



Universidad Nacional
Federico Villarreal

Vicerrectorado de
INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE TECNOLOGÍA MÉDICA

DETERMINACIÓN DE GENES *ermB*, *ermTR*, *mefA* DE RESISTENCIA A MACRÓLIDOS Y LINCOSAMIDAS EN *Streptococcus agalactiae* DE AISLADOS CLÍNICOS DE UN HOSPITAL MATERNO-INFANTIL DE LIMA, PERÚ

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN MICROBIOLOGÍA

AUTORA

Pulido Colina, Angie

ASESOR

Rojas León, Roberto Eugenio

JURADOS

Garay Bambaren, Juana Amparo

Guerrero Barrantes, César Enrique

Rojas Hernández, Bertha Aide

Lima Perú

2020

Dedicatoria

A mis padres Rubén y Doris por su enorme amor y apoyo en todo lo que me propuse, y por enseñarme los valores de la responsabilidad, respeto y gratitud.

A mi esposo Edgar por sus enseñanzas, su paciencia y sobre todo por la motivación constante para cumplir mis objetivos.

Agradecimientos

A Dios por la vida y por iluminar mi camino con la luz del conocimiento; y por todas las oportunidades que me brinda en la vida.

A mis padres y hermanos por su inmenso amor y fuente de inspiración para ser una mejor persona, hija y hermana cada día. Especialmente a mis padres quienes me apoyaron enormemente cuando estuve asistiendo los sábados y domingos a clases, dejando muchas veces de estar juntos, siempre muy pendientes de mí.

A mi esposo por su amor, paciencia y comprensión. Porque durante esta cuarentena día tras día no me dejó distraerme hasta no culminar con este pendiente que tenía y por motivarme a seguir investigando con pasión y dedicación. Un gran apoyo en mi desarrollo personal y profesional.

Al Lic. Javier Soto Pastrana mi especial reconocimiento por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, apoyando el desarrollo de mi tesis. Y por permitirme ingresar al laboratorio de microbiología del Hospital San Bartolomé y realizar parte de esta investigación.

Al Mg. Roberto Rojas León por ser mi maestro y asesor, por sus enseñanzas y apoyo en el desarrollo de mi tesis.

A los miembros del Jurado evaluador, por su tiempo y dedicación profesional a pesar de encontrarnos en tiempos difíciles por la pandemia.

A la profesora Esther Valencia Bazalar por permitirme trabajar en el Laboratorio de Bacteriología del Instituto de Medicina Tropical - UNMSM, por su apoyo para desarrollar una parte de mi tesis, sus sabias enseñanzas y consejos.

A Milagros Zavaleta por permitirme trabajar en el Laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética del Instituto de Medicina Tropical - UNMSM y por haberme

permitido ingresar a los laboratorios para la realización de la parte experimental de la tesis.

Laura por sus enseñanzas de bioinformática, a Rocío y Katy por su paciencia en enseñarme las técnicas de biología molecular, por la confianza depositada en mí desde el inicio.

A mis jefes y compañeros de la CCPJ que me brindaron las facilidades para poder estudiar los días sábado y cambiar mis horarios de trabajo.

A la Facultad de Tecnología Médica UNFV por permitirme alcanza este logro en mi carrera profesional, a los profesores de la Especialidad por su generosidad en compartir sus conocimientos.

Al Dr. Alfredo Guillén Ooneglio, mi maestro de pregrado y posgrado, quien fue la primera persona de quien aprendí a amar la microbiología. QEPD.

Ahora por fin puedo decir "lo logré", y a pesar que este año ha sido complicado, me permitió sustentarla de manera virtual.

A la Dra. Margarita Laczeski por responder a mis correos a pesar de no conocerme y brindarme su apoyo con el protocolo de trabajo y los "primers" de los genes de resistencia.

Finalmente, gracias a todos los que son parte de la culminación de este trabajo los que mencione y los que no.

ÍNDICE

ÍNDICE	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
I. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Descripción y formulación del problema	12
1.2. Antecedentes	14
1.3. Objetivos	18
- Objetivo general	18
- Objetivos específicos	18
1.4. Justificación.....	18
II. MARCO TEÓRICO	20
2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación.....	20
III. MÉTODO.....	44
3.1. Tipo de investigación	44
3.2. Ámbito temporal y espacial.....	44
3.3. Variables	44
3.4. Población y muestra	44

3.5. Instrumentos	45
3.6. Procedimientos	45
3.7. Análisis de datos	50
3.8. Consideraciones éticas	50
IV. RESULTADOS.....	51
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	56
VI. CONCLUSIONES	60
VII. RECOMENDACIONES	61
VIII. REFERENCIAS	62
IX. ANEXOS	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de estreptococos de importancia médica	13
Tabla 2. Factores de virulencia del EGB y su papel en la transición de colonización a enfermedad invasiva	21
Tabla 3. Fenotipos de resistencia a antibióticos macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (MLS) que se pueden detectar en <i>Streptococcus</i> y posibles mecanismos asociados .34	
Tabla 4. Interpretación de los fenotipos D-test según CLSI.	39
Tabla 5. Secuencia de cebadores utilizados para amplificar los genes de resistencia	40
Tabla 6. Mezcla de reacción para la PCR	41
Tabla 7. Detalle del ciclado de la PCR para la amplificación de los genes de resistencia	41
Tabla 8. Fenotipos y genotipos de los aislamientos de EGB.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Patrones hemolíticos de los <i>Streptococcus</i> spp.....	14
<i>Figura 2.</i> Estructura del EGB.	18
<i>Figura 3.</i> Principales adhesinas que median la interacción de EGB con células huésped.	21
<i>Figura 4.</i> Sitio de acción de los macrólidos en el la subunidad 50S del ribosoma bacteriano	31
<i>Figura 5.</i> Interpretación D-test según CLSI.	38
<i>Figura 6.</i> Prueba de CAMP.	43
<i>Figura 7.</i> Perfil de susceptibilidad a los antibióticos en los aislamientos de EGB.....	44
<i>Figura 8.</i> Fenotipo D-test en <i>Streptococcus agalactiae</i>	45
<i>Figura 9.</i> Gel de agarosa 1,5% de la corrida electroforética de la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del gen <i>ermB</i> (639pb) en los aislados de EGB.....	45
<i>Figura 10.</i> Gel de agarosa 1,5% de la corrida electroforética de la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del gen <i>ermTR</i> (385pb) en los aislados de EGB.....	46
<i>Figura 11.</i> Gel de agarosa 1,5% de la corrida electroforética de la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del gen <i>mefA</i> (345pb) en los aislados de EGB.	46

RESUMEN

Objetivo: Determinar la presencia de los genes *ermB*, *ermTR* y *mefA* de resistencia a macrólidos y lincosamidas en *Streptococcus agalactiae* (EGB) de aislados clínicos de un Hospital Materno-Infantil de Lima, Perú.

Materiales y métodos: Se realizó un estudio observacional, descriptivo y de corte transversal en el Hospital Nacional Docente Madre Niño “San Bartolomé” entre noviembre de 2018 y abril de 2019. Se analizaron 19 aislados clínicos de EGB. La identificación y susceptibilidad antimicrobiana se realizó en el sistema automatizado Vitek 2 Compact (BioMérieux), los fenotipos de resistencia se evaluaron con el D-test según recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute*; y los genes de resistencia *ermB*, *ermTR* y *mefA* se determinaron por reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos.

Resultados: de los 19 aislados, el 100% de estos fueron susceptibles a penicilina, ampicilina y vancomicina, mientras que 3/19 (15,8%) presentaron resistencia a levofloxacino y 8/19 (42,1%) fueron resistentes a eritromicina y clindamicina. El D-test evidenció el fenotipo cMLSb en 7/19 (36,8%) y el fenotipo iMLSb en 1/19 (5,3%), no se observó la presencia del fenotipo M. El genotipo mostró que 6/19 (31,6%) eran positivos al gen *ermB*, 3/19 (15,8%) positivos al gen *ermTR* y 1/19 (5,3%) positivo al gen *mefA*. Además, dos aislados fueron positivos para dos genes (*ermB* + *ermTR* y *ermTR* + *mefA*).

Conclusiones: Se observaron altos niveles de resistencia a eritromicina y clindamicina, siendo el fenotipo de resistencia a macrólidos y lincosamidas más frecuente el cMLSb, mientras que el gen mayormente detectado fue el *ermB*.

Palabras clave: *Streptococcus agalactiae*, Farmacorresistencia, Macrólidos, Lincosamidas, PCR.

ABSTRACT

Objective: To determine the presence of the *ermB*, *ermTR* and *mefA* genes for resistance to macrolides and lincosamides in *Streptococcus agalactiae* (GBS) of clinical isolates from a Maternal and Child Hospital in Lima, Perú.

Materials and methods: an observational, descriptive and cross-sectional study was conducted in the Mother Child National Hospital “San Bartolomé” between November 2018 and April 2019. Nineteen (19) clinical isolates of EGB were analyzed. Identification and antimicrobial susceptibility was performed in the Vitek 2 Compact automated system (BioMérieux), resistance phenotypes were determined with D-test according to the Institute of Clinical and Laboratory Standards guidelines and resistance genes *ermB*, *ermTR* and *mefA* were determined by polymerase chain reaction using specific primers.

Results: Of the 19 isolates, 100% of these were susceptible to penicillin, ampicillin and vancomycin, while 3/19 (15.8%) had resistance to levofloxacin and 8/19 (42.1%) were resistant to erythromycin and clindamycin. The D-test showed the cMLSb phenotype in 7/19 (36.8%) and the iMLSb phenotype in 1/19 (5.3%), the presence of the M phenotype was not observed. The genotype showed that 6/19 (31.6%) were positive for the *ermB* gene, 3/19 (15.8%) positive for the *ermTR* gene and 1/19 (5.3%) positive for the *mefA* gene. In addition, two isolates were positive for two genes (*ermB* + *ermTR* and *ermTR* + *mefA*).

Conclusions: High levels of resistance to erythromycin and clindamycin were observed, with the most frequent macrolide and lincosamide resistance phenotype being cMLSb, while the most detected gene was *ermB*.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, Drug resistance, Macrolides, Lincosamides, PCR.

I. INTRODUCCIÓN

Streptococcus agalactiae o Estreptococo del grupo B (EGB) es un coco gram positivo, catalasa y oxidasa negativo, anaerobio facultativo, que se presenta formando cadenas de longitud variable, puede crecer en medios simples, aunque los medios suplementados con sangre favorecen su crecimiento e identificación (Murray et al., 2014).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año se producen un millón de muertes neonatales a causa de una infección neonatal, y se cree que un número igual de muertes fetales son causadas por infecciones. EGB es la principal causa de infecciones neonatales y un importante contribuyente de muertes fetales (Cools y Melin, 2017).

Según diversos estudios en Europa y algunos países de Latinoamérica, EGB ha incrementado su incidencia a partir de la década del 70, esta bacteria surge como una de las causas fundamentales de morbi-mortalidad neonatal y aún hoy permanece como una de las principales causas de meningitis y sepsis en recién nacidos (RN) pese a los esfuerzos en la prevención de enfermedad perinatal (Bergh, Stoelhaug, Loeseth y Bevanger, 2004).

