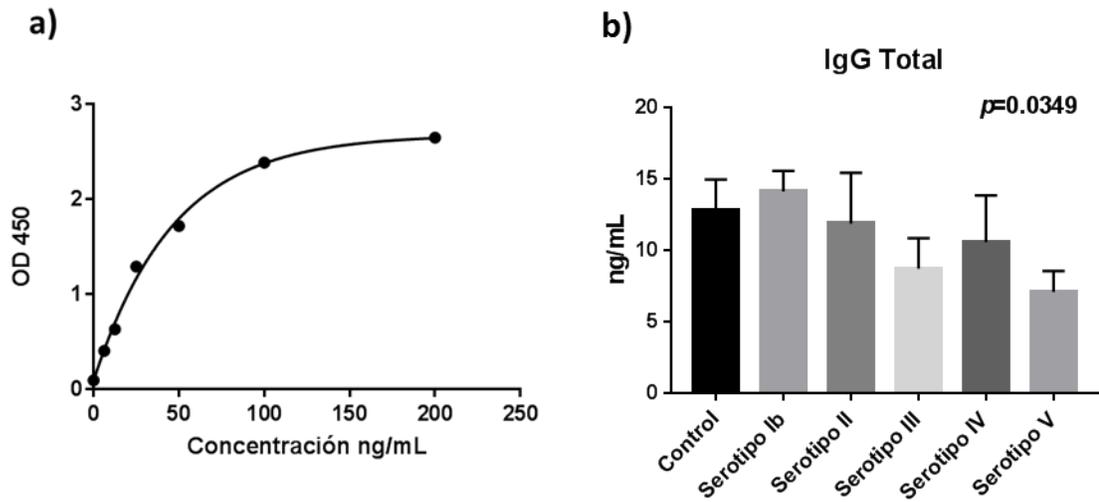


Figura 23. Concentración de IgG total en respuesta a la infección por cada serotipo de *S. agalactiae*.

Los niveles séricos de IgG fueron evaluados mediante una prueba de ELISA. El suero fue obtenido por punción cardiaca terminal en ratones BALB/c el día 21 después de la infección con la bacteria. a) Valores obtenidos en la curva de calibración. b) Cada muestra fue leída por duplicado y la gráfica representa el promedio de las lecturas a una longitud de onda de 450nm. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Se tomó como significativo un valor de $p < 0.05$.

8. DISCUSIÓN

S. agalactiae se ha mantenido como un problema de salud en recién nacidos desde que fue identificado como patógeno humano (Fry et al. 1938). Después, gracias a los estudios realizados por Rebecca Lancefield se encontró que la bacteria presentaba un polisacárido capsular que permitía su clasificación en distintos serotipos a partir de las variaciones en los residuos de azúcares que lo componían y el tipo de enlace que presentaban (Lin et al. 2018). Casi un siglo ha pasado desde que se le prestó atención por primera vez en cuestiones de salud humana y aún no ha sido posible elucidar por completo la respuesta inmune que monta el hospedero en respuesta a la infección por *S. agalactiae* (Patras et al. 2015). Por otra parte, tampoco se ha logrado determinar con claridad la razón por la cual la bacteria en ocasiones provoca severos problemas de salud y en otras genera una infección prácticamente asintomática (Landwehr-Kenzel y Hennek 2014). La frecuencia de los diferentes serotipos como colonizadores hace que determinar el desarrollo de la enfermedad sea sumamente difícil. Mientras algunos individuos presentan una colonización asintomática otros progresan a enfermedad invasiva, lo cual enfatiza la complejidad de la interacción *S. agalactiae*-hospedero (Furfaro et al. 2018).

En el presente estudio se identificaron 5 serotipos (Ib, II, III, IV y V) de los 10 reportados hasta el momento de *S. agalactiae*. Cada serotipo cuenta con una estructura específica del polisacárido capsular y la distribución geográfica también varía entre ellos. El serotipo Ib es el responsable de la mayoría de los casos de infección neonatal en Asia (Madrid et al. 2017). Por su parte, en México y Sudamérica se ha observado una alta prevalencia del serotipo en casos de colonización materna (Russell et al. 2017). Nosotros encontramos la presencia del serotipo en el 11.76% (2/17) de las muestras identificadas como positivas, lo cual confirma su presencia en México y que continúa siendo uno de los más comunes. El serotipo II es el cuarto más común en enfermedad materna (Hall et al. 2017) y ha sido identificado como el quinto más prevalente en enfermedad neonatal a nivel mundial (Madrid et al. 2017). En nuestro estudio se encontró presente en 29.41% (5/17) de las muestras positivas, siendo el más encontrado. El serotipo III se encuentra fuertemente asociado con la enfermedad de inicio temprano, su incidencia ha sido reportada a nivel mundial y permanece siendo la principal causa de

muerte neonatal (Madrid et al. 2017). El presente estudio lo encontró en 23.52 % (4/17) de las muestras positivas, siendo uno de los más abundantes. El serotipo IV es el quinto más prevalente a nivel mundial después de los serotipos Ia, Ib, II, III y V. estudios recientes han notado un incremento del serotipo en países como Canadá y EUA. El cambio de polisacárido capsular “capsular switching” ha sido reportado en este serotipo, dándose un cambio del serotipo III al IV (Teatero et al. 2015; Teatero et al. 2017). Se encontró el serotipo en el 23.52% (4/17), la misma proporción que el serotipo III, algo inesperado ya que el serotipo IV no suele ser tan común, sin embargo, la alta tasa de migración entre EUA y Canadá con la región norte de México podría explicar el comportamiento observado. El serotipo V ha sido relacionado principalmente en población adulta sin embarazo (Blumberg et al. 1996). Es el tercer serotipo más prevalente, con la mayor incidencia reportada en el oeste del continente africano, en países como Gabón es responsable de un 33% de las cepas aisladas de mujeres embarazadas (Belard et al. 2015). Fue encontrado en el 11.74% (2/11) de las muestras, la misma proporción que el serotipo Ib. Los serotipos restantes con excepción del Ia, son muy poco comunes o han sido reportados en regiones geográficas distintas. El VI es uno de los más raros a nivel global, ha sido reportado en países asiáticos como Japón y Malasia (Lachenauer et al. 1999; Suhaimi et al. 2017). El VII no se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, sin embargo, se ha reportado una alta incidencia del serotipo en el sur de Ghana (Slotved et al. 2017). Por su parte, el serotipo VIII se encuentra ampliamente relacionado con Japón (Lachenauer et al. 1999). Finalmente, el serotipo IX es el más reciente, fue descubierto en 2007, por lo que no existen muchos estudios describiendo su incidencia, pero al igual que el VII ha sido encontrado en países como Ghana y regiones de Asia (Slotved et al. 2017). El serotipo Ia se encuentra distribuido globalmente, es el más común en enfermedad materna (Russell et al. 2017) y uno de los principales responsables de la enfermedad de inicio temprano, solamente en la región este de Asia es más frecuente el serotipo Ib que el Ia (Madrid et al. 2017). Por tal motivo fue sorprendente que ninguna de las muestras correspondiera a este serotipo, lo cual puede deberse al limitado número de muestras positivas que se obtuvieron. Los serotipos encontrados en estudios anteriores en México corresponden con los que fueron identificados en las muestras analizadas, lo cual indica que la

presencia de determinados serotipos parece mantenerse estable en el país, a pesar de que las frecuencias de cada uno han evolucionado de formas distintas (Palacios et al. 2017).

Las discrepancias observadas en las proporciones encontradas y en los reportes previos podrían deberse al tamaño de la muestra, un mayor número de muestras positivas ayudaría a obtener resultados más representativos. También es necesario reevaluar las técnicas de detección utilizadas y compararlas con otras disponibles comercialmente, como agares cromogénicos, los cuales se ha reportado que son más sensibles para la identificación de la bacteria y no dependen de la capacidad hemolítica de *S. agalactiae* (Poisson et al. 2010). Diversos estudios muestran que la prevalencia de los serotipos de *S. agalactiae* se ha mantenido estables las últimas 4 décadas (Le Doare y Heath 2013), sin embargo, sus frecuencias no se mantienen estáticas a lo largo del tiempo, lo cual resalta la importancia de entender cómo reacciona el sistema inmune del hospedero en respuesta a la infección por distintos serotipos de *S. agalactiae*, especialmente la liberación de citocinas, las cuales son mediadores clave en la activación de la respuesta inmune en respuesta a infecciones (Gause et al. 2013). Por lo que es necesario evaluar a los serotipos constantemente para conocer su situación actual y poder plantear estrategias para el control de la bacteria.

Mecanismos de defensa específicos y no específicos se encuentran involucrados en la resistencia a la infección por *S. agalactiae* (Rosati et al. 1998). Por lo que otro objetivo del estudio fue evaluar la capacidad de colonizar el tracto vaginal de ratones BALB/c, lo cual contrasta con estudios anteriores en los cuales se habían utilizado ratones de la cepa CD1 (Sheen et al 2011; Patras et al, 2015) o C57BL/6 (Carey et al. 2014). Los resultados muestran que el modelo funciona con una alta eficiencia ya que el 100% (20/20) de los individuos desarrollaron de forma adecuada la infección.

El siguiente paso fue evaluar la capacidad de los distintos serotipos de colonizar el tracto vaginal, donde se encontró que los serotipos III y IV eran los que mayor capacidad de colonización tenían, los resultados obtenidos contrastan con los reportados por el grupo de Patras et al. en 2015 donde encontraron que el serotipo V era el que tenía mayor capacidad de establecer la infección en el modelo murino, aunque en una cepa CD1, también identificaron al serotipo III como el segundo con mayor capacidad de colonizar

el tracto vaginal, mientras que el serotipo Ia fue el menor. Las diferencias observadas por parte de los distintos serotipos pueden deberse a las características propias de cada una de las cepas de ratón utilizadas y a la naturaleza de cada una de las muestras, ya que al ser aislados clínicos de diferentes regiones geográficas cada una cuenta con características propias que pueden influir en el proceso infeccioso, a pesar de las diferencias la mayoría de los ratones en ambos experimentos eliminaron la infección en un periodo de 2 semanas.

Es bien sabido que las citocinas juegan un rol central en la inducción de las respuestas inmunes no específicas y específicas en respuesta a microbios. Debido al papel central de las citocinas en determinar las funciones efectoras de fagocitos y linfocitos, es probable que la evolución de la enfermedad causada por *S. agalactiae* pueda depender, al menos parcialmente de las citocinas inducidas durante la infección. El objetivo central del trabajo fue determinar si los serotipos inoculados eran capaces de inducir una expresión diferencial de citocinas proinflamatorias en el microambiente vaginal. Algunos estudios sobre la producción de citocinas durante la infección de *S. agalactiae* se centraron en el rol de TNF- α y otras citocinas inflamatorias en la patogénesis de la enfermedad (Teti et al.1993). En 1998 Rosati et al. analizaron la cinética de la expresión de genes que codifican para citocinas después de una infección por *S. agalactiae*. Su grupo de trabajo utilizó el serotipo Ia, el cual se ha reportado que es sumamente virulento en ratones. A diferencia del modelo utilizado por nuestro grupo de trabajo ellos administraron una inyección IP de la bacteria, lo cual se traduce en una infección mucho más agresiva que la observada por nosotros. Los resultados obtenidos por ellos muestran que la infección induce la liberación de citocinas que favorecen una respuesta Th1. Además, observaron una fuerte respuesta de citocinas proinflamatorias únicamente cuando *S. agalactiae* se encontraba en altas concentraciones, sin embargo, debido a que no encontramos ninguna muestra del serotipo Ia no fue posible determinar si el serotipo efectivamente era el más agresivo en el modelo murino. Su grupo de trabajo encontró un incremento de IL-1, IFN- γ , e IL-12p40 en la ausencia de IL-4, IL-5 e IL-10. Estudios anteriores han identificado que niveles vaginales de IL-1 α se correlacionan con el estado de colonización por *S. agalactiae* en mujeres no embarazadas (Nikolaitchouk et al. 2008) mientras que IL-1 β se asociada con un riesgo aumentado de sufrir infección por *S.*

agalactiae y embarazos prematuros (Mitchell et al. 2013). Por su parte en modelos murinos se ha identificado un aumento de MIP-2 y IL-1 β en respuesta a la infección por la bacteria (Patras et al. 2013). Otro grupo encontró un incremento en TNF- α e IL-1 β después de la colonización por *S. agalactiae* (Carey et al. 2014). A pesar de los estudios previos no ha sido posible identificar con claridad un perfil de citocinas inducido por *S. agalactiae* y menos aún si existe un perfil asociado con cada uno de los serotipos de la bacteria. Otros trabajos se han enfocado en definir el papel de las citocinas inflamatorias en la patogénesis de la enfermedad. En ellos encontraron que *S. agalactiae* induce altos niveles de TNF- α , IL-1b, IL-6 y IFN- γ (Rosati et al 1998). Nuestro grupo utilizó 5 serotipos de *S. agalactiae* para evaluar si activaban de manera diferencial la expresión de 6 citocinas. IL-6 se expresa de forma inmediata y transitoria en respuesta a estrés ambiental como infecciones y daño de tejidos (Tanaka et al. 2014). No se detectó una variación significativa de la IL-6 en fluidos vaginales después de la infección con los distintos serotipos, lo cual puede deberse a que la primera medición se realizó el día 5 después de la infección y los niveles pudieron descender, sin embargo, los niveles se mantuvieron bajos en el microambiente vaginal durante toda la infección, lo cual indica que no es una pieza esencial en la respuesta inmune a *S. agalactiae* por parte de ratones BALB/c a diferencia de lo reportado en estudios previos en ratones CD1.

Por su parte la IL-10 es una citocina de naturaleza antiinflamatoria que regula a la baja las respuestas inmunes inflamatorias. La concentración de IL-10 presentó cambios después de la inoculación con el serotipo Ib, se mantuvo en niveles basales 5 días después de la infección, pero se observa un incremento significativo los días 10 y 15. Se ha reportado que niveles elevados de IL-10 pueden evitar la eliminación de algunas bacterias (Peñaloza et al. 2016), lo cual explica por qué después de 15 días es el único serotipo que no había sido eliminado por completo de todos los ratones, a pesar de no ser el serotipo con más carga bacteriana en los hisopados vaginales. En reportes previos Cusumano et al. en 1996 encontraron en un modelo neonatal murino que los niveles de IL-10 se incrementaban después de 24 y 48 h de la inoculación con *S. agalactiae*, sugiriendo una respuesta temprana por parte de la citocina, las diferencias observadas podrían deberse a que las mediciones de su grupo de trabajo y el nuestro se realizaron en momentos muy diferentes, además la respuesta inmune en un ratón con pocas horas de

vida no evolucionará igual que uno adulto, otro factor importante a tomar en cuenta es la vía de administración de la bacteria, ya que se induce una respuesta más agresiva por vía subcutánea.

La MCP-1 se elevó considerablemente el día 15 después de la infección con el serotipo Ib, lo cual sugiere que la citocina necesita tiempo para ser liberada después del reto con la bacteria, parece que no es expresada en etapas tempranas de la infección al momento del reconocimiento de *S. agalactiae* por parte del sistema inmune, lo cual contrasta con trabajos previos donde la citocina es detectada en etapas tempranas de la infección (Gomes et al. 2013), sin embargo, las infecciones evolucionan de distinta manera dependiendo de la bacteria causante y las características propias del individuo afectado.

Se encuentra bien establecido el papel de TNF- α en respuesta a infecciones, una disminución en su concentración se relacione con problemas por parte del organismo para eliminar una infección (Crawford y Curtis 2008). Los niveles se vieron afectados por dos serotipos: Ib y III, los cuales provocaron variaciones en los niveles de la citocina con respecto a los otros serotipos. Por su parte el serotipo Ib ocasiona que los niveles de TNF- α aumenten durante la infección inicial pero la concentración se desploma el día 15, lo cual coincide con el aumento de la IL-10, lo que podría explicar una supresión de las respuestas inflamatorias, permitiendo así que la colonización por parte de la bacteria perdure por más tiempo que los otros serotipos. En un trabajo previo Wang et al. en 2014 evaluaron el papel de la hialuronidasa en la infección por *S. agalactiae*. Encontraron que la hialuronidasa tiene una alta influencia en la supervivencia intracelular de *S. agalactiae* y en la expresión de citocinas proinflamatorias, ya que limita la secreción de citocinas proinflamatorias como IL-1b, IL-6 y TNF- α en macrófagos RAW264.7 y ratones BALB/c mediante administración IP, lo anterior podría explicar los bajos niveles observados de la IL-6 y TNF- α en nuestro trabajo, sin embargo, al administrar a la bacteria por vía IP se dejan de lado muchas líneas de defensa del hospedero en el proceso infeccioso. El IFN- γ y la IL-12p70 no presentaron variaciones en su concentración en el microambiente vaginal. En un reporte reciente se encontró una diferencia significativa en los niveles séricos de citocinas proinflamatorias de mujeres sanas que habían abortado por *S. agalactiae* e identificaron una alta

expresión de CD79 y CD54 en mujeres infectadas (Njum et al. 2019). Información sobre las citocinas liberadas podría ayudar a utilizar citocinas específicas o anticuerpos neutralizantes de citocinas para potenciar una resistencia contra la bacteria.

Se observó que los serotipos de *S. agalactiae* tienen un comportamiento distinto al momento de causar la infección, difieren en su capacidad de colonizar el tracto vaginal y en las citocinas que son liberadas por el hospedero en respuesta a su estímulo. Más estudios son necesarios para comprender a profundidad el comportamiento de cada serotipo en particular y poder eliminar a *S. agalactiae* como un problema de salud.