El EGB forma parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal, a partir de donde coloniza el tracto genital, adquiriendo relevancia en gestantes a término (Laczeski, Pegels, Oviedo, Quiroga y Vergara, 2013). La colonización de los RN se produce durante el parto, a partir del tracto genital materno colonizado o intraútero tras la rotura de membranas o, menos frecuente, por vía ascendente, aún con las membranas íntegras, siendo la tasa de transmisión vertical del 50%, causando meningitis, neumonía y sepsis entre los principales cuadros.

EGB es también una causa importante de morbilidad infecciosa en gestantes y puérperas; y además, recientemente se ha reconocido como un patógeno oportunista provocando enfermedad invasiva en adultos no gestantes, con enfermedades crónicas predisponentes.

Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos para EGB demuestran que permanece sensible a los betalactámicos; por ello, penicilina (PE) se mantiene como el antimicrobiano de elección y además por su buen pasaje trasplacentario. No obstante, la alergia a este antibiótico es una problemática que se soluciona con el uso de otros antibióticos como, lincosamidas o macrólidos, por lo que la resistencia a estos grupos de antimicrobianos es considerada como un grave problema de salud pública y que en los últimos años ha sido informado su incremento (Heelan, Hasenbein y McAdam, 2004).

La ausencia de información en nuestro medio sobre la frecuencia de los genes de resistencia a macrólidos y lincosamidas y los fenotipos existentes, hace necesaria la investigación que permita conocer la epidemiología molecular actual de estos mecanismos de resistencia presentes en estos patógenos.

1.1. Descripción y formulación del problema

EGB permanece aún como una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad en períodos neonatal y perinatal. La colonización del tracto genital de la embarazada a término de su edad gestacional, está significativamente asociada a estas infecciones. Los RN adquieren EGB en el útero por vía ascendente a través de la ruptura de membranas intactas o durante el proceso del parto.

EGB es un microorganismo parte de la microbiota habitual de los tractos genitourinario y gastrointestinal humanos. Es también reconocido como un importante patógeno en pacientes inmunocomprometidos e inmunocompetentes, siendo responsable de infecciones de piel y tejidos blandos, de endocarditis e infecciones osteoarticulares (Laczeski, Novosak, Quiroga y Vergara, 2014a).

Si bien la patogenia de esta bacteria se ha asociado mayormente a casos en mujeres embarazadas

y neonatos, las infecciones en adultos con enfermedades de base han aumentado en los últimos años, sobre todo los casos invasivos, al igual que en adultos no gestantes sin enfermedades de base, siendo frecuentes infecciones de tracto urinario (ITU), con bacteriurias asintomáticas, cistitis, pielonefritis, uretritis, entre otros (Ulett et al., 2010; Huber, McOdimba, Pflueger, Daubenberger y Revathi, 2011; Pinto et al., 2013).

Así mismo, se ha descrito que EGB presenta una sensibilidad del 100% frente a PE, siendo este el más utilizado como tratamiento profiláctico en mujeres embarazadas y en infecciones causadas por EGB en adultos no gestantes (Díaz, Claver y Pérez, 2008). No obstante, se calcula que un 10-12% de las embarazadas refieren alergia a PE, lo cual es un problema que se soluciona con el uso de lincosamidas o macrólidos. Sin embargo, se ha evidenciado un aumento significativo de la resistencia a estos antibióticos (Leszczyński, Sokół-Leszczynska, Pietrzak, Sawicka-Grzelak y Wielgoś, 2017).

Formulación del problema

Problema general

¿Cómo determinar la presencia de los genes *ermB*, *ermTR* y *mefA* de resistencia a macrólidos y lincosamidas en *Streptococcus agalactiae* de aislados clínicos de un Hospital Materno-Infantil de Lima, Perú?

Problemas específicos

- ¿Cuál es la frecuencia del gen *ermB* de resistencia a macrólidos y lincosamidas en EGB de aislados clínicos de un Hospital Materno-Infantil de Lima, Perú?
- ¿Cuál es la frecuencia del gen *ermTR* de resistencia a macrólidos y lincosamidas en EGB de aislados clínicos de un Hospital Materno-Infantil de Lima, Perú?

- ¿Cuál es la frecuencia del gen *mefA* de resistencia a macrólidos en EGB de aislados clínicos de un Hospital Materno-Infantil de Lima, Perú?
- ¿Cuál es el perfil de susceptibilidad antimicrobiana en EGB de aislados clínicos de un Hospital Materno-Infantil de Lima, Perú?

1.2. Antecedentes

En el Perú, Tamariz et al. (2004) en su trabajo “Colonización vaginal y anorectal por *Streptococcus agalactiae* en gestantes de los Hospitales Nacionales Cayetano Heredia y Arzobispo Loayza”, realizaron un estudio donde analizaron 238 gestantes obteniendo muestras de hisopado vaginal y anorectal. Aislaron EGB en 26 pacientes (10,9%), de las cuales 9 (36,4%) manifestaron haber presentado abortos previos. Los EGB presentaron 100% de sensibilidad a ampicilina (AMP) y 11,5% de resistencia a eritromicina (ERI). Concluyeron que existe la necesidad de realizar estudios sobre los niveles de colonización e infección en neonatos y gestantes por EGB por falta de información en el país.

Rubio M y Sánchez G (2016), en su investigación “Frecuencia de *Streptococcus agalactiae* en secreción vaginal y zona ano-rectal en gestantes atendidas en el Hospital Nacional Cayetano Heredia, en el periodo de enero a mayo del 2016”, analizaron muestras de hisopado vaginal y ano-rectal en 53 gestantes, obteniendo una positividad de 17% para EGB. Concluyeron que el porcentaje de colonización por EGB es considerable e indican un aumento en la tasa de crecimiento a través de los años, por lo que se exhorta a implementar en los centros de salud los protocolos de prevención para este microorganismo.

Nauto E (2019), en su estudio “*Streptococcus agalactiae* en gestantes de 35 a 37 semanas que acuden a control prenatal en el Instituto Nacional Materno Perinatal”, realizado entre

febrero y julio de 2017, analizó muestras de hisopado vaginal y ano-rectal a un total de 130 gestantes, aislando EGB en el 23,1% de las pacientes. Concluyó que la prevalencia de la colonización por EGB en su investigación es superior a la esperada en América Latina que oscila entre el 10% al 20% y se asocia a la edad materna, número de gestación y nivel de instrucción.

A nivel internacional, Oviedo, Pegels, Laczeski, Quiroga y Vergara (2013) en su estudio “Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. First study in a province of Argentina”, realizado en Misiones, Argentina, estudiaron hisopados vaginal-rectal de 3125 mujeres embarazadas entre 2004 y 2010, evidenciándose una colonización materna de 9,38%. La resistencia a ERI fue del 11,6% y el fenotipo constitutivo fue el predominante (69%). Concluyeron que la distribución del serotipo, los genes que codifican los supuestos factores de virulencia y los patrones de fenotipos de resistencia de EGB pueden variar en diferentes áreas, por tal motivo deben evaluarse en cada lugar para implementar estrategias de prevención.

Laczeski et al. (2013) realizaron la investigación “*Streptococcus agalactiae*, primer estudio en Misiones de genes de resistencia asociados a serotipos capsulares”, reportando una resistencia a ERI de 9,6% y a clindamicina (CLI) de 7,1% luego de estudiar 317 cepas de EGB recuperadas de 3281 gestantes entre los años 2004 y 2011. Seleccionaron 10 EGB (5 resistentes y 5 sensibles a eritromicina), mostrando que el gen más frecuentemente detectado fue el *ermB* (5/10) seguido de *mefA* (2/10). Además, en 3 aislados con fenotipo sensible se detectaron genes de resistencia. Concluyeron que la caracterización de la resistencia a macrólidos por D-test es crucial para evitar una profilaxis incorrecta. Además, conocer la asociación de serotipos, fenotipos y genes de resistencia a ERI y CLI, circulantes en la zona que son escasos, ayudan en el diseño de estrategias vacunales que se encuentran en marcha.

Dutra et al. (2014) realizaron el estudio “*Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility”, donde observaron que, de 434 aislados de EGB recuperados de individuos con infecciones o colonizados, de diferentes regiones geográficas de Brasil, todos fueron sensibles a betalactámicos. La resistencia a ERI y CLI fue de 4,1% y el 3%, respectivamente. Entre los aislados resistentes a macrólidos se detectaron los genes *ermA* (39%) y *ermB* (27,6%) y el fenotipo predominante fue el constitutivo (13/18). Concluyen que estos aislados circulantes en Brasil tienen una amplia diversidad fenotípica y genotípica y que los aislados resistentes a macrólidos pueden surgir tanto por la propagación clonal como por la adquisición de genes de resistencia.

Eskandarian et al. (2015) en su estudio “Antimicrobial susceptibility profiles, serotype distribution and virulence determinants among invasive, non-invasive and colonizing *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus) from Malaysian patients” donde, de 103 cepas de EGB, determinó genes de virulencia y la susceptibilidad antimicrobiana. Mostrando que el 100% fue sensible a betalactámicos. Las tasas de resistencia para ERI, CLI y tetraciclina fueron 23,3%, 17,5% y 71,8%, respectivamente. Concluyeron que la distribución de serotipos correlacionan con los genes de virulencia y sería útil en estudios epidemiológicos y diseño de vacunas.

Bolukaoto et al. (2015) en “Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women in Garankuwa, South África” evidencia que de 413 muestras, el 30,9% fueron positivas a EGB. Los resultados revelaron que el 100% de los aislados eran sensibles a PE, AMP y vancomicina (VA). La resistencia a ERI y CLI fue de 21,1 y 17,2%, respectivamente. El 69% de los aislados resistentes a ambos antibióticos presentaron el fenotipo constitutivo y el 55% portaba el gen *ermB*. Además se observó que el 38% de los aislamientos tenían genes tanto *ermB* como

linB, y la bomba de flujo mediada por los genes *mefA* también se distribuyó entre los aislados. Los investigadores concluyeron que el estudio reafirmó la idoneidad de PE como antibiótico de elección para el tratamiento de la infección por EGB. Sin embargo, identificó los desafíos de la resistencia a los macrólidos y lincosamidas utilizados como medicamentos alternativos para las personas alérgicas a PE. Es necesario investigar más opciones de tratamiento de EGB.

Liébana-Martos et al. (2015) en el estudio “Serotipos y patrones de resistencia antibiótica en aislados betahemolíticos de *Streptococcus agalactiae* de madres colonizadas y recién nacidos con enfermedad invasiva”, se estudiaron 188 aislados procedentes de gestantes portadoras vaginorectales de EGB y 24 de RN con enfermedad neonatal, de diferentes hospitales andaluces. Las tasas de resistencia para ERI y CLI procedentes de aislados de gestantes, fueron de 16,5% y 10,1% respectivamente y en la cepas neonatales se evidenció tasas de resistencia frente a ERI y CLI de 8,3% y 4,1% respectivamente. Siendo el fenotipo constitutivo el más frecuente en 61%. Los investigadores concluyeron que se debería realizar más estudios epidemiológicos que permitan continuar con una vigilancia de los serotipos causantes de enfermedad invasiva así como sus patrones de sensibilidad antibiótica utilizando métodos sensibles y específicos.