Mecanismos de defensa específicos y no específicos se encuentran involucrados en la resistencia a la infección por *S. agalactiae*. Concentraciones específicas de anticuerpos específicos y actividad del complemento en el suero, así como fagocitos mono y polimorfonucleares contribuyen a la respuesta inmune contra *S. agalactiae* (Rosati et al. 1998). Por tal motivo es muy importante evaluar la concentración de anticuerpos después de la infección. La producción de IgG después de la exposición al antígeno ocurre varios días o semanas después de IgM. Mediante su unión a los receptores Fc IgG media la fagocitosis, eliminación de complejos inmunes y otras funciones, también es el único tipo de anticuerpo que cruza la placenta, confiriendo resistencia al feto y al neonato hasta que su sistema inmune desarrolla la capacidad de producir anticuerpos, lo cual es muy importante en la infección causada por *S. agalactiae* ya que una elevada concentración de IgG podría brindar protección al feto. (Furst, 2009). La deficiencia en IgG se encuentra implicada en una susceptibilidad aumentada a infecciones. A pesar de que los subtipos de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) desempeñan papeles distintos en los mecanismos de defensa, la pérdida de un subtipo es muy poco común. La respuesta inmune a polisacáridos capsulares bacterianos puede estar restringidas a IgG2 y una deficiencia de ella puede resultar en una ausencia total de anticuerpos anti-carbohidratos. Una aumentada susceptibilidad a ciertas infecciones bacterianas se encuentra asociada con deficiencias de IgG2 (Vidarsson et al. 2014).

Nuestro equipo de trabajo encontró una diferencia significativa entre los niveles de IgG total después de la inoculación con los distintos serotipos de *S. agalactiae*, lo que sugiere que no todos los serotipos son reconocidos de la misma forma por el sistema

inmune. Se detectó una menor cantidad de IgG sérica después de la infección con el serotipo III y IV, un resultado inesperado ya que la disminución en los niveles de IgG suele estar asociada con inmunodeficiencias primarias o secundarias y no en respuesta a infecciones.

Pocos estudios han evaluado la presencia de anticuerpos contra *S. agalactiae* en un modelo murino. En 2017 Bernardini et al. evaluaron los efectos de la inmunización materna en un modelo murino de colonización vaginal por *S. agalactiae* utilizando aislados clínicos. Encontraron un incremento en los niveles de IgG contra *S. agalactiae* en comparación con los individuos que no fueron inmunizados y también detectaron mayores niveles de anticuerpos en la descendencia. También encontraron una respuesta Th1 predominante, así como niveles elevados de IgG2a y IFN- γ . sin embargo, la metodología utilizada fue diferente ya realizaron múltiples inoculaciones en un periodo de tiempo corto, así como una inoculación con bacterias muertas por calor, el estímulo constante pudo influir en la liberación de IFN- γ , a diferencia de lo observado en nuestro estudio. En otro estudio encontraron que una vacuna oral basada en la proteína inmunogénica de superficie (SIP) de *S. agalactiae* reduce la colonización vaginal e induce anticuerpos específicos en un modelo murino, además induce de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-2 (Diaz-Dinamarca et al. 2018). Otro grupo de trabajo analizó la asociación entre niveles séricos de anticuerpos contra 11 proteínas de superficie de *S. agalactiae* y la colonización recto-vaginal durante el embarazo. Encontraron que altos niveles de IgG reducían la probabilidad de ser colonizadas por la bacteria (Dzanibe et al 2017). Por su parte, el grupo de Mackie et al. realizó una evaluación en novillas, encontraron una inversión del radio normal de IgG1-IgG2 en vaquillas vacunadas contra *S. agalactiae*, probablemente a causa de una respuesta contra el polisacárido capsular de la bacteria, también reportaron un incremento en las concentraciones séricas de IgA e IgM durante la infección (Mackie et al. 1996), lo cual demuestra la complejidad de la respuesta inmune contra *S. agalactiae*.

A pesar de los diversos modelos utilizados para evaluar al estreptococo la mayoría de los estudios han sido conducidos en humanos. En un estudio realizado en 1996, se halló que las mujeres que se encontraban colonizadas por *S. agalactiae* presentaban un marcado

incremento en los niveles de IgA e IgG contra *S. agalactiae* en secreciones cervicales y también presentaban un moderado incremento de IgA en suero. Mujeres colonizadas únicamente en el cérvix presentaban un incremento de IgA e IgG en secreciones vaginales, pero sus niveles de anticuerpos en el suero no se encontraban elevados, al igual que en las mediciones observadas en nuestro experimento con excepción del serotipo III y V. En las secreciones cervicales el aumento más pronunciado fue de IgG, indicando una respuesta inmune involucrando tanto a IgG como a IgA. (Hordnes et al. 1996). Lo anterior indica que la liberación de anticuerpos en respuesta a la infección comúnmente ocurre en un microambiente local y que la bacteria no es tan agresiva para detectar sus efectos a un nivel sistémico.

En el proyecto europeo DEVANI, se encontró una correlación entre títulos altos de anticuerpos maternos contra el polisacárido capsular y un riesgo menor de enfermedad neonatal (Lee et al. 2018). Resaltando la importancia de evaluar los niveles de IgG en respuesta a la infección, ya que es la única inmunoglobulina capaz de conferir resistencia al neonato. Fabbrini et al. en 2018 encontraron una mayor concentración de IgG en respuesta a los serotipos Ia y III comparados con el Ib, lo que sugiere que se necesita una mayor concentración de IgG contra el serotipo Ib para realizar la fagocitosis. Lo anterior respalda nuestra hipótesis ya que los distintos serotipos activan de forma diferencial la respuesta inmune, lo cual podría ser al menos en parte debido a la composición de su polisacárido capsular.

Las diferencias en la respuesta de inmunoglobulinas contra dos bacterias podrían reflejar diferencias bioquímicas en los polisacáridos expresados. Por ejemplo, el polisacárido capsular tipo C de *Neisseria meningitidis* y el polisacárido capsular del serotipo V de *S. agalactiae*, pero no NP-Ficolin inhiben algunas funciones de células B que son mediadas por BAFF y APRIL, lo cual podría explicar parcialmente la baja observada en los niveles de IgG después de la inoculación con el serotipo V (Snapper et al. 2012).

Nuestro estudio confirma que los modelos murinos de colonización vaginal continúan siendo sumamente valiosos en el análisis de patógenos humanos, ayudando a obtener una mejor comprensión de las interacciones entre *S. agalactiae* y su hospedero. Los distintos serotipos de *S. agalactiae* activaron de forma diferencial las respuestas inmunes

innata y adaptativa. En conjunto con los resultados conseguidos por otros grupos de investigación, se espera que los obtenidos en el presente trabajo contribuyan al menos en una pequeña parte a comprender mejor la naturaleza de la respuesta inmune contra *S. agalactiae* y en un futuro a erradicarlo como un problema de salud.

9. CONCLUSIONES

1. Se identificaron los serotipos Ib, II, III, IV y V.
2. *S. agalactiae* es capaz de colonizar la cavidad vaginal de ratones BALB/c.
3. Los serotipos III y IV colonizaron la cavidad vaginal con una mayor carga bacteriana
4. La infección en ratones BALB/c dura entre 1-2 semanas.
5. La liberación de citocinas varía dependiendo del serotipo inoculado.
6. Los serotipos III y V provocan una disminución en los niveles de IgG total en ratones BALB/c.

10. PERSPECTIVAS

- Aislar serotipos con los que no se cuenta y encontrar muestras no tipificables.
- Establecer un modelo de infección que perdure por periodos de tiempo más largos.
- Implementar un modelo murino de transmisión vertical.
- Aislar el polisacárido capsular de cada serotipo para evaluar la respuesta inmune humoral de forma específica.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Acharya T. 2015. Lancefield grouping of clinically relevant beta-hemolytic streptococci. [Online] Disponible en: <http://microbeonline.com/lancefield-grouping-clinically-relevant-beta-hemolytic-streptococci/>
- Agboluaje, M., & Sauvageau, D. (2018). Bacteriophage production in bioreactors. In *Bacteriophage Therapy* (pp. 173-193). Humana Press, New York, NY.
- Agnew, D. W., Corbeil, L. B., Munson, L., Byrne, B. A., & BonDurant, R. H. (2008). A pregnant mouse model for bovine *Tritrichomonas foetus* infection. *Veterinary pathology*, 45(6), 849-864.
- Ando, H., Lemire, S., Pires, D. P., & Lu, T. K. (2015). Engineering modular viral scaffolds for targeted bacterial population editing. *Cell systems*, 1(3), 187-196.
- Andrews, J. I., Diekema, D. J., Hunter, S. K., Rhomberg, P. R., Pfaller, M. A., Jones, R. N., & Doern, G. V. (2000). Group B streptococci causing neonatal bloodstream infection: antimicrobial susceptibility and serotyping results from SENTRY centers in the Western Hemisphere. *American journal of obstetrics and gynecology*, 183(4), 859-862.
- Alfa, M. J., Sepehri, S., De Gagne, P., Helawa, M., Sandhu, G., & Harding, G. K. (2010). Real-time PCR assay provides reliable assessment of intrapartum carriage of group B Streptococcus. *Journal of clinical microbiology*, 48(9), 3095-3099.
- American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases, Committee on Fetus and Newborn. Revised guidelines for prevention of early-onset group B streptococcal (GBS) disease. *Pediatrics* 1997;99:489-96.
- Badia, J. M., Casey, A. L., Petrosillo, N., Hudson, P. M., Mitchell, S. A., & Crosby, C. (2017). Impact of surgical site infection on healthcare costs and patient outcomes: a systematic review in six European countries. *Journal of Hospital Infection*, 96(1), 1-15.
- Baker, C. J. (2000). Group B streptococcal infections. *Clinical aspects, microbiology, and molecular pathogenesis*, 222-237.