Jaramillo, Cobo, Moreno y Ceballos (2018), en el artículo de revisión “Resistencia antimicrobiana de *Streptococcus agalactiae* de origen humano y bovino” mencionan que a pesar que instituciones como el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) y el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) describen que EGB es sensible a betalactámicos, investigaciones recientes han reportado un incremento de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) para diferentes antimicrobianos, incluyendo PE. Y concluyen que la resistencia antimicrobiana en EGB es un problema que se ha incrementado en los últimos años, tanto en aislamientos de origen humano como de origen bovino, lo cual puede estar relacionado

con el uso inadecuado de los antimicrobianos y como respuesta adaptativa de EGB a los desafíos antimicrobianos.

1.3. Objetivos

- **Objetivo general**

Determinar la presencia de los genes *ermB*, *ermTR* y *mefA* de resistencia a macrólidos y lincosamidas en EGB de aislados clínicos de un Hospital Materno-Infantil de Lima, Perú.

- **Objetivos específicos**

- Determinar la frecuencia del gen *ermB* de resistencia a macrólidos y lincosamidas en EGB de aislados clínicos de un Hospital Materno-Infantil de Lima, Perú.
- Determinar la frecuencia del gen *ermTR* de resistencia a macrólidos y lincosamidas en EGB de aislados clínicos de un Hospital Materno-Infantil de Lima, Perú.
- Determinar la frecuencia del gen *mefA* de resistencia a macrólidos en EGB de aislados clínicos de un Hospital Materno-Infantil de Lima, Perú.
- Determinar el perfil de susceptibilidad antimicrobiana en EGB de aislados clínicos de un Hospital Materno-Infantil de Lima, Perú.

1.4. Justificación

Las infecciones debidas a EGB constituyen un problema de salud pública en el mundo, por su patogenia ha sido responsable de graves complicaciones de salud, tanto en neonatos, gestantes así como en pacientes inmunocomprometidos; incluso en pacientes adultos no gestantes sin enfermedades base.

En nuestro país pocos estudios han abordado este tema a pesar de su importancia en la salud pública, alguno de estos estudios son los realizados por: Tamariz et al. (2004) en el cual se reportan tasas de colonización de 10,9% y el estudio de perfil de susceptibilidad frente a EGB en gestantes muestran una resistencia de 11,5% a ERI, en el estudio de Pulido y Soto (2019) se ve el incremento de aislamientos de EGB en urocultivos desde el 2010 al 2018 de un 1,6% a 5,6%.

En la actualidad EGB presenta una sensibilidad del 100% a PE, pero en personas alérgicas a estos fármacos, se recomienda el uso de macrólidos y lincosamidas, por lo que la resistencia a estos grupos de antimicrobianos es considerada como un grave problema de salud pública.

La importancia de realizar esta investigación radica en aportar datos del perfil de susceptibilidad antimicrobiana en EGB de los aislados en estudio, tanto fenotípica como genóticamente, para lo cual se determinó la presencia de los genes *ermB*, *ermTR* y *mefA* asociados a la resistencia de macrólidos y lincosamidas, que permita conocer la epidemiología molecular actual de estos mecanismos de resistencia presentes en este patógeno.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación

Estreptococos

El género *Streptococcus* es un grupo de microorganismos gram positivos de forma esférica u ovoide de aproximadamente 1µm, inmóviles y que no forman esporas. Son bacterias homofermentativas que generan ácido láctico, sin formación de gas, como principal producto final del metabolismo de la glucosa, son anaerobios facultativos, y algunos pueden crecer en una atmósfera enriquecida con dióxido de carbono (crecimiento capnofílico). Sus exigencias nutricionales son complejas, y su aislamiento requiere el uso de medios enriquecidos con sangre; son catalasa negativo, a diferencia de las especies del género *Staphylococcus* (Murray et al., 2014).

La diferencia de especies de este género es complicada, debido a que se utilizan los tres sistemas diferentes:

1. Especificidad serológica de la sustancia específica de grupo de la pared celular y otros antígenos de la pared celular o capsulares: Rebecca Lancefield, en 1930, estableció el sistema de agrupación de Lancefield para los estreptococos beta-hemolíticos. Los antígenos detectados por el sistema de agrupación de Lancefield son polisacáridos contenidos en la pared celular de muchos estreptococos y constituye la base del agrupamiento serológico en los grupos de Lancefield A a H y K a U. La especificidad serológica del hidrato de carbono específico de grupo está determinada por un aminoglúcido. En caso de estreptococos del grupo A, esta es la ramnosa-N-acetilglucosamina; en el caso del grupo B, es un polisacárido de ramnosa-glucosamina; para el grupo C, es la ramnosa-N-acetilgalactosamina; para el grupo D, es el ácido teicoico de glicerol que contiene D-alanina y glucosa; y para el grupo F, es una glucopiranosil-N-acetilgalactosamina (Brooks, Carrol, Butel, Morse y Mietzner, 2011).

Por lo regular se realiza la tipificación sólo para los grupos A, B, C, F y G, que causan enfermedad en el ser humano como podemos observar en la tabla 1.

Y la especificidad antigénica de los *polisacáridos capsulares*, se utilizan para clasificar *S. pneumoniae* en más de 90 tipos y para tipificar los EGB (Brooks et al., 2011).

Tabla 1.
Características de estreptococos de importancia médica.

Nombre	Sustancia específica de grupo ^a	Hemólisis ^b	Hábitat	Criterios de laboratorio importantes	Enfermedades frecuentes e importantes
<i>Streptococcus pyogenes</i>	A	β	Faringe, piel	Colonias grandes (>0.5 mm), positividad en la prueba con PYR, ^c inhibido por bacitracina	Faringitis, impétigo, fiebre reumática, glomerulonefritis, choque tóxico
<i>Streptococcus agalactiae</i>	B	β	Aparato genital femenino, tubo digestivo bajo	Hidrólisis de hipurato, CAMP ^d positivo	Sepsis neonatal y meningitis, bacteriemia en adultos
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subespecies <i>equisimilis</i> ; otros	C, G	β (infecciones humanas), α, ninguno	Faringe	Colonias grandes (>0.5 mm)	Faringitis, infecciones piógenas similares a estreptococos del grupo A
<i>Enterococcus faecalis</i> (y otros enterococos)	D	Ninguna, α	Colon	Cultivo en presencia de bilis, hidroliza esculina, desarrollo en NaCl al 6.5%, PYR positivo	Absceso abdominal, infección de las vías urinarias, endocarditis
Grupo de <i>Streptococcus bovis</i>	D	Ninguna	Colon, árbol biliar	Cultivo en presencia de bilis, hidroliza esculina, ningún desarrollo en NaCl al 6.5%, degrada almidón	Endocarditis, se aísla con frecuencia en hemocultivo en pacientes con cáncer de colon, enfermedades biliares
Grupo de <i>Streptococcus anginosus</i> (<i>S. anginosus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. constellatus</i> , grupo de <i>S. milleri</i>)	F (A, C, G) y no tipificable	α, β, ninguna	Faringe, colon, aparato genital femenino	Variantes de colonia pequeña (<0.5 mm) de especies hemolíticas β. Los microorganismos del grupo A son resistentes a la bacitracina y son PYR negativos. Tipos de fermentación de carbohidratos	Infecciones piógenas, incluidos abscesos cerebrales
Estreptococos <i>viridans</i> (muchas especies)	Por lo general no tipificado o no tipificable	α, ninguna	Boca, faringe, colon, aparato genital femenino	Resistente a optoquina. Colonias insolubles en bilis. Tipo de fermentación de carbohidratos	Caries dental (<i>S. mutans</i>), endocarditis, abscesos (con muchas otras especies bacterianas), algunas especies como <i>Streptococcus mitis</i> , tienen un alto grado de resistencia a la penicilina
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ninguna	α	Nasofaringe	Susceptibilidad a la optoquina. Colonias solubles en bilis, positividad en la reacción tumefacción capsular	Neumonía, meningitis, endocarditis, otitis media y sinusitis
Peptostreptococcus (muchas especies) (véase cap. 21)	Ninguna	Ninguna, α	Boca, colon, aparato genital femenino	Anaerobios obligados	Abscesos (con otras múltiples especies de bacterias)

^a Clasificación de Lancefield.

^b Hemólisis observada en agar sangre de carnero al 5% después de la incubación durante la noche.

^c Hidrólisis de L-pirrolidonil-2-naftilamida (“PYR”).

^d Prueba de Christie, Atkins, Munch-Peterson.

Fuente: Brooks et al. 2011

2. Patrones hemolíticos: los estreptococos pueden producir hemólisis de los eritrocitos *in vitro*, así tenemos la hemólisis completa o beta (β), donde hay destrucción total de los eritrocitos generando aclaramiento de la sangre alrededor del crecimiento; hemólisis incompleta o alfa (α), donde hay una lisis incompleta de los eritrocitos con reducción de hemoglobina y formación de pigmento verde; y ausencia de hemólisis o gamma (γ), donde algunos de los estreptococos son no hemolíticos (De La Rosa y Prieto, 2003; Brooks et al., 2011) (Figura 1).

3. Reacciones bioquímicas: Las pruebas bioquímicas comprenden reacciones de fermentación de carbohidratos, pruebas para determinar la existencia de enzimas y pruebas de susceptibilidad o resistencia a determinados compuestos químicos. Las pruebas bioquímicas se utilizan muy a menudo para clasificar estreptococos después del desarrollo de la colonia y de observar las características hemolíticas. Se utilizan las pruebas bioquímicas para especies que por lo general no reaccionan con las preparaciones de anticuerpo frecuentemente utilizadas para las sustancias específicas de grupo, de los grupos A, B, C, F y G (Brooks et al., 2011).



Figura 1. Patrones hemolíticos de los *Streptococcus* spp.

Fuente: Buxton R.

Streptococcus agalactiae

Antecedentes históricos

El estudio de los estreptococos en el laboratorio fue posibilitado por la introducción de medios de cultivo sólidos hacia fines del siglo XIX. A principios del siglo XX, Hugo Schottmuller demostró las reacciones hemolíticas producidas por los estreptococos en agar sangre. Algunos años más tarde J. H. Brown, trabajando en el Instituto Rockfeller, fue el primero en describir las diferentes reacciones hemolíticas α , β y γ de los estreptococos (Koneman, 2008).

En el año 1882 EGB fue descrito por Christensen como causa de mastitis en ganado vacuno. En el año 1938 fue presentado por primera vez como patógeno humano por Fry, quien describió tres casos de sepsis puerperal mortal. Antes que Fry, Lancefield y Hare habían identificado a estos microorganismos en cultivos vaginales de mujeres asintomáticas posparto (Mandell, Bennett y Dolin, 2006).

Aunque se informaron casos esporádicos durante las próximas tres décadas, estos microorganismos permanecieron desconocidos hasta finales de 1960, cuando se puso de manifiesto su importancia como patógeno clave perinatal en los Estados Unidos y Europa.

Posteriormente, en la década de los 70 se reconoció el EGB como la principal causa de sepsis y meningitis neonatal y en lactantes de corta edad, y como una de las principales causas de morbilidad relacionada con la gestación.

Durante casi 30 años se ha reconocido mundialmente a EGB como un importante patógeno causante de infección perinatal (Koneman, 2008).

La severidad y magnitud de infecciones atribuidas a este microorganismo han estimulado un intenso esfuerzo en las investigaciones, con la esperanza de comprender mejor la patogénesis y

epidemiología de estas infecciones lo que podría producir desarrollo de métodos para su efectivo control y prevención (Remington y Klein, 1995).

La instauración de recomendaciones sobre profilaxis materna intraparto a mediados de la década de 1990 dio lugar a una drástica reducción de la incidencia de las infecciones neonatales precoces y un descenso significativo de la incidencia de enfermedad invasiva durante la gestación (Edwards y Baker, 2016).

Con la instauración de medidas profilácticas, a partir de la década del '70, se reportan tasas de 0,2 a 5,4 por 1000 nacimientos, estas infecciones no sólo se manifestaron en neonatos sino también fueron acompañadas por un número creciente en mujeres embarazadas y no embarazadas (Farley et al., 1993).

Fisiología y estructura

El EGB es un coco Gram positivo, catalasa y oxidasa negativo y anaerobio facultativo perteneciente al grupo B de Lancefield, usualmente se lo encuentra dispuesto en cadenas cortas en muestras de origen clínico o cadenas largas en colonias de cultivo (Murray et al., 2014). Las colonias de EGB aisladas en agar sangre de carnero 5% tienen de 3-4 mm de diámetro, de aspecto liso y un color blanco grisáceo, rodeadas por una estrecha zona de β hemólisis, a veces tan estrecha que sólo es detectable al levantar la colonia. También hay entre un 3 y un 5% de cepas no hemolíticas (Edwards y Baker, 2016; Brooks et al., 2011; Murray et al., 2014). Esta bacteria es capaz de hidrolizar al hipurato de sodio. Presenta resultados negativos para las siguientes pruebas: prueba de sensibilidad a la bacitracina 0,04 U (BA), lo que permite diferenciarlo del *Streptococcus pyogenes*, prueba de L-pyrroglutamil-aminopeptidasa (PYR) y prueba de Vogues-Proskauer (VP), da un resultado variable en la fermentación de trehalosa y glicerol, es incapaz de fermentar el sorbitol y fermentan la glucosa, maltosa, sacarosa (Brooks et al., 2011; Murray et al., 2014).

La prueba de Christie, Atkins y Munch-Petersen (CAMP) descrita en 1944 permite la identificación presuntiva de EGB (Christie, Atkins y Munch-Petersen, 1944). Esta prueba no es específica, ya que el factor CAMP pueden producirlo cepas de los grupos C, F y G (MacFaddin, 1980). El factor CAMP es una proteína extracelular termoestable que aumenta la actividad hemolítica de la β -hemolisina (esfingomielinasa C) de *Staphylococcus aureus* frente a hematíes de carnero.

Otro criterio de identificación presuntiva es la resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol. EGB es capaz de utilizar timidina presente en los medios de cultivo, anulando el bloqueo que este antibiótico produce en la vía del folato (Gunn, 1976).

Clasificación y Tipificación

Las cepas de EGB se pueden subdividir en función de la presencia de tres marcadores serológicos:

1) El antígeno polisacárido de la pared celular específico de grupo o Sustancia C: antígeno de agrupamiento Lancefield; que posee una estructura ramificada y compleja, situado sobre la pared de la bacteria. El antígeno del grupo B está compuesto por un polímero de ramnosa, N-acetilglucosamina y galactosa, fijada a la capa del peptidoglucano. Los anticuerpos frente al antígeno de grupo no son capaces de proteger frente a la infección (Figura 2).

2) El antígeno polisacárido capsular tipo específico o sustancia S: EGB se puede caracterizar en base a la producción de su polisacárido capsular (PC), el cual expresa en gran cantidad en superficie, en diez estructuras antigénicamente únicas y diferentes (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX). Este PC consiste en varias unidades repetidas de monosacáridos como la glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina y ácido N-acetil-neuramínico (ácido siálico). La especificidad del serotipo está determinada por las distintas disposiciones de estos cuatro

componentes en cada uno de los diez tipos capsulares. La función de este PC es ayudar a evadir los mecanismos de defensa del hospedador interfiriendo en el aclaramiento fagocítico.

Los anticuerpos frente a este antígeno son capaces de proteger de la infección causada por cepas de su tipo (Koneman, 2008; Puertas-Prieto et al., 2017).

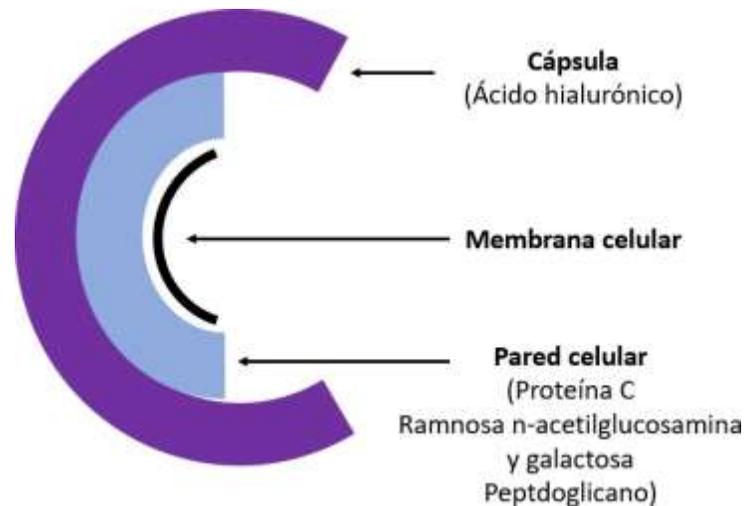


Figura 2. Estructura del EGB.

Fuente: Autoría propia

3) Los antígenos proteicos de superficie conocido como antígeno C: es designado sólo con la letra C, que existe en dos tipos diferentes: c-alfa y c-beta. Por lo tanto la designación de los serotipos para las cepas que contienen antígeno C se expresan como Ib/c y II/c. Este antígeno se encuentra en todas las cepas Ia y Ib, en el 60% de las cepas tipo II, y raramente en las cepas de tipo III (Koneman, 2008; Murray et al., 2014).

Se han utilizado diferentes técnicas para el serotipado de EGB, desde las reacciones basadas en aglutinación con partículas de látex, técnicas de coaglutinación, inmunoprecipitación, contraelectroforesis y precipitación capilar con una fiabilidad moderada y para las que se han encontrado porcentajes elevados de cepas no tipables o con errores de serotipos entre los

aislados, hasta llegar a los métodos moleculares, bastante más reproducibles, específicos y fáciles de realizar dirigidos principalmente frente al operón cps de EGB (Liébana-Martos et al., 2015).

Hábitat

EGB es un microorganismo comensal perteneciente a la microbiota del tracto gastrointestinal que suele colonizar el tracto genital (CDC, 2010), siendo un problema en pacientes inmunocomprometidos ya que también puede infectar otras zonas del cuerpo actuando como un patógeno (Di Bartolomeo, Gentile, Priore, Valle y Di Bella, 2005).

Factores de virulencia

Una característica de las cepas de EGB es que la mayoría de los genes asociados a la virulencia, codifican proteínas necesarias para la interacción célula – huésped – bacteria, en el proceso de la patogenicidad (Laczeski et al., 2014a).

EGB es capaz de evadir ciertas barreras inmunológicas como prevenir su fagocitosis por las células del huésped. Así mismo puede invadir a las células epiteliales, y de esta manera, propagarse hacia el torrente sanguíneo (Nitschke, Slickers, Müller, Ehricht y Monecke, 2014) (Tabla 2).

Todo esto es posible gracias a sus características como son su PC, adhesinas de unión a la fibronectina, así como hemolisinas y su factor CAMP; de igual manera presenta varias proteasas (García et al., 2011) (Figura 3).

Es claro que el principal factor de virulencia del EGB es su cápsula de polisacáridos (CPS) por el papel que desempeña el ácido siálico que forma parte de éste, que puede inhibir la activación de la ruta alternativa de complemento, evadiendo la fagocitosis (Nuccitelli, Rinaudo y Maione, 2015).

Otro importante factor de virulencia es la producción de hemolisina, que está ligada a la producción de un pigmento que actúa formando poros en la célula hospedadora produciendo su lisis (Puertas-Prieto et al., 2017).

El ácido lipoteicoico puede participar facilitando la adherencia como primer paso de la infección (Koneman, 2008).

Las proteínas de superficie de EGB incluyen proteínas α -C y β -C, proteína Rib (resistencia a proteasas, inmunidad, grupo B), proteína HylB y proteína Lmb.

La proteína α -C, está asociada con la adherencia de las células epiteliales, mientras que la proteína β -C, está asociada con la invasión de las células epiteliales y la resistencia al aclaramiento de fagocitos. La proteína rib, muestra una identidad de residuos extensa con la proteína α -C y se expresa en los aislamientos de EGB más invasivos. La proteína HylB, escinde las cadenas de hialuronato, facilitando la propagación de EGB a través de los tejidos del huésped, mientras que la proteína Lmb, media la adhesión de EGB a la laminina humana (Lindahl, Stålhammar-Carlemalm y Areschoug, 2005; Oviedo et al., 2013).

Otro factor de virulencia, la enzima de superficie, ScpB (C5a peptidasa), está involucrada en el daño a neutrófilos y en la unión de la fibronectina para promover la adherencia y la invasión bacteriana de las células epiteliales.

Recientemente se ha identificado en EGB una proteína de adherencia a fibrinógeno, llamada FbsB, la cual se adhiere fuertemente a las células epiteliales pulmonares y protege a la bacteria de la opsonización en el torrente sanguíneo humano. Esta proteína, también se asocia a la invasión epitelial.

La proteína FbsA, protege a la bacteria de la opsonización-fagocitosis y promueve su adherencia a las células epiteliales, sobre todo del endotelio cerebral, colaborando para que el patógeno atraviese la barrera hematoencefálica conduciendo a la meningitis (Laczeski et al., 2014c).

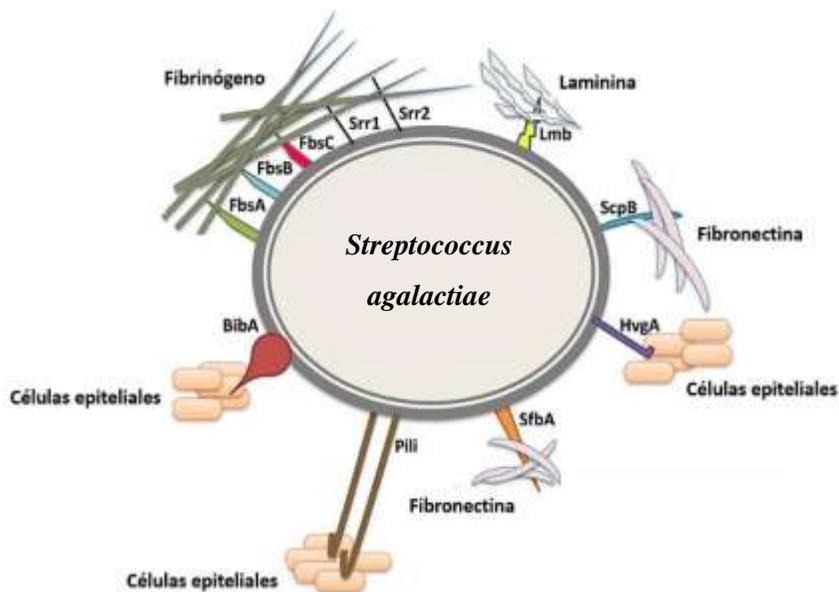


Figura 3. Principales adhesinas que median la interacción de EGB con células huésped.

Fuente: Adaptado de Shabayek y Spellerberg (2018)

Tabla 2.

Factores de virulencia del EGB y su papel en la transición de colonización a enfermedad invasiva.