Baker, C. J., & Barrett, F. F. (1974). Group B streptococcal infections in infants: the importance of the various serotypes. *Jama*, 230(8), 1158-1160.

Baker, C. J., & Edwards, M. S. (1995). Group B streptococcal infections, p. 980-1054. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. WB Saunders, Philadelphia, PA.

Edwards, M. S., & Baker, C. J. (2001). Group B streptococcal infections, p 1091–1156. *Infectious diseases of the fetus and the newborn infant, 5th ed.* WB Saunders Co, Philadelphia, PA.

Baron S. 1996. Medical Microbiology. 4th edition. Chapter 13. [Online]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7611/>

Belard, S., Toepfner, N., Capan-Melser, M., Mombo-Ngoma, G., Zoleko-Manego, R., Groger, M., ... & Kremsner, P. G. (2015). Streptococcus agalactiae serotype distribution and antimicrobial susceptibility in pregnant women in Gabon, Central Africa. *Scientific reports*, 5, 17281.

Bernardini, R., Aufieri, R., Detcheva, A., Recchia, S., Cicconi, R., Amicosante, M., ... & Orefici, G. (2017). Neonatal protection and preterm birth reduction following maternal group B streptococcus vaccination in a mouse model. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 30(23), 2844-2850.

Blumberg, H. M., Stephens, D. S., Modansky, M., Erwin, M., Elliot, J., Facklam, R. R., ... & Farley, M. M. (1996). Invasive group B streptococcal disease: the emergence of serotype V. *Journal of Infectious Diseases*, 173(2), 365-373.

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.

Boyer, K. M., & Gotoff, S. P. (1986). Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease with selective intrapartum chemoprophylaxis. *New England Journal of Medicine*, 314(26), 1665-1669.

Brunklaus, S., Hansen-Hagge, T. E., Erwes, J., Höth, J., Jung, M., Latta, D., ... & Drese, K. S. (2012). Fast nucleic acid amplification for integration in point-of-care applications. *Electrophoresis*, 33(21), 3222-3228.

Burke, R. M., McKenna, J. P., Cox, C., Coyle, P. V., Shields, M. D., & Fairley, D. J. (2016). A comparison of different pre-lysis methods and extraction kits for recovery of *Streptococcus agalacticae* (Lancefield group B *Streptococcus*) DNA from whole blood. *Journal of microbiological methods*, 129, 103-108.

Cai, Q., Fauvart, M., Wiederkehr, R. S., Jones, B., Cools, P., Goos, P., ... & Stakenborg, T. (2019). Ultra-fast, sensitive and quantitative on-chip detection of group B streptococci in clinical samples. *Talanta*, 192, 220-225.

Caliot, E., Dramsi, S., Chapot-Chartier, M. P., Courtin, P., Kulakauskas, S., Péchoux, C., ... & Mistou, M. Y. (2012). Role of the Group B antigen of *Streptococcus agalactiae*: a peptidoglycan-anchored polysaccharide involved in cell wall biogenesis. *PLoS pathogens*, 8(6), e1002756.

Carey, A. J., Tan, C. K., Mirza, S., Irving-Rodgers, H., Webb, R. I., Lam, A., & Ulett, G. C. (2014). Infection and cellular defense dynamics in a novel 17 β -estradiol murine model of chronic human group B streptococcus genital tract colonization reveal a role for hemolysin in persistence and neutrophil accumulation. *The Journal of Immunology*, 192(4), 1718-1731.

CDC. 2017. Group B strep. [Online]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/groupbstrep/index.html>

Cheng, Q., Nelson, D., Zhu, S., & Fischetti, V. A. (2005). Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(1), 111-117.

Cieslewicz, M. J., Chaffin, D., Glusman, G., Kasper, D., Madan, A., Rodrigues, S., ... & Rubens, C. E. (2005). Structural and genetic diversity of group B streptococcus capsular polysaccharides. *Infection and immunity*, 73(5), 3096-3103.

Collado, M. D. L., Kretschmer, R. R., Becker, I., Guzmán, A., Gallardo, L., & Lepe, C. M. (1981). Colonization of Mexican pregnant women with group B Streptococcus. *Journal of Infectious Diseases*, *143*(1), 134-134.

Collin, S. M., Shetty, N., Guy, R., Nyaga, V. N., Bull, A., Richards, M. J., ... & Lamagni, T. (2019). Group B Streptococcus in surgical site and non-invasive bacterial infections worldwide: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, *83*, 116-129.

Committee on Obstetric Practice. Prevention of early-onset group B streptococcal disease in newborns. ACOG committee opinion. No. 173. Washington, D.C.: American College of Obstetricians and Gynecologists, 1996.

Cools, P., & Melin, P. (2017). Group B Streptococcus and perinatal mortality. *Research in microbiology*, *168*(9-10), 793-801.

Crawford, M., & Curtis, J. R. (2008). Tumor necrosis factor inhibitors and infection complications. *Current rheumatology reports*, *10*(5), 383.

Cusumano, V., Genovese, F., Mancuso, G., Carbone, M., Fera, M. T., & Teti, G. (1996). Interleukin-10 protects neonatal mice from lethal group B streptococcal infection. *Infection and immunity*, *64*(7), 2850-2852.

Deng, L., Kasper, D. L., Krick, T. P., & Wessels, M. R. (2000). Characterization of the linkage between the Type III capsular polysaccharide and the bacterial cell wall of group BStreptococcus. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(11), 7497-7504.

Diaz-Dinamarca, D. A., Soto, D. A., Leyton, Y. Y., Altamirano-Lagos, M. J., Avendaño, M. J., Kalergis, A. M., & Vasquez, A. E. (2018). Oral vaccine based on a surface immunogenic protein mixed with alum promotes a decrease in Streptococcus agalactiae vaginal colonization in a mouse model. *Molecular immunology*, *103*, 63-70.

Donders, G. G., Halperin, S. A., Devlieger, R., Baker, S., Forte, P., Wittke, F., ... & Dull, P. M. (2016). Maternal immunization with an investigational trivalent group B streptococcal vaccine: a randomized controlled trial. *Obstetrics & Gynecology*, *127*(2), 213-221.

- Doran, K. S., & Nizet, V. (2004). Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. *Molecular microbiology*, 54(1), 23-31.
- Dzanibe, S., Kwatra, G., Adrian, P. V., Kimaro-Mlacha, S. Z., Cutland, C. L., & Madhi, S. A. (2017). Association between antibodies against group B Streptococcus surface proteins and recto-vaginal colonisation during pregnancy. *Scientific reports*, 7(1), 16454.
- Edwards, J. M., Watson, N., Focht, C., Wynn, C., Todd, C. A., Walter, E. B., ... & Swamy, G. K. (2019). Group B Streptococcus (GBS) Colonization and Disease among Pregnant Women: A Historical Cohort Study. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 2019.
- Ekelund, K., Slotved, H. C., Nielsen, H. U., Kaltoft, M. S., & Konradsen, H. B. (2003). Emergence of invasive serotype VIII group B streptococcal infections in Denmark. *Journal of clinical microbiology*, 41(9), 4442-4444.
- El Aila, N. A., Tency, I., Claeys, G., Verstraelen, H., Deschaght, P., Decat, E., ... & Vaneechoutte, M. (2011). Comparison of culture with two different qPCR assays for detection of rectovaginal carriage of Streptococcus agalactiae (group B streptococci) in pregnant women. *Research in microbiology*, 162(5), 499-505.
- Escario, A., Barrio, A. G., Diez, B. S., & Escario, J. A. (2010). Immunohistochemical study of the vaginal inflammatory response in experimental trichomoniasis. *Acta tropica*, 114(1), 22-30.
- Eschenbach DA. 2018. Specific Bacterial Infections: Group B Streptococcus. [Online]. Disponible en: http://www.glowm.com/section_view/heading/Specific%20Bacterial%20Infections:%20Group%20B%20Streptococcus/item/179
- Fabbrini, M., Rigat, F., Tuscano, G., Chiarot, E., Donders, G., Devlieger, R., ... & Halperin, S. A. (2018). Functional activity of maternal and cord antibodies elicited by an investigational group B Streptococcus trivalent glycoconjugate vaccine in pregnant women. *Journal of Infection*, 76(5), 449-456.
- Farley, M. M., & Strasbaugh, L. J. (2001). Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clinical Infectious Diseases*, 33(4), 556-561.