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		+		+	

Fuente: Palacios-Saucedo et al. (2017)

Patología

EGB es el agente etiológico más prevalente de enfermedad invasiva en los RN (sepsis, neumonía y meningitis), seguida de una diversidad de infecciones especialmente en mujeres con fiebre puerperal, ITU e infecciones postquirúrgicas.

Recientemente, el número de casos de infección invasiva causada por EGB en adultos no gestantes ha ido en aumento (Brooks et al., 2011).

La mayoría de la información sobre la infección causada por EGB corresponde a países desarrollados. Aunque existen estudios sobre la infección perinatal por EGB publicados en Colombia, Argentina, Perú y Brasil, la información sobre la epidemiología y el comportamiento de la infección por EGB en América Latina sigue siendo limitada (Palacios-Saucedo et al., 2017).

EGB y sus complicaciones en RN

EGB es una bacteria que posee una gran variedad de fenotipos que le otorgan invasividad y lo hacen capaz de producir enfermedades graves en hospedadores susceptibles, en particular, el neonato humano.

La transmisión de esta bacteria puede ser vertical, de madre a hijo, u horizontal a partir del medio ambiente.

Las infecciones intrauterinas del feto resultan de colonización ascendente de la vagina de mujeres asintomáticas; la aspiración fetal de líquido amniótico infectado puede llevar a una sepsis, neumonía neonatal o meningitis. Los neonatos también pueden ser infectados durante el paso a través del canal de nacimiento, la mayoría de ellos que son expuestos por esta vía, resultan colonizados en la piel o las membranas mucosas, pero se mantienen generalmente asintomáticos (CDC, 2010).

La proporción de infantes con meningitis es alta entre aquellos con infección tardía. Cuando la infección neonatal causada por EGB apareció en la década de 1970, más del 50% de los pacientes morían.

Infección de inicio temprano

Definida como el desarrollo de infección sistémica durante los 7 primeros días de vida, comienza por término medio hacia las 12 horas de vida. La infección sintomática temprana ocurre en 0,5 a 2% de infantes nacidos de madres con colonización vaginal o rectal de EGB.

En las infecciones tempranas los macrófagos y polimorfonucleares son las primeras células inmunes que interactúan con EGB (Murray et al., 2014).

La enfermedad de comienzo precoz, la cual se caracteriza por bacteriemia, neumonía o meningitis, lo que acontece con una proporción aproximada del 60%, 30% y 10% respectivamente (Mandel et al., 2006). Los signos iniciales de la infección de inicio precoz son: letargo, apnea o bradicardia, irritabilidad e hipertermia; no se distingue de la septicemia producida por otros microorganismos. En la mayoría de los niños se observa afectación pulmonar, pero la afectación meníngea puede no ser aparente inicialmente, por lo que es necesario efectuar un examen del líquido cefalorraquídeo en todos los niños infectados. La tasa de mortalidad ha disminuido a menos del 5% debido al diagnóstico precoz y a la mejora del tratamiento complementario; sin embargo, una proporción comprendida entre el 15% y el 30% de los niños que sobreviven a la meningitis presentan secuelas neurológicas como ceguera, sordera y retraso mental grave (Murray et al., 2014).

Es frecuente la existencia de complicaciones obstétricas maternas (50%-60%), fundamentalmente: prematuridad (menor de 37 semanas), la rotura prolongada de las membranas (mayor de 18 horas), fiebre intraparto (mayor de 38°C), haber tenido un hijo anteriormente con

infección por EGB y la presencia de bacteriuria durante el embarazo causada por este microorganismo (CDC, 2010).

Infección de inicio tardío

El síndrome de inicio tardío comienza entre los 7 y los 89 días de edad, con una media de cerca de 24 días. La enfermedad en niños mayores tiene un origen exógeno (por ejemplo, la madre, otro niño).

Las complicaciones obstétricas maternas son infrecuentes, y la letalidad es baja, estimándose en un 3%, pero con complicaciones neurológicas frecuentes en niños con meningitis (25-50%) (Murray et al., 2014).

La meningitis y bacteremia ocultas constituyen manifestaciones clínicas frecuentes de las infecciones de inicio tardío, aunque también se han descrito diferentes infecciones focales, en general acompañadas de bacteremia.

Los síntomas son fiebre, irritabilidad, apnea e hipotensión. Neonatos con meningitis tienen síntomas similares. Otras infecciones que se asocian con infecciones tardías son osteomielitis, otitis media, etmoiditis, conjuntivitis, artritis y celulitis/adenitis (Murray et al., 2014).

Otros hallazgos clínicos que se han asociado a un pronóstico fatal o a secuelas neurológicas permanentes son la neutropenia en el momento de ingreso, convulsiones prolongadas y altas concentraciones de antígeno polisacárido de tipo III en las muestras de líquido cefalorraquídeo al ingreso (Mandel et al., 2006).

Infección maternal relacionada con la gestación

EGB causa infecciones frecuentes en las mujeres durante la gestación o inmediatamente después de ésta, infecciones como endometritis postparto, amnionitis, infecciones del aparato

genitourinario, infección de la herida del parto, etc. Y estimándose una incidencia de estas infecciones de 2 por cada 1000 embarazos (Murray et al., 2014).

La colonización materna se ha relacionado con rotura prematura de membranas y parto prematuro aunque otros estudios no han confirmado esta asociación. Se ha señalado que la ITU por EGB durante la gestión puede estar relacionada con aborto, parto prematuro y rotura prematura de membranas (CDC, 2010).

El EGB puede estar presente en la leche materna y a través de ella infectar al RN causando infección neonatal tardía, pero no se ha descrito la producción de mastitis o abscesos de mama en la puérpera (Forbes, Sahm y Weissfeld, 2009).

El pronóstico es muy favorable en las gestantes que reciben tratamiento apropiado ya que su estado de salud suele ser bueno. Las complicaciones secundarias de la bacteriemia, como la endocarditis, la meningitis y la osteomielitis, son infrecuentes (Murray et al., 2014).

Infección en el adulto no relacionada con la gestación

Aunque considerado habitualmente EGB como causa de infección en RN y gestantes, en las últimas décadas más de dos tercios de las infecciones ocurren ahora en adultos y no se vinculan con embarazo. Si excluimos a la mujer gestante, la mayoría de estos casos se dan en adultos mayores de 65 años (principalmente varones). En general, los adultos infectados tienen una enfermedad subyacente importante, como diabetes, edad avanzada, cirrosis hepática, úlceras de decúbito, accidente cerebrovascular, neoplasia, VIH o disfunción de las vías urinarias (Liébana-Martos et al., 2015; Brooks et al., 2011).

Las más corrientes son la bacteriemia, la neumonía, infecciones de piel y tejidos blandos e infecciones óseas que aparecen frecuentemente, e incluyen celulitis, abscesos, úlceras por decúbito

infectadas e infecciones invasoras de heridas luego de procedimientos quirúrgicos (Koneman, 2008).

Debido a que estos pacientes suelen presentar una alteración de su sistema inmunitario, la mortalidad es más elevada en esta población. La tasa de mortalidad oscila entre el 3-47% y es más alta en pacientes de edad avanzada con afecciones médicas subyacentes (Chaiwarith et al., 2011).

En el adulto no es excepcional la bacteriemia por EGB sin foco demostrable que frecuentemente es polimicrobiana. El EGB es causa también de endocarditis, síndrome que fue mucho más frecuentemente en la era pre-antibiótica, siendo en los años 1930 y 1940 la endocarditis por EGB frecuente en la embarazada, aunque hoy la endocarditis por EGB, en general, no aparece relacionada con el embarazo. El EGB es también un patógeno urinario de interés, causando ITU en pacientes cateterizados y en ancianos (Forbes et al., 2009).

Epidemiología

Los reportes de casos de enfermedad neonatal por EGB fueron ocasionales hasta principios de 1960, cuando fue reconocido como una de las principales causas de sepsis neonatal temprana en los EE.UU., siendo a principios de la década de 1980 la causa más común de sepsis y meningitis neonatal en varios países desarrollados (Palacios-Saucedo et al., 2017).

El EGB es capaz de causar enfermedades graves, principalmente en RN y en mujeres embarazadas y en el puerperio. A pesar del uso de profilaxis antibiótica intraparto (PAI) en los EE.UU. y otros países desarrollados, el EGB sigue siendo la causa más frecuente de sepsis y meningitis neonatal en esos países, con cerca de 50,000 infecciones maternas por año y tasas de transmisión vertical al RN del 29-72% (Palacios-Saucedo et al., 2017).

La incidencia de esta forma de la enfermedad ha disminuido en EEUU desde 1,8 casos por 1.000 RN vivos en los años 90 hasta 0,25 por 1.000 nacidos vivos en 2013. En España la incidencia

descendió desde 2,4 por 1.000 nacidos vivos en 1996 hasta 0,33 en 2008, siendo este comportamiento atribuido a la implementación del cribado universal para EGB en la embarazada y a la difusión de PAI (Puertas-Prieto et al., 2017).

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

Se estima que entre 50% y 70% de los neonatos pueden ser colonizados a través de la madre y que, si esto sucede, entre 1% y 2% desarrollarán enfermedad invasiva (Crespo-Ortiz, Henao-Giraldo, Espitia y Herrera-Jaramillo, 2012).

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

Se han identificado los serotipos del EGB, determinando la existencia de diez serotipos Ia, Ib, II-IX. Así mismo, la identificación de los serotipos más frecuentes de esta bacteria se ha realizado en varios países en el mundo, dando como resultado que los serotipos Ia, II, III y V son los más frecuentes (Gosiewski, Brzychczy-Wloch y Heczko, 2012).

En Latinoamérica de igual manera, existen algunos datos sobre la prevalencia de los diferentes serotipos, arrojando que los serotipos más encontrados han sido III y V (Laczeski et al., 2014a). El EGB presenta diferentes serotipos que se asocian con mayor frecuencia a la enfermedad del RN siendo los más comunes los serotipos: Ia, Ib, II, III y V (Murray et al., 2014).

El comportamiento de la infección neonatal por EGB se ha estudiado en diversas áreas geográficas mostrando características diversas. La prevalencia de colonización materna es variable, en países de Europa oscila entre 7% y 36%; en Asia, es de 19%; en Medio Oriente y África, entre 19% y 22%; en Norte América 26% y en Centro y Sur América, 14%. Históricamente se ha asumido que el nivel de colonización en embarazadas en países en desarrollo es menor. En Latinoamérica, la importancia y el impacto de esta bacteria en neonatos e individuos susceptibles no es claro y el número de estudios epidemiológicos, clínicos y de diagnóstico sigue siendo limitado. No obstante estudios realizados en países de Latinoamérica como Brasil, México, Venezuela, Chile, Uruguay, Argentina y Perú, y en el Caribe han descrito prevalencias entre 10% y 45% (Crespo-Ortiz et al., 2012).

EGB sigue siendo universalmente sensible a PE, aunque se han comunicado casos de cepas con sensibilidad disminuida. En cuanto a ERI y CLI, se ha puesto de manifiesto en los últimos años un incremento en el porcentaje de resistencias, alcanzando actualmente el 10-20% (Liébana-Martos et al., 2015).

En el estudio de Villar y Hugo en Argentina encontró para el año 2012 un aumento en la prevalencia de resistencia a ERI y CLI con niveles del 27,5 y 30,3% respectivamente (Villar y Jugo, 2013).