- Farrar, J. S., & Wittwer, C. T. (2015). Extreme PCR: efficient and specific DNA amplification in 15–60 seconds. *Clinical chemistry*, *61*(1), 145-153.
- Figueroa, J. R., Ibarra, F. J. O., Jaramillo, A. E., & Román, G. C. (2007). Colonización materna por Streptococcus del grupo B en México: estimación de la prevalencia basada en la revisión bibliográfica. *Ginecol Obstet Mex*, *75*(7), 399-403.
- Fry, R. M. (1938). Fatal Infections by Haemolytic Streptococcus Group B. *Lancet*, 199-201.
- Foxman, B., & Riley, L. (2001). Molecular epidemiology: focus on infection. *American journal of epidemiology*, *153*(12), 1135-1141.
- Furfaro, L. L., Chang, B. J., & Payne, M. S. (2018). Perinatal Streptococcus agalactiae epidemiology and surveillance targets. *Clinical microbiology reviews*, *31*(4), e00049-18.
- Furr, P. M., Hetherington, C. M., & Taylor-Robinson, D. (1989). The susceptibility of germ-free, oestradiol-treated, mice to Mycoplasma hominis. *Journal of medical microbiology*, *30*(3), 233-236.
- Furst, D. E. (2009, August). Serum immunoglobulins and risk of infection: how low can you go?. In *Seminars in arthritis and rheumatism* (Vol. 39, No. 1, pp. 18-29). WB Saunders.
- Gause, W. C., Wynn, T. A., & Allen, J. E. (2013). Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths. *Nature Reviews Immunology*, *13*(8), 607-614.
- Giersing, B. K., Modjarrad, K., Kaslow, D. C., Moorthy, V. S., Bavdekar, A., Cichutek, K., ... & Lanata, C. F. (2016). Report from the World Health Organization's Product Development for Vaccines Advisory Committee (PDVAC) meeting, Geneva, 7–9th Sep 2015. *Vaccine*, *34*(26), 2865-2869.
- Gomes, R. N., Teixeira-Cunha, M. G., Figueiredo, R. T., Almeida, P. E., Alves, S. C., Bozza, P. T., ... & Castro-Faria-Neto, H. C. (2013). Bacterial clearance in septic mice is modulated by MCP-1/CCL2 and nitric oxide. *Shock (Augusta, Ga.)*, *39*(1), 63.

- Hall, J., Adams, N. H., Bartlett, L., Seale, A. C., Lamagni, T., Bianchi-Jassir, F., ... & Ip, M. (2017). Maternal disease with group B Streptococcus and serotype distribution worldwide: systematic review and meta-analyses. *Clinical infectious diseases*, 65(suppl_2), S112-S124.
- Han, G., Martinez, L. R., Mihu, M. R., Friedman, A. J., Friedman, J. M., & Nosanchuk, J. D. (2009). Nitric oxide releasing nanoparticles are therapeutic for Staphylococcus aureus abscesses in a murine model of infection. *PloS one*, 4(11), e7804.
- Hirvonen, S. (2017). Rapid detection of Streptococcus agalactiae using Strand Invasion Based Amplification (SIBA®) Method.
- Hood, M., Janney, A., & Dameron, G. (1961). Beta hemolytic streptococcus group B associated with problems of the perinatal period. *American journal of obstetrics and gynecology*, 82(4), 809-818.
- Hordnes, K., Tynning, T., Kvam, A. I., Jonsson, R., & Haneberg, B. (1996). Colonization in the rectum and uterine cervix with group B streptococci may induce specific antibody responses in cervical secretions of pregnant women. *Infection and immunity*, 64(5), 1643-1652.
- Hu, X., & Ivashkiv, L. B. (2009). Cross-regulation of signaling pathways by interferon- γ : implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity*, 31(4), 539-550.
- Imperi, M., Pataracchia, M., Alfarone, G., Baldassarri, L., Orefici, G., & Creti, R. (2010). A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of Streptococcus agalactiae. *Journal of microbiological methods*, 80(2), 212-214.
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *science*, 327(5963), 291-295.
- Jerse, A. E. (1999). Experimental gonococcal genital tract infection and opacity protein expression in estradiol-treated mice. *Infection and immunity*, 67(11), 5699-5708.

- Kapatai, G., Patel, D., Efstratiou, A., & Chalker, V. J. (2017). Comparison of molecular serotyping approaches of *Streptococcus agalactiae* from genomic sequences. *BMC genomics*, *18*(1), 429.
- Kao, Y., Tsai, M. H., Lai, M. Y., Chu, S. M., Huang, H. R., Chiang, M. C., ... & Hsu, J. F. (2019). Emerging serotype III sequence type 17 group B streptococcus invasive infection in infants: the clinical characteristics and impacts on outcomes. *BMC Infectious Diseases*, *19*(1), 538.
- Kernéis, S., Plainvert, C., Barnier, J. P., Tazi, A., Dmytruk, N., Gislain, B., ... & Vernet, V. (2017). Clinical and microbiological features associated with group B *Streptococcus* bone and joint infections, France 2004–2014. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *36*(9), 1679-1684.
- Khalifa, L., Copenhagen-Glazer, S., Shlezinger, M., Kott-Gutkowski, M., Adini, O., Beyth, N., & Hazan, R. (2015). Complete genome sequence of *Enterococcus* bacteriophage EFLK1. *Genome Announc.*, *3*(6), e01308-15.
- Kurtböke, D. I. (2005). Actinophages as indicators of actinomycete taxa in marine environments. *Antonie van Leeuwenhoek*, *87*(1), 19-28.
- Lachenauer, C. S., Kasper, D. L., Shimada, J., Ichiman, Y., Ohtsuka, H., Kaku, M., ... & Madoff, L. C. (1999). Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. *The Journal of infectious diseases*, *179*(4), 1030-1033.
- Lacy, P., & Stow, J. L. (2011). Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *118*(1), 9-18.
- Lancefield, R. C. (1934). A serological differentiation of specific types of bovine hemolytic streptococci (group B). *The Journal of experimental medicine*, *59*(4), 441.
- Lancefield, R. C., & Hare, R. (1935). The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of hemolytic streptococci from parturient women. *The Journal of experimental medicine*, *61*(3), 335.

- Landwehr-Kenzel, S., & Henneke, P. (2014). Interaction of *Streptococcus agalactiae* and cellular innate immunity in colonization and disease. *Frontiers in immunology*, *5*, 519.
- Lawn, J. E., Bianchi-Jassir, F., Russell, N. J., Kohli-Lynch, M., Tann, C. J., Hall, J., ... & Gravett, M. G. (2017). Group B streptococcal disease worldwide for pregnant women, stillbirths, and children: why, what, and how to undertake estimates?. *Clinical infectious diseases*, *65*(suppl_2), S89-S99.
- Le Doare, K., & Heath, P. T. (2013). An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine*, *31*, D7-D12.
- Lee, J. H., Kim, H. W., & Kim, K. H. (2018). Seroprevalence of opsonophagocytic antibodies against serotype Ia, Ib, II, III, and V group B streptococcus among Korean population. *Journal of Korean Medical Science*, *33*(16).
- Lin, S. M., Zhi, Y., Ahn, K. B., Lim, S., & Seo, H. S. (2018). Status of group B streptococcal vaccine development. *Clinical and experimental vaccine research*, *7*(1), 76-81.
- Łobocka, M. B., Głowacka, A., & Golec, P. (2018). Methods for bacteriophage preservation. In *Bacteriophage Therapy* (pp. 219-230). Humana Press, New York, NY.
- Mackie, D. P., & Logan, E. F. (1986). Changes in immunoglobulin levels in whey during experimental *Streptococcus agalactiae* mastitis. *Research in veterinary science*, *40*(2), 183-188.
- Madhi, S. A., Koen, A., Cutland, C. L., Jose, L., Govender, N., Wittke, F., ... & Narasimhan, V. (2017). Antibody kinetics and response to routine vaccinations in infants born to women who received an investigational trivalent group B *Streptococcus* polysaccharide CRM197-conjugate vaccine during pregnancy. *Clinical Infectious Diseases*, *65*(11), 1897-1904.
- Madrid, L., Seale, A. C., Kohli-Lynch, M., Edmond, K. M., Lawn, J. E., Heath, P. T., ... & Gravett, M. G. (2017). Infant group B streptococcal disease incidence and serotypes worldwide: systematic review and meta-analyses. *Clinical infectious diseases*, *65*(suppl_2), S160-S172.

Maisey, H. C., Doran, K. S., & Nizet, V. (2008). Recent advances in understanding the molecular basis of group B Streptococcus virulence. *Expert reviews in molecular medicine*, 10.

Manning, S. D., Neighbors, K., Tallman, P. A., Gillespie, B., Marrs, C. F., Borchardt, S. M., ... & Foxman, B. (2004). Prevalence of group B streptococcus colonization and potential for transmission by casual contact in healthy young men and women. *Clinical Infectious Diseases*, 39(3), 380-388.

Martín, V., Cárdenas, N., Ocaña, S., Marín, M., Arroyo, R., Beltrán, D., ... & Rodríguez, J. M. (2019). Rectal and Vaginal Eradication of Streptococcus agalactiae (GBS) in Pregnant Women by Using Lactobacillus salivarius CECT 9145, A Target-specific Probiotic Strain. *Nutrients*, 11(4), 810.