Infecciones por EGB en adultos mayores presenta una incidencia anual de 4 a 8 casos por 100.000 adultos, cifra que se incrementa hasta aproximadamente 30 casos por cada 100.000 personas mayores de 65 años, con una mortalidad mayor del 10% (Puertas-Prieto et al., 2017).

Terapia antibiótica

PE sigue siendo el antibiótico de primera línea y de mayor uso clínico en pacientes no alérgicos a estos, con infección por EGB (Villar y Jugo, 2013), mientras que el uso de ERI o CLI (antibióticos de segunda línea) han sido recomendados para tratamientos en pacientes alérgicos a betalactámicos (Abarzúa et al., 2011). Con el pasar de los años el uso de estos ha generado la aparición de resistencias a ERI y CLI (Emaneini et al., 2014).

Recientemente en Estados Unidos y Japón se han identificado algunas cepas de EGB con sensibilidad disminuida a PE debida a una mutación en los genes que codifican una proteína fijadora de PE (PBP 2X). La repercusión clínica de este fenómeno no está clara y, hasta ahora, no altera la recomendación del uso de antibióticos betalactámicos (Dahesh et al., 2008).

Mecanismo de acción de los antimicrobianos

Penicilinas

Son un grupo de antibióticos de origen natural y semisintéticos que contienen el núcleo de ácido 6-aminopenicilánico, que consiste en un anillo betalactámico unido a un anillo tiazolidínico. Los compuestos de origen natural son producidos por diferentes especies de *Penicillium spp.*

Para entender el mecanismo de acción de PE debemos recordar que el principal componente estructural de la mayoría de las paredes de las células bacterianas es la capa de peptidoglucano. La estructura básica es una cadena de 10 a 65 residuos disacáridos que constan de moléculas en alternancia de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico. Estas cadenas se entrecruzan con puentes peptídicos que crean una malla rígida que recubre la bacteria. La construcción de las

cadena y el entrecruzamiento están catalizados por enzimas específicas (por ejemplo, transpeptidasas, transglucosilasas, carboxipeptidasas) que son miembros de una gran familia de serina proteasas. Estas enzimas reguladoras reciben también la denominación de proteínas fijadoras de penicilinas (PBP, del inglés penicillin-binding proteins), porque son las dianas de los antibióticos betalactámicos. Existen entre tres y seis (o más) PBP por célula. Cuando las bacterias en crecimiento quedan expuestas a estos antibióticos, PE se une a PBP específicas de la pared celular bacteriana e inhibe el ensamblaje de las cadenas de peptidoglucano, cuando se bloquea la transpeptidación final. Esto, a su vez, activa autolisinas que degradan la pared celular, lo que da lugar a la muerte de la célula bacteriana. Así, los antibióticos betalactámicos actúan como agentes bactericidas (Brooks et al., 2011; Murray et al., 2014).

Macrólidos

Los macrólidos son macromoléculas lipofílicas, que presentan en su estructura un anillo lactónico macrocíclico de 12 a 16 átomos de carbono, sin nitrógeno (N) y pocos dobles enlaces. Presentan dos o más azúcares o aminoazúcares que están unidos a la macrolactona (desosamina y cladinosa).

En 1942, Gardner y Chain identifican el primer macrólido, la proactinomicina (picromicina) en cepas de *Streptomyces*. Desde entonces se han obtenido macrólidos de más de 100 bacterias diferentes (*Streptomyces*) y hongos del suelo (*Micromonospora*).

Los macrólidos se clasifican según el número de átomos de carbono en la lactona en 12, 14, 15, 16 miembros. El macrólido más utilizado, es ERI. La claritromicina y la azitromicina son derivados sintéticos de ERI (Murray et al., 2014).

El mecanismo de acción de los macrólidos se lleva a cabo al unirse a la subunidad 50S del ARN ribosómico (ARNr) 23S en forma reversible, que bloquea la elongación polipeptídica. La unión se

realiza mediante la formación de puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilo del macrólido y determinadas bases del ARNr. Interfieren con la formación de complejos de iniciación para la síntesis de las cadenas peptídicas o provoca un bloqueo en las reacciones de transpeptidación y traslocación, inhibiendo la síntesis de proteínas (Figura 4).

Los macrólidos son antibióticos bacteriostáticos con un amplio espectro de actividad. La actividad de ERI aumenta considerablemente en un pH alcalino (Brooks et al., 2011; Murray et al., 2014).

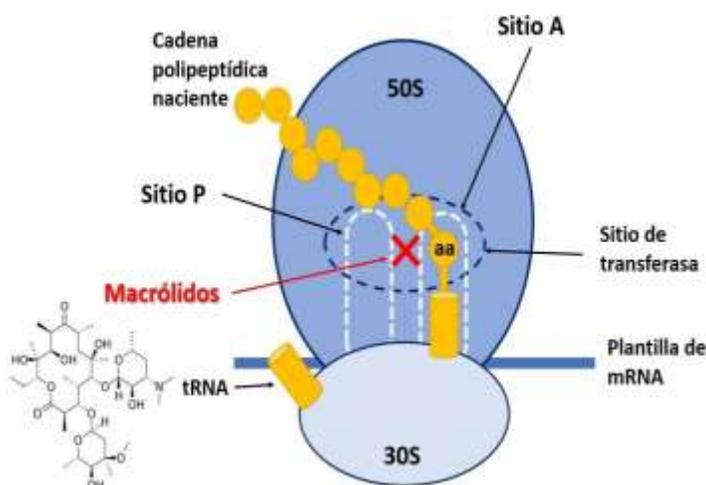


Figura 4. Sitio de acción de los macrólidos en la subunidad 50S del ribosoma bacteriano.
Fuente: Brunton Laurence L., Lazo John S., Parker Keith L. (2006)

Lincosamidas

En este grupo de antibacterianos se incluye la lincomicina, inicialmente aislada de *Streptomyces lincolnensis* y CLI, la cual es una modificación química de la lincomicina, en el que se sustituye un átomo de cloro. En comparación con lincomicina, CLI tiene mayor actividad antibacteriana y mejor absorción después de la administración oral. Estos fármacos son estables en ácido (Brooks et al., 2011).

Mecanismo de acción de las lincosamidas consiste en la unión a la subunidad 50S ribosomal impidiendo la elongación de la cadena de péptidos, interfiriendo con la peptidil transferasa y la

consiguiente síntesis de proteínas. Comparten el mismo sitio de unión ribosomal con macrólidos, estreptograminas y cloranfenicol. Las lincosamidas pueden ser bactericidas o bacteriostáticas, dependiendo de la concentración de la droga, la especie bacteriana, el inóculo bacteriano y el sitio de infección (Murray et al., 2014).

Mecanismo de resistencia a los macrólidos y lincosamidas

En cuanto a los mecanismos de resistencia a macrólidos, han sido identificados dos: (Tabla 3)

(i) Modificación del sitio diana; ocurre en los ribosomas a través de un ARNr metilasa que modifica un residuo de adenina del ARNr 23S. Provoca un cambio conformacional en el ribosoma que da lugar a una menor afinidad de unión de los macrólidos (de 14, 15 y 16 átomos) y también de lincosamidas y estreptograminas B, por su diana a nivel de la subunidad ribosomal 50S. Por lo tanto el fenotipo de resistencia en las cepas con este mecanismo de resistencia es denominado macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (MLSb), siendo la bacteria resistente a los tres grupos de antimicrobianos. Las metilasas se encuentra codificada por genes *erm* (erythromycin ribosomal methylase), *ermA* (subclase TR) y *ermB* (Campelo, Pedrosa, Antúnez y Capuz, 2012). La resistencia MLSb puede expresarse de dos formas: constitutiva (fenotipo cMLSb) o inducible (fenotipo iMLSb). En el fenotipo constitutivo (se expresa tanto en presencia como en ausencia de macrólidos) se presenta elevado nivel de resistencia a cualquier antimicrobiano del grupo MLSb y resistencia absoluta en antibiograma por difusión a ERI y CLI. En el fenotipo inducible (sólo se expresa previa inducción, en presencia de ERI) presenta únicamente resistencia a los macrólidos de 14 átomos (ejm. ERI) y 15 átomos (azitromicina) y sensibilidad *in vitro* a macrólidos de 16 átomos, lincosamidas (ejm. CLI) y estreptograminas B, la sensibilidad a CLI es afectada por la presencia de un inductor. La inducción se ha relacionado con la presencia de cladinosa en los macrólidos de 14 (ERI) y 15 átomos. Los macrólidos de 16 átomos y CLI, no inducen la actividad

de la metilasa porque carecen de este azúcar (Laczeski et al., 2013). De esta manera las cepas de EGB con fenotipo iMLSb son sensibles a CLI “*in vitro*” pero deben ser informadas como R (resistente), no siendo CLI efectiva clínicamente, ya que inducen lentamente resistencia con el consiguiente fracaso terapéutico (Lin et al., 2000). Esta característica de ERI como inductor se aprovecha en una prueba *in vitro* que sirve para detectar iMLSb, prueba del doble disco difusión en agar (D-Test), recomendada por el CLSI.

(ii) Mecanismo de eflujo; mediado por el gen *mefA* (**macrolide efflux**), es una bomba de expulsión del antibiótico fuera de la bacteria que expresa resistencia de bajo nivel a ERI y sensibilidad a lincosamidas, confiriendo resistencia a macrólidos pero no a lincosamidas, ni a estreptograminas (fenotipo M) (Famiglietti et al., 2004).

Entre los métodos de identificación de este tipo de resistencia, unos se basan en la expresión fenotípica, como es el caso del ensayo de inhibición D-Test; esta prueba identifica la resistencia inducible, pudiendo presagiar la mutación hacia una resistencia constitutiva *in-vivo*. También se pueden detectar los genes implicados mediante pruebas moleculares como la PCR. Este tipo de resistencia no puede ser detectada usando los métodos convencionales de disco difusión, tampoco mediante métodos de dilución en caldo o en placa convencionales (Tamariz et al., 2009).

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

Tabla 3.
Fenotipos de resistencia a antibióticos macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (MLS) que se pueden detectar en Streptococcus y posibles mecanismos asociados.

Fenotipo de Resistencia	La bacteria es resistente a los antibióticos:	Mecanismo de Resistencia
Sensible	Sensible a todos los antibióticos MLS	Sin mecanismo
MLSb*	Macrólidos Lincosamidas Estreptograminas del grupo B	Metilasa rRNA 23S
M	Macrólidos	Bomba de eflujo activo
L	Lincosamidas	Inactivación

*La expresión puede ser constitutiva (la resistencia se expresa siempre) o inducible (la resistencia se expresa sólo previa inducción con eritromicina).

Fuente: Adaptado de Portillo et al., 2000; Torres y Cercenado, 2010.

Debido a que estos genes de resistencia son vehiculizados por plásmidos y/o transposones, la transmisión puede ser tanto de manera vertical como horizontal, por lo que es necesario el estudio continuo de la evolución de la resistencia de EGB a los macrólidos, no sólo para caracterizar fenotípicamente y genotípicamente las cepas sino para conocer la adquisición de nuevos mecanismos de resistencia. La importancia del conocimiento de estos fenotipos, permite adecuar los tratamientos ya sean terapéuticos o profilácticos. En otros términos, si EGB es aislado de un paciente y presenta fenotipo iMLSb, alerta al médico tratante sobre las consecuencias probables del uso de CLI, mientras que el fenotipo M permite usar como profilaxis CLI.