McGettrick, A. F., & O'Neill, L. A. (2007). Toll-like receptors: key activators of leucocytes and regulator of haematopoiesis. *British journal of haematology*, 139(2), 185-193.

McGrory, T. H. E. R. E. S. E., & Garber, G. E. (1992). Mouse intravaginal infection with Trichomonas vaginalis and role of Lactobacillus acidophilus in sustaining infection. *Infection and immunity*, 60(6), 2375-2379.

McGowin, C. L., Spagnuolo, R. A., & Pyles, R. B. (2010). Mycoplasma genitalium rapidly disseminates to the upper reproductive tracts and knees of female mice following vaginal inoculation. *Infection and immunity*, 78(2), 726-736.

McKenna, J. P., Cox, C., Fairley, D. J., Burke, R., Shields, M. D., Watt, A., & Coyle, P. V. (2017). Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Streptococcus agalactiae (group B streptococcus) in vaginal swabs—a proof of concept study. *Journal of medical microbiology*, 66(3), 294-300.

Meehan, M., Cafferkey, M., Corcoran, S., Foran, A., Hapnes, N., LeBlanc, D., ... & Drew, R. (2015). Real-time polymerase chain reaction and culture in the diagnosis of invasive group B streptococcal disease in infants: a retrospective study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(12), 2413-2420.

- Melin, P., & Efstratiou, A. (2013). Group B streptococcal epidemiology and vaccine needs in developed countries. *Vaccine*, *31*, D31-D42.
- Michon, F., Katzenellenbogen, E., Kasper, D. L., & Jennings, H. J. (1987). Structure of the complex group-specific polysaccharide of group B Streptococcus. *Biochemistry*, *26*(2), 476-486.
- Michon, F., Brisson, J. R., Dell, A., Kasper, D. L., & Jennings, H. J. (1988). Multiantennary group-specific polysaccharide of group B Streptococcus. *Biochemistry*, *27*(14), 5341-5351.
- Mitchell, T. J. (2003). The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nature Reviews Microbiology*, *1*(3), 219.
- Mitchell, C., Gottsch, M. L., Liu, C., Fredricks, D. N., & Nelson, D. B. (2013). Associations between vaginal bacteria and levels of vaginal defensins in pregnant women. *American journal of obstetrics and gynecology*, *208*(2), 132-e1.
- Mohle-Boetani, J. C., Schuchat, A., Plikaytis, B. D., Smith, J. D., & Broome, C. V. (1993). Comparison of prevention strategies for neonatal group B streptococcal infection: a population-based economic analysis. *Jama*, *270*(12), 1442-1448.
- Montgomery, J. L., Rejali, N., & Wittwer, C. T. (2013). Stopped-flow DNA polymerase assay by continuous monitoring of dNTP incorporation by fluorescence. *Analytical biochemistry*, *441*(2), 133-139.
- Morach, M., Stephan, R., Schmitt, S., Ewers, C., Zschöck, M., Reyes-Velez, J., ... & Daubenberger, C. A. (2018). Population structure and virulence gene profiles of Streptococcus agalactiae collected from different hosts worldwide. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *37*(3), 527-536.
- Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdts, S., ... & Locati, M. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, *41*(1), 14-20.
- Neuzil, P., Zhang, C., Pipper, J., Oh, S., & Zhuo, L. (2006). Ultra fast miniaturized real-time PCR: 40 cycles in less than six minutes. *Nucleic acids research*, *34*(11), e77-e77.

Nikolaitchouk, N., Andersch, B., Falsen, E., Stroembeck, L., & MATTSBY-BALTZER, I. N. G. E. R. (2008). The lower genital tract microbiota in relation to cytokine-, SLPI- and endotoxin levels: application of checkerboard DNA-DNA hybridization (CDH). *Apmis*, *116*(4), 263-77.

NIZET, V., FERRIERI, P., & RUBENS, C. E. (2000). Molecular Pathogenesis of Group B Streptococcal. *Streptococcal infections: clinical aspects, microbiology, and molecular pathogenesis*, 180.

Njum, A. A., Alwan, J. A., & Abdul-Hassan, L. S. (2019). Role of Inflammatory Cytokines and Immune Reactive Molecules in Pathogenesis of Streptococcus Agalactiae in Aborted Healthy Women. *Indian Journal of Public Health Research & Development*, *10*(8), 884-889.

Noguchi, K., Tsukumi, K., & Urano, T. (2003). Qualitative and quantitative differences in normal vaginal flora of conventionally reared mice, rats, hamsters, rabbits, and dogs. *Comparative medicine*, *53*(4), 404-412.

Palacios-Saucedo, G., Caltenco-Serrano, R., Torres-López, J., Tapia-Conyer, R., Muñoz-Hernández, O., & Solórzano-Santos, F. (2002). Exposición a Estreptococo del grupo B en mujeres mexicanas en edad reproductiva. *Salud pública de México*, *44*, 50-56.

Palacios, G. C., Gonzalez, M. N., Beltran, M., Arredondo, J. L., Torres, J., & Solorzano, 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*(1), 42-47.

Palacios-Saucedo, G. C., Hernández-Hernández, T. I., Rivera-Morales, L. G., Briones-Lara, E., Caballero-Trejo, A., Vázquez-Guillén, J. M., ... & Rodríguez-Padilla, C. (2017). Infección perinatal por estreptococo del grupo B: panorama global, en América Latina y en México. *Gaceta Médica de México*, *153*(3), 361-370.

Pannaraj PS y Baker CJ. 2014. Group B streptococcal infections. Feigin and Cherry's Textbook of pediatric infectious diseases. 7th ed. Elsevier Saunders. Philadelphia, pp. 1153-1169.

Paoletti, L. C., & Kasper, D. L. (2003). Glycoconjugate vaccines to prevent group B streptococcal infections. *Expert opinion on biological therapy*, 3(6), 975-984.

Parr, M. B., Kepple, L., McDermott, M. R., Drew, M. D., Bozzola, J. J., & Parr, E. L. (1994). A mouse model for studies of mucosal immunity to vaginal infection by herpes simplex virus type 2. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 70(3), 369-380.

Pascual, L., Ruiz, F., Giordano, W., & Barberis, I. L. (2010). Vaginal colonization and activity of the probiotic bacterium *Lactobacillus fermentum* L23 in a murine model of vaginal tract infection. *Journal of Medical Microbiology*, 59(3), 360-364.

Patras, K. A., Wang, N. Y., Fletcher, E. M., Cavaco, C. K., Jimenez, A., Garg, M., ... & Doran, K. S. (2013). Group B S treptococcus CovR regulation modulates host immune signalling pathways to promote vaginal colonization. *Cellular microbiology*, 15(7), 1154-1167.

Patras, K. A., Rösler, B., Thoman, M. L., & Doran, K. S. (2015). Characterization of host immunity during persistent vaginal colonization by Group B Streptococcus. *Mucosal immunology*, 8(6), 1339.

Peñaloza, H. F., Schultz, B. M., Nieto, P. A., Salazar, G. A., Suazo, I., Gonzalez, P. A., ... & Bueno, S. M. (2016). Opposing roles of IL-10 in acute bacterial infection. *Cytokine & growth factor reviews*, 32, 17-30.

Picard, F. J., & Bergeron, M. G. (2004). Laboratory detection of group B Streptococcus for prevention of perinatal disease. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23(9), 665-671.

del Pilar Crespo-Ortiz, M., Castañeda-Ramirez, C. R., Recalde-Bolaños, M., & Vélez-Londoño, J. D. (2014). Emerging trends in invasive and noninvasive isolates of

Streptococcus agalactiae in a Latin American hospital: a 17-year study. *BMC infectious diseases*, 14(1), 428.

Phares, C. R., Lynfield, R., Farley, M. M., Mohle-Boetani, J., Harrison, L. H., Petit, S., ... & Stefonek, K. R. (2008). Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *Jama*, 299(17), 2056-2065.

Poisson, D. M., Chandemerle, M., Guinard, J., Evrard, M. L., Naydenova, D., & Mesnard, L. (2010). Evaluation of CHROMagar™ StrepB: A new chromogenic agar medium for aerobic detection of Group B Streptococci in perinatal samples. *Journal of microbiological methods*, 82(3), 238-242.

Randis, T. M., Gelber, S. E., Hooven, T. A., Abellar, R. G., Akabas, L. H., Lewis, E. L., ... & Ratner, A. J. (2014). Group B Streptococcus β -hemolysin/cytolysin breaches maternal-fetal barriers to cause preterm birth and intrauterine fetal demise in vivo. *The Journal of infectious diseases*, 210(2), 265-273.

Reyna-Figueroa, J., Ortiz-Ibarra, F. J., Beltrán-Zúñiga, M., Villeda-Gabriel, G., & Limón-Rojas, A. E. (2005). Riesgo de infección neonatal temprana en recién nacidos hijos de mujeres embarazadas colonizadas con *Streptococcus agalactiae* serotipo III. *Revista de enfermedades infecciosas en pediatría*, 18(73), 13-17.

Reyna-Figueroa, J., Ortiz-Ibarra, F. J., Pérez-Antonio, B., Navarro-Godínez, S., Casanova-Román, G., & García-Carrillo, L. E. (2008). Quimioprofilaxis para evitar la colonización materna por estreptococo grupo B: consecuencias de no adoptar la recomendación internacional. *salud pública de méxico*, 50, 155-161.

Ryley, J. F., & McGregor, S. (1986). Quantification of vaginal *Candida albicans* infections in rodents. *Journal of medical and veterinary mycology*, 24(6), 455-460.

Rivera, A., Siracusa, M. C., Yap, G. S., & Gause, W. C. (2016). Innate cell communication kick-starts pathogen-specific immunity. *Nature immunology*, 17(4), 356.

Rodriguez-Granger, J., Alvargonzalez, J. C., Berardi, A., Berner, R., Kunze, M., Hufnagel, M., ... & Telford, J. (2012). Prevention of group B streptococcal neonatal

disease revisited. The DEVANI European project. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 31(9), 2097-2104.

Romero, R., Dey, S. K., & Fisher, S. J. (2014). Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science*, 345(6198), 760-765.

Rosa-Fraile, M., & Spellerberg, B. (2017). Reliable detection of group B Streptococcus in the clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology*, 55(9), 2590-2598.

Rosati, E., Fettucciari, K., Scaringi, L., Cornacchione, P., Sabatini, R., Mezzasoma, L., ... & Marconi, P. (1998). Cytokine response to group B streptococcus infection in mice. *Scandinavian journal of immunology*, 47(4), 314-323.

Russell, N. J., Seale, A. C., O'Driscoll, M., O'Sullivan, C., Bianchi-Jassir, F., Gonzalez-Guarin, J., ... & Gravett, M. G. (2017). Maternal colonization with group B Streptococcus and serotype distribution worldwide: systematic review and meta-analyses. *Clinical infectious diseases*, 65(suppl_2), S100-S111.

Schrag, S. J., Zywicki, S., Farley, M. M., Reingold, A. L., Harrison, L. H., Lefkowitz, L. B., ... & Schuchat, A. (2000). Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *New England Journal of Medicine*, 342(1), 15-20.

Schuchat, A., Whitney, C. G., & Zangwill, K. (1996). Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective.

Sendi, P., Johansson, L., & Norrby-Teglund, A. (2008). Invasive group B streptococcal disease in non-pregnant adults. *Infection*, 36(2), 100-111.

Sheen, T. R., Jimenez, A., Wang, N. Y., Banerjee, A., van Sorge, N. M., & Doran, K. S. (2011). Serine-rich repeat proteins and pili promote *Streptococcus agalactiae* colonization of the vaginal tract. *Journal of bacteriology*, 193(24), 6834-6842.

Skuce, R. A., & Neill, S. D. (2001). Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*: exploiting molecular data. *Tuberculosis*, 81(1-2), 169-175.

Snapper, C. M. (2012). Mechanisms underlying in vivo polysaccharide-specific immunoglobulin responses to intact extracellular bacteria. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1253(1), 92-101.

Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica. Opinión de expertos sobre Infecciones Congénitas y Perinatales (ICP) SLIPE-2014. [Online]. Disponible en: <http://www.slipe.org/informesAcademicos.asp>

Slotved, H. C., Kong, F., Lambertsen, L., Sauer, S., & Gilbert, G. L. (2007). Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. *Journal of clinical microbiology*, 45(9), 2929-2936.

Sonnenberg, G. F., & Artis, D. (2015). Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nature medicine*, 21(7), 698.

Sørensen, U. B. S., Klaas, I. C., Boes, J., & Farre, M. (2019). The distribution of clones of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci) among herdspersons and dairy cows demonstrates lack of host specificity for some lineages. *Veterinary Microbiology*.

Spellerberg B y Brandt C. 2015. *Streptococcus*. In *Manual of Clinical Microbiology*, Eleventh Edition. American Society of Microbiology. USA, pp. 383-402.

Suhaimi, M. E., Desa, M. N., Eskandarian, N., Pillay, S. G., Ismail, Z., Neela, V. K., ... & Nordin, S. A. (2017). Characterization of a Group B *Streptococcus* infection based on the demographics, serotypes, antimicrobial susceptibility and genotypes of selected isolates from sterile and non-sterile isolation sites in three major hospitals in Malaysia. *Journal of infection and public health*, 10(1), 14-21.

Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(10), a016295.

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. *Emerging infectious diseases*, 21(4), 585.

Teatero, S., Ferrieri, P., Martin, I., Demczuk, W., McGeer, A., & Fittipaldi, N. (2017). Serotype distribution, population structure, and antimicrobial resistance of group B

Streptococcus strains recovered from colonized pregnant women. *Journal of clinical microbiology*, 55(2), 412-422.

Teti, G. I. U. S. E. P. P. E., Mancuso, G. I. U. S. E. P. P. E., & Tomasello, F. R. A. N. C. E. S. C. O. (1993). Cytokine appearance and effects of anti-tumor necrosis factor alpha antibodies in a neonatal rat model of group B streptococcal infection. *Infection and immunity*, 61(1), 227-235.

Toyofuku, M., Morozumi, M., Hida, M., Satoh, Y., Sakata, H., Shiro, H., ... & Iwata, S. (2017). Effects of intrapartum antibiotic prophylaxis on neonatal acquisition of group B streptococci. *The Journal of pediatrics*, 190, 169-173.

University of Delaware. 2010. Cardiac Puncture Blood Collection (Terminal Procedure) SOP #PRO-002. [Online] Disponible en: <https://www1.udel.edu/research/pdf/Cardiac-Puncture-Blood-Collection-Terminal.pdf>

University of Iowa. 2017. IACUC Guidelines: Anesthesia. [Online] Disponible en: <https://animal.research.uiowa.edu/iacuc-guidelines-anesthesia>

Uchiyama, J., Rashel, M., Maeda, Y., Takemura, I., Sugihara, S., Akechi, K., ... & Matsuzaki, S. (2008). Isolation and characterization of a novel Enterococcus faecalis bacteriophage ϕ EF24C as a therapeutic candidate. *FEMS Microbiology letters*, 278(2), 200-206.

Uchiyama, J., Matsui, H., Murakami, H., Kato, S. I., Watanabe, N., Nasukawa, T., ... & Hanaki, H. (2018). Potential Application of Bacteriophages in Enrichment Culture for Improved Prenatal Streptococcus agalactiae Screening. *Viruses*, 10(10), 552.

Versalovic J, Carrol KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML y Warnock DW. 2011. Manual of clinical microbiology, vol 1, 10th edition. American Society of Microbiology. USA, pp. 228-271.

Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispen, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology*, 5, 520.

Villaseñor, A. S., Morales, P. V., Palacios, G. S., & Solórzano, F. S. (2004). Prevalence of *Streptococcus agalactiae* serotype III in pregnant women. *Ginecología y obstetricia de Mexico*, 72, 103-108.

Vonck, R. A., Darville, T., O'Connell, C. M., & Jerse, A. E. (2011). Chlamydial infection increases gonococcal colonization in a novel murine coinfection model. *Infection and immunity*, 79(4), 1566-1577.

Vornhagen, J., Quach, P., Boldenow, E., Merillat, S., Whidbey, C., Ngo, L. Y., ... & Rajagopal, L. (2016). Bacterial hyaluronidase promotes ascending GBS infection and preterm birth. *MBio*, 7(3), e00781-16.

Vornhagen, J., Waldorf, K. M. A., & Rajagopal, L. (2017). Perinatal group B streptococcal infections: virulence factors, immunity, and prevention strategies. *Trends in microbiology*, 25(11), 919-931.

Vornhagen, J., Armistead, B., Santana-Ufret, V., Gendrin, C., Merillat, S., Coleman, M., ... & Ngo, L. Y. (2018). Group B streptococcus exploits vaginal epithelial exfoliation for ascending infection. *The Journal of clinical investigation*, 128(5).

Wang, Z., Guo, C., Xu, Y., Liu, G., Lu, C., & Liu, Y. (2014). Two novel functions of hyaluronidase from *Streptococcus agalactiae* are enhanced intracellular survival and inhibition of proinflammatory cytokine expression. *Infection and immunity*, 82(6), 2615-2625.

Wilson, B. A., & Vaudry, W. L. (1990). Very late onset of group B streptococcal disease in infants infected with the human immunodeficiency virus. *The Pediatric infectious disease journal*, 9(12).

Wheeler, E. K., Hara, C. A., Frank, J., Deotte, J., Hall, S. B., Benett, W., ... & Beer, N. R. (2011). Under-three minute PCR: probing the limits of fast amplification. *Analyst*, 136(18), 3707-3712.

Zárate, G., & Nader-Macias, M. E. (2006). Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 174-180.

de Zoysa, A., Edwards, K., Gharbia, S., Underwood, A., Charlett, A., & Efstratiou, A. (2012). Non-culture detection of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B *Streptococcus*) in clinical samples by real-time PCR. *Journal of medical microbiology*, *61*(8), 1086-1090.

12.RESUMEN BIOGRÁFICO

Biól. José Roberto Estupiñan Jiménez

Candidato para el grado de

Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN UN MODELO MURINO DE INFECCIÓN POR DISTINTOS SEROTIPOS DE *Streptococcus agalactiae*.