El aumento y la diseminación de la resistencia a macrólidos y lincosamidas, tanto en EGB como en otras especies de estreptococos, ha tenido ya implicancias en la terapéutica y en la profilaxis

(DiPersio y DiPersio, 2006), pudiendo ser responsables de este marcado aumento que se ha evidenciado en la última década, la elevada transmisibilidad de los estreptococos hemolíticos como lo es EGB, incluyendo la de clones resistentes a macrólidos y la alta frecuencia de uso de esas drogas (Uh et al., 2007).

Marco Conceptual

Colonización: Es la capacidad de llegar a la superficie del huésped por una puerta de entrada (piel o mucosas), formar o establecer una colonia en el epitelio y resistir la acción de los sistemas locales de defensa.

Sepsis: Es una enfermedad grave. Ocurre cuando el cuerpo tiene una abrumadora respuesta inmunológica a una infección bacteriana.

Anaerobio facultativo: Son bacterias que pueden desarrollarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.

Hemólisis: Capacidad hemolítica de los microorganismos patógenos (que es un factor de virulencia). Observando los halos hemolíticos alrededor de las colonias se determina el tipo de hemólisis que posee.

Virulencia: Grado de patogenicidad de un serotipo, de una cepa o de una colonia microbiana en un huésped susceptible

Genes de resistencia: Genes que codifican proteína o factores de resistencia.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (en inglés Polymerase Chain Reaction), esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN.

III. MÉTODO

3.1. Tipo de investigación

Es un estudio OBSERVACIONAL DESCRIPTIVO, porque los investigadores no intervienen manipulando el fenómeno, sólo se observan, describen y miden las variables en juego.

Es un estudio de CORTE TRANSVERSAL, porque las variables se miden en una sola vez, y de inmediato se proceden a su descripción o análisis.

3.2. Ámbito temporal y espacial

La investigación fue realizada en el servicio de microbiología del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé entre los meses de noviembre de 2018 y abril de 2019, en el Laboratorio de Bacteriología y Laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética del Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión” de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.3. Variables

Variable dependiente

Perfil de susceptibilidad: sensible, intermedio, resistente.

Fenotipos de resistencia: sensible, cMLSb, iMLSb, M.

Genes de resistencia: *ermB*, *ermTR*, *mefA*.

Variable independiente

Aislados de *Streptococcus agalactiae*.

3.4. Población y muestra

Población: Todos los aislados clínicos obtenidos a partir de muestras enviadas con solicitud de cultivo al servicio de microbiología Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé entre noviembre de 2018 y abril de 2019.

Muestra: 19 aislados de EGB entre noviembre de 2018 y abril de 2019.

3.5. Instrumentos

Para cada aislado se utilizó una ficha de recolección de datos (Anexo1).

3.6. Procedimientos

Se recolectaron todos los aislados de EGB, provenientes de pacientes del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé durante el periodo noviembre de 2018 y abril de 2019.

La identificación de los aislados se realizó con el sistema automatizado Vitek 2 Compact (BioMérieux). Los mismos se conservaron en medio Agar Tripticasa de Soja (TSA) y almacenadas a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

Recuperación de los aislados y confirmación de la identificación

Los aislados conservados en TSA se reactivaron y confirmaron su pureza, sembrándolos en agar sangre de carnero al 5%; evaluando la hemólisis, se realizaron también la tinción de Gram, prueba de catalasa, CAMP y resistencia a la bacitracina 0,04 U.

Detección fenotípica de la resistencia

Se realizó en el Laboratorio de Bacteriología del Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión” de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se realizaron con la tarjeta AST-GP67 del equipo Vitek® 2 (BioMérieux) el cual trabaja con una técnica de microdilución, para los antibióticos: PE, AMP, ERI, CLI, VA y levofloxacino (LEV).

Se realizó el D-Test, siguiendo los lineamientos del CLSI (CLSI, 2019). Sobre una placa de agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre de carnero, previamente inoculada con una suspensión (0,5 McFarland) de EGB, se colocó un disco de ERI (15 µg) y otro de CLI (2 µg) separados por una distancia de 12mm de borde a borde, luego se incubó a 35°C en atmósfera con

5% de CO₂ por 20-24 horas. Para la realización del control de calidad de los discos de antibióticos se usó la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Los resultados fueron interpretados de acuerdo con las recomendaciones del CLSI (figura 5) (Tabla 4).

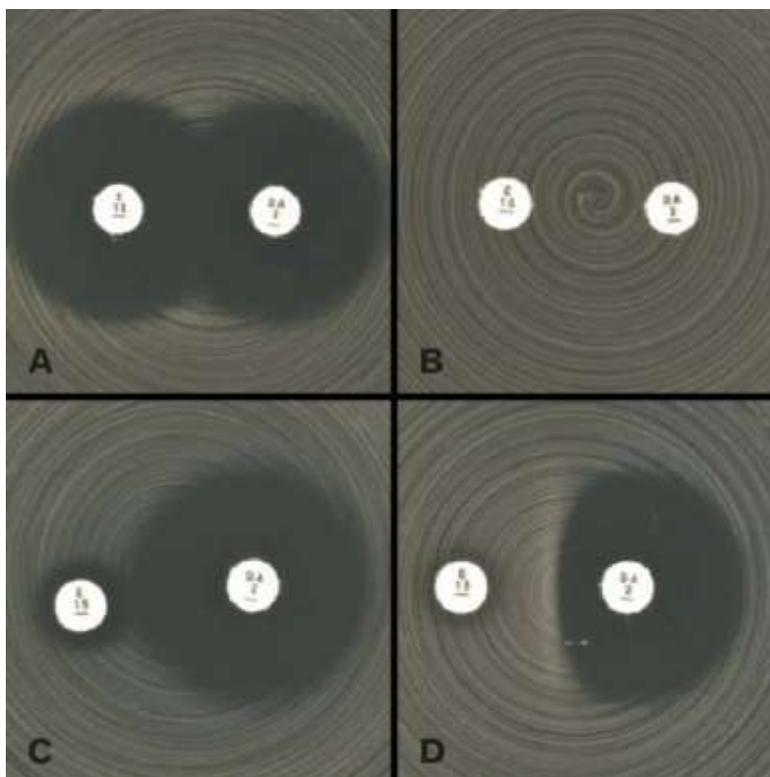


Figura 5. Interpretación D-test según CLSI.

(A) Susceptible tanto a la eritromicina como a la clindamicina. (B) resistencia a cMLS B (a ambos antibióticos). (C) Prueba D negativa: resistencia de tipo M (sólo a la eritromicina). (D)

Prueba D positiva: resistencia a iMLS B (a ambos antibióticos).

Fuente: Gardiner, Grayson y Wood (2013)

Tabla 4.
Interpretación de los fenotipos D-test según CLSI.

Discos de		D-test	Descripción del test de inducción	Mecanismo de resistencia	Fenotipo de resistencia	Informar	
ERI	CLI					ERI	CLI
S	S	-	Zonas de inhibición en la categoría de "sensible" para ERI y CLI	Ninguno	Ninguno	S	S
R	S	-	Zonas de inhibición en la categoría de "sensible" para CLI	Eflujo (<i>mefA</i>)	M	R	S
R	S	+	Achatamiento del halo de CLI en la proximidad del disco de ERI	Metilación ribosomal (<i>ermTR</i>)	iMLSb (inducible)	R	R
R	R	-	No hay halos de inhibición	Metilación ribosomal (<i>ermB</i>)	cMLSb (constitutivo)	R	R

ERI: eritromicina 15µg; CLI: clindamicina 2µg; S: sensible; R: resistente

Fuente: Autoría propia

Detección genotípica de la resistencia

Los genes de resistencia fueron investigados mediante PCR, en el Laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética del Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión" de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Los genes investigados fueron: *ermB* (metilasa expresada constitutivamente), *ermTR* (metilasa expresada induciblemente) y *mefA* (mecanismo de flujo de salida).

Obtención de ADN total

Se realizó la extracción de ADN obtenido por lisado celular mediante tratamiento térmico. A partir de cultivos de 24 horas de los microorganismos en estudio, se suspendieron varias colonias en 200 µl de agua milliQ estéril. Fueron colocados en un thermoblock a 100°C durante 15 minutos, posteriormente se centrifugaron a 12000 r.p.m. durante 2 minutos, para descartar los restos

celulares. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y conservado a -20°C (Modificado de Adwan, 2014).

Se amplificaron los genes codificantes por PCR, empleando cebadores específicos, utilizando como molde ADN total. Se emplearon los siguientes pares de oligonucleótidos cebadores (5'-3') descritos en la Tabla 5.

Tabla 5.
Secuencia de cebadores utilizados para amplificar los genes de resistencia en EGB

Genes	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	Amplificación (pb)	GenBank
<i>ermB</i>	GAAAAAGTACTCAACCAAATA	AGTAATGGTACTTAAATTGTTTAC	639	DQ355148.1
<i>ermTR</i>	TTGGGTCAGGAAAAGGA	GGGTGAAAATATGCTCG	385	AF002716.1
<i>mefA</i>	GGTATCTTTAATCACTAGTGC	TTCTTCTGGTACTAAAAG	345	DQ445272.1

Se optimizaron los volúmenes y concentraciones para la mezcla de reacción de la PCR de cada uno de los genes de resistencia como se indica en la Tabla 6. Además, se estableció un protocolo para la amplificación de la PCR detallada en Tabla 7, realizando algunas modificaciones del protocolo de Laczeski (Adaptado de Laczeski et al., 2014b).

Tabla 6.
Mezcla de reacción para la PCR

REACTIVOS	VOLUMEN (μL)		
	<i>ermB</i>	<i>ermTR</i>	<i>mefA</i>
Agua milliQ estéril	10,30	15,40	10,30
Buffer 10x (libre de MgCl_2)	2,50	2,50	2,50
MgCl_2 25 mM	3,00	1,50	3,00
dNTPs 2.5 Mm	2,00	2,00	2,00
Cebador F 10 pmol/ μL	1,00	0,50	1,00
Cebador R 10 pmol/ μL	1,00	0,50	1,00
Taq 5U/ μL	0,20	0,10	0,20
ADN	5,00	2,50	5,00
Volumen final	25	25	25

Tabla 7.
Detalle del ciclado de la PCR para la amplificación de los genes de virulencia en EGB

	<i>ermB - ermTR</i>	<i>ciclos</i>	<i>mefA</i>	<i>ciclos</i>
Desnaturalización inicial	95 x 5 minutos	-	95 x 5 minutos	-
Desnaturalización	95 x 30 segundos	32	95 x 5 segundos	40
Hibridación	95 x 5 segundos		95 x 5 segundos	
Extensión	95 x 5 segundos		95 x 5 segundos	
Extensión final	95 x 5 minutos	-	95 x 5 minutos	-

Electroforesis

Los productos de amplificación fueron resueltos por electroforesis en agarosa al 1.5% conteniendo RedSafe (0.5 µg/mL). Para ello, se mezclaron 10µL de cada producto con 2µL de buffer de carga de ADN 10x y se puso 10µL en el gel. Se incluyó también un marcador de peso molecular de 100 pb (ladder), el cual es un estándar de referencia que contiene fragmentos de ADN de longitudes conocidas. Se corrió a 80 voltios por 35 minutos. Las bandas resultantes se visualizaron con un transiluminador UV.