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacido en Guadalajara, Jalisco el 18 de Diciembre de 1991, hijo de Roberto Estupiñan Montes y María Teresa Jiménez Castellanos.

Educación: Egresado del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, grado obtenido de Biólogo en 2015.

Experiencia profesional:

Químico analista en pruebas de esterilidad y control microbiológico en Pisa Farmacéutica.

Profesor de bachillerato en la escuela Hence Forth en Guadalajara, Jalisco.

Auxiliar de laboratorio en el Centro de Investigación en Inmunología y Dermatología de la Universidad de Guadalajara en el Instituto Dermatológico de Jalisco “Dr. José Barba Rubio”

Estancia de investigación en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

13. RECONOCIMIENTOS

Presentación en Cartel: “Evaluación de la expresión diferencial de citocinas proinflamatorias en un modelo murino de infección por distintos serotipos de *Streptococcus agalactiae*” 3er Congreso Internacional FESAHANCCCAL realizado en Antigua, Guatemala del 4 al 6 de Septiembre de 2019.



Presentación en Cartel: “Recuperación bacteriana de *Streptococcus agalactiae* a partir de hisopados vaginales en un modelo murino de infección” 3er Congreso Internacional FESAHANCCCAL realizado en Antigua, Guatemala del 4 al 6 de Septiembre de 2019.

LA FEDERACION DE SOCIEDADES Y ASOCIACIONES HISPANAS DE AMERICA DEL NORTE, CENTRO AMERICA Y EL CARIBE, DE LA CIENCIA DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO A.C.
Y LA
ASOCIACION GUATEMALTECA PARA LAS CIENCIAS DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO.

 OTORGAN LA PRESENTE 

CONSTANCIA
A

MC. José Luis Zacarias

Dra. Lydia Rivera, José Roberto Estupiñan, Juan Manuel González, Dr. Gerardo Palacios, Dr. José Manuel Vázquez, Dra. Cristina Rodríguez,
POR SU PARTICIPACION EN LA SESION DE CARTELES DEL
3ER CONGRESO INTERNACIONAL FESAHANCCCAL
REALIZADO EN ANTIGUA, GUATEMALA DEL 4 AL 6 DE SEPTIEMBRE DE
2019

CON EL CARTEL:

**“RECUPERACIÓN BACTERIANA DE
Streptococcus agalactiae A PARTIR DE
HISOPADOS VAGINALES EN UN MODELO MURINO DE
INFECCIÓN”**

DC. DORIS J. GARCIA MENDEZ
PRESIDENTA DE LA ACAL

DC. RODRIGO VARGAS ROSALES
PRESIDENTE COMITE ORGANIZADOR
3ER CONGRESO FESAHANCCCAL

DC. MARITZA RAMIREZ RAMIREZ
PRESIDENTA DE LA FESAHANCCCAL
ADMINISTRACIÓN 2018-2019

Presentación en Cartel: “Comparación entre Strep B carrot broth™ one-step y CHROMAGAR™ Strep B para detección de *Streptococcus agalactiae* en un modelo murino de inoculación vaginal” 3er Congreso Internacional FESAHANCCCAL realizado en Antigua, Guatemala del 4 al 6 de Septiembre de 2019.



Presentación oral: “Evaluación de la recuperación bacteriana de distintos serotipos de *S. agalactiae* a partir de hisopados vaginales en un modelo murino”. 30° Congreso Nacional de Investigación e Innovación en Medicina, realizado del 2 al 5 de Octubre de 2019 en Monterrey, Nuevo León.

 **UANL**
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Facultad de Medicina, UANL

La Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León
a través de la Subdirección de Investigación otorga
la presente

CONSTANCIA

a:
José R. Estupifán Jiménez, Lydia G. Rivera Morales, Gerardo C. Palacios Saucedo, José M. Vázquez Guillén,
Juan M. González Hinojosa, José L. Zacarías Hernández, Melissa C. Mellado García, Cristina Rodríguez Padilla.

por la presentación **ORAL** del trabajo titulado:
**EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN BACTERIANA DE DISTINTOS SEROTIPOS DE S. AGALACTIAE A PARTIR DE
HISOPADOS VAGINALES EN UN MODELO MURINO**

 30° CONGRESO NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN
EN MEDICINA
"Knowledge and innovation
Transforming Medicine"
Llevado a cabo del 2 al 5 de Octubre de 2019
en Monterrey, N.L. México
"Alere Flammam Veritatis"


Dr. med. José Gerardo González
Subdirector de Investigación


Dr. med. Egoimio Pérez Rodríguez
Director


Dr. Hugo Enrique Solís Lara
Secretario de Fomento a la Investigación

Presentación oral: “Comparación entre StrepB Carrot Broth One step y CHROMagar para detección de *Streptococcus agalactiae* en un modelo murino de inoculación vaginal”. VII Encuentro de Jóvenes Investigadores realizado en el Estado de Nuevo León.



La Universidad Autónoma de Nuevo León
a través de la Secretaría de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico
otorga el presente Reconocimiento a:

Juan Manuel González Hinojosa

Por la presentación de su trabajo titulado:
Comparación entre StrepB Carrot Broth One-step y CHROMagar StrepB para detección de *Streptococcus agalactiae* en un modelo murino de inoculación vaginal.

Área: **Medicina y Ciencias de la Salud** Asesor: **Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales**

Coadyutores: **Dra. Lydia Rivera Morales, Biol. José Roberto Estupiñán Jiménez, MC. José Luis Zacarías Hernández, Dr. José Manuel Vázquez Guillén, Dra. Cristina Rodríguez Padilla**

Que participó en el VII Encuentro de Jóvenes Investigadores en el Estado de Nuevo León, auspiciado por la UANL, CHRISTUS Excellence and Innovation Center, IH3, Skye Group y Medtronic.


ALERE FLAMMAM VERITATIS
DR. JUAN MANUEL ALCOCER GONZÁLEZ
Secretario de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico


DRA. PATRICIA DEL CARMEN ZAMBRANO ROBLEDO
Directora de Investigación



VII Encuentro de Jóvenes Investigadores en el Estado de Nuevo León

La Universidad Autónoma de Nuevo León
a través de la Secretaría de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico

otorga el presente Reconocimiento a:

Antonio Costilla Ramirez

Por la presentación de su trabajo titulado:

Recuperación bacteriana de *Streptococcus agalactiae* a partir de hisopados vaginales en un modelo murino de infección

Área:
Medicina y Ciencias de la Salud

Asesor:
Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales

Coautores:

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales, M.C. José Luis Zacarías Hernández, M.C. José Roberto Estupiñán Jiménez,
Dr. Gerardo Palacios Saucedo, Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Que participó en el VII Encuentro de Jóvenes Investigadores en el Estado de Nuevo León, auspiciado por la UANL, CHRISTUS Excellence and Innovation Center, IH3, Skye Group y Medtronic.


DR. JUAN MANUEL ALCOCER GONZÁLEZ
Secretario de Investigación Científica
y Desarrollo Tecnológico

ALERE FLAMMAM VERITATIS


DRA. PATRICIA DEL CARMEN ZAMBRANO
ROBLEDO
Directora de Investigación



14. CARTA DE APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN Y BIENESTAR ANIMAL



COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN Y BIENESTAR ANIMAL



RC-07-189
Rev. 0-05-04

No. Registro
CEIBA-2018-027

Comité de Ética de
Investigación y Bienestar
Animal

Dr. Moisés Armides
Franco Molina
Presidente

Dr. Diana Caballero
Hernández
Secretario

Vocales

M.C. MVZ. Daniel Julio
Eguarte Lara

Dr. Gabino Adrián
Rodríguez Almaraz

Dr. Roberto Mercado
Hernández

Miembros Externos

Dr. José González Salinas

Lic. Cinthya Galván Pinelo
(Campaña de adopción y
socorro animal A.C.)

Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal de la Facultad de
Ciencias Biológicas, (CEIBA) de la UANL

Para: Dra. Lydía Guadalupe Rivera Morales

Fecha de aprobación: 14 de junio de 2019

Título: Evaluación de la expresión diferencial de citocinas
proinflamatorias en un modelo murino de infección por distintos
serotipos de *Streptococcus agalatae*

El presente es referencia para el protocolo de investigación mencionado en la
parte superior.

En la deliberación de este comité, los procedimientos de dicha aplicación
conformada por las reglas y el reglamento interno con los temas de uso
animal. La aprobación se otorga durante un año.

Sin más por el momento, le reitero la seguridad de mi más atenta y
distinguida consideración.

San Nicolás de los Garza, Nuevo León, a 15 de junio de 2019

Dr. Moisés Armides Franco Molina
Presidente

Dra. Diana Caballero Hernández
Secretaria

Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal de la Facultad de
Ciencias Biológicas (CEIBA)

Ave. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán S/N Cd. Universitario, C.P. 66450, A.P. 46 "F"

San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. Tels y Fax: (81)83 23 41 15 83 52 42 12

cmrodrig@ccr.ci.uanl.mx