3.7. Análisis de datos

Se realizó un estudio descriptivo univariado de cada uno de los aislados en estudio, clasificándolas en productoras o no productoras de los genes de resistencia. Para la determinación de los porcentajes de resistencia y sensibilidad antimicrobiana, los datos obtenidos fueron introducidos en Microsoft Excel 2010 y en el programa World Health Organization Net Versión 5.6 (WHONET), programa estadístico utilizado por la Organización Panamericana de la Salud para la vigilancia de la resistencia bacteriana, que permitirá analizar datos epidemiológicos y las características del germen en estudio.

3.8. Consideraciones éticas

Todos los procedimientos del presente estudio tratan de preservar la integridad y los derechos fundamentales de los pacientes sujetos a investigación, de acuerdo con los lineamientos de las buenas prácticas clínicas y de ética en investigación biomédica. Se garantiza la confidencialidad de los datos obtenidos.

IV. RESULTADOS

Se colectaron un total de 19 aislados de EGB entre noviembre de 2018 y abril de 2019 en el laboratorio de microbiología del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé. Todos fueron procedentes de muestras de orina recolectadas a partir de pacientes de sexo femenino (Los datos completos se muestran en el anexo 3).

Para confirmar la pureza de los aislados, estos fueron sembrados en agar sangre de carnero al 5%, observándose en el 100% de ellos β hemólisis, en la tinción de Gram se observaron cocos gram positivos, todos fueron negativos para la prueba de catalasa; además, positivos a la prueba de CAMP y resistentes a la bacitracina 0,04 U (Figura 6).

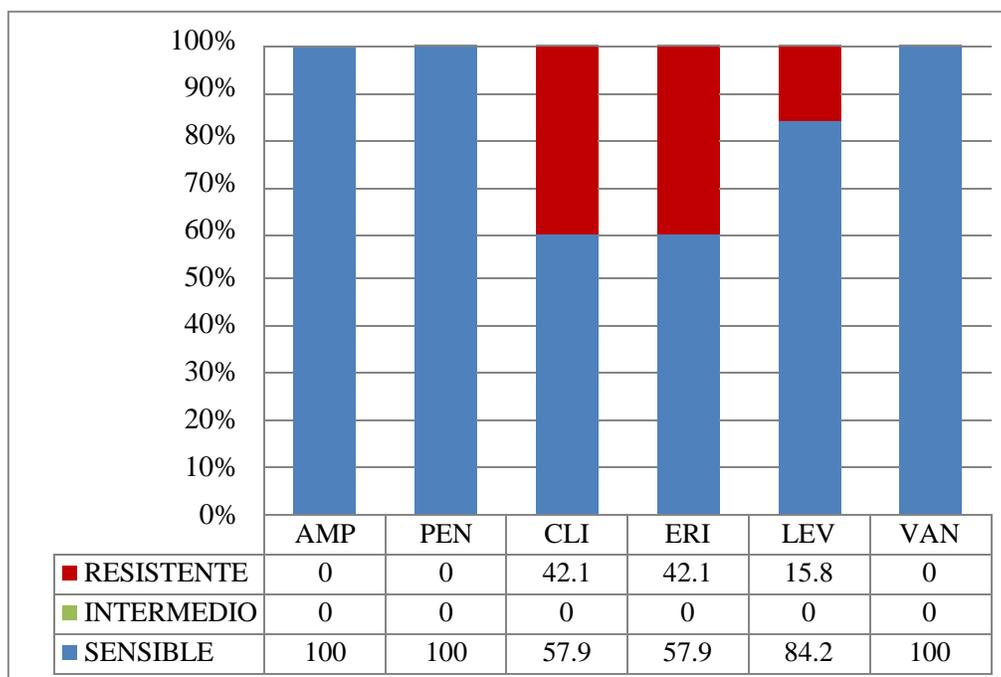


Figura 6. Prueba de CAMP.

A: control negativo CAMP (-); B: aislado 19A-352 CAMP (+)

Fuente: Autoría propia

El perfil de susceptibilidad de los aislados de EGB mostró que 19/19 (100%) fueron sensibles a PE, AMP y VA, 8/19 (42,1%) resistentes a ERI, 8/19 (42,1%) resistentes a CLI y 3/19 (15,8%) resistente a LEV (Figura 7).



AMP: ampicilina; PEN: penicilina, CLI: clindamicina, ERI: eritromicina, LEV: levofloxacino y VAN: vancomicina.

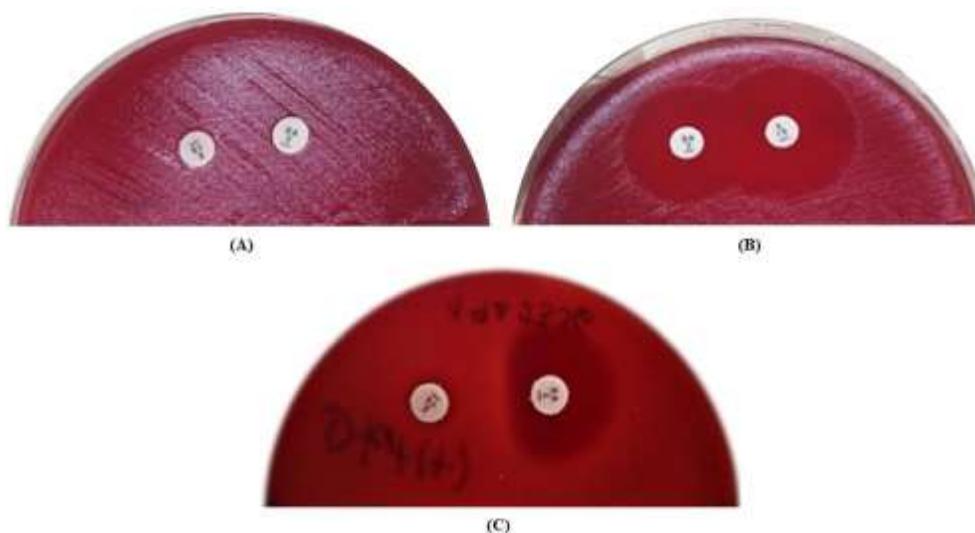
Figura 7. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos en los aislamientos de EGB.

Fuente: Autoría propia

La prueba fenotípica D-test mostró que 11/19 (57,9%) eran de fenotipo sensible, 7/19 (36,8%) fenotipo cMLSb, 1/19 (5,3%) fenotipo iMLSb con D-test (+). El fenotipo M y L no fueron observados. En la figura 8 se puede observar los fenotipos detectados en los aislados.

Caracterización molecular de genes de resistencia

El análisis por PCR reveló que 6/19 (31,6%) eran positivos al gen *ermB*, 3/19 (15,8%) positivos a gen *ermTR* y 1/19 (5,3%) positivo a gen *mefA*. 2 aislados fueron positivos para dos genes; uno para genes *ermB - mefA* y otro para *ermB - ermTR* (Tabla 8). Las bandas correspondientes a los genes se pueden visualizar en las figuras 9, 10 y 11.



Discos de antibióticos usados: E: eritromicina (15 µg); DA: clindamicina (2 µg).

Figura 8. Fenotipo D-test en Streptococcus agalactiae.

(A) ERI y CLI resistente, diámetro de inhibición 6 mm, D-test negativo (fenotipo cMLSb).

(B) ERI y CLI sensibles, diámetro de inhibición ≥ 21 mm, D-test negativo. (C) ERI y

CLI resistente (informe clínico), D-test positivo (fenotipo iMLSb).

(B) Fuente: Autoría propia.

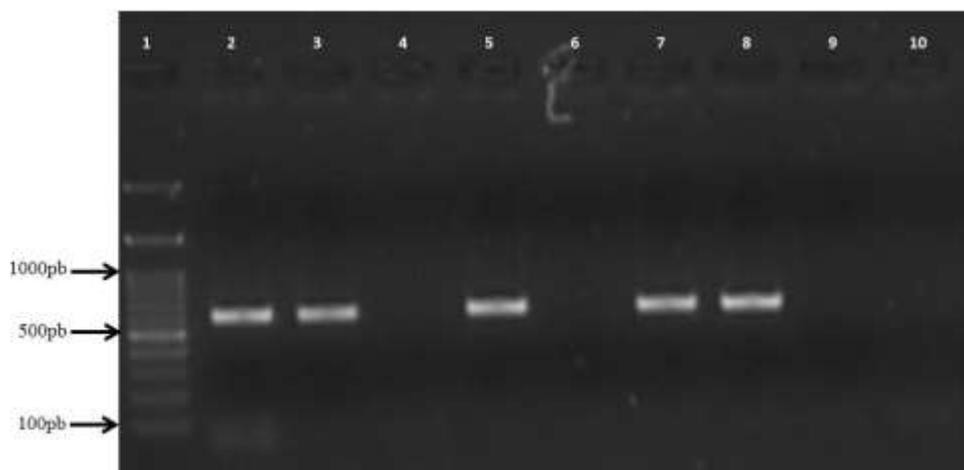


Figura 9. Gel de agarosa 1,5% de la corrida electroforética de la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del gen ermB (639pb) en los aislados de EGB.

Carril 1: marcador de peso molecular de 100pb; carril 2: control positivo; carril 3,5,7 y 8: aislados positivos; carril 4,6 y 9: aislados negativos; carril 10: control negativo.

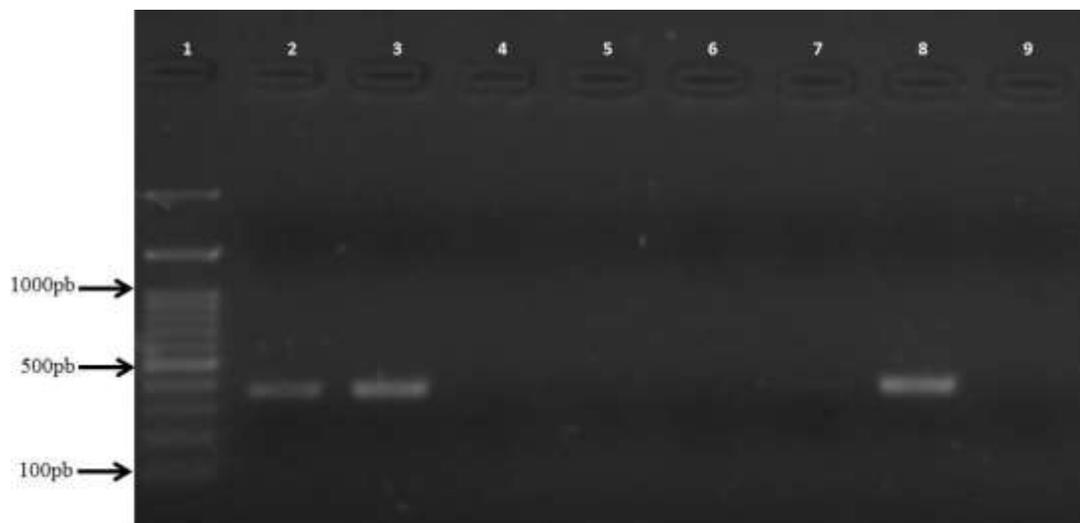


Figura 10. Gel de agarosa 1,5% de la corrida electroforética de la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del gen *ermTR* (385pb) en los aislados de EGB. Carril 1: marcador de peso molecular de 100pb; carril 2: control positivo; carril 3 y 8: aislados positivos; carril 4, 5, 6 y 7: aislados negativos; carril 9: control negativo.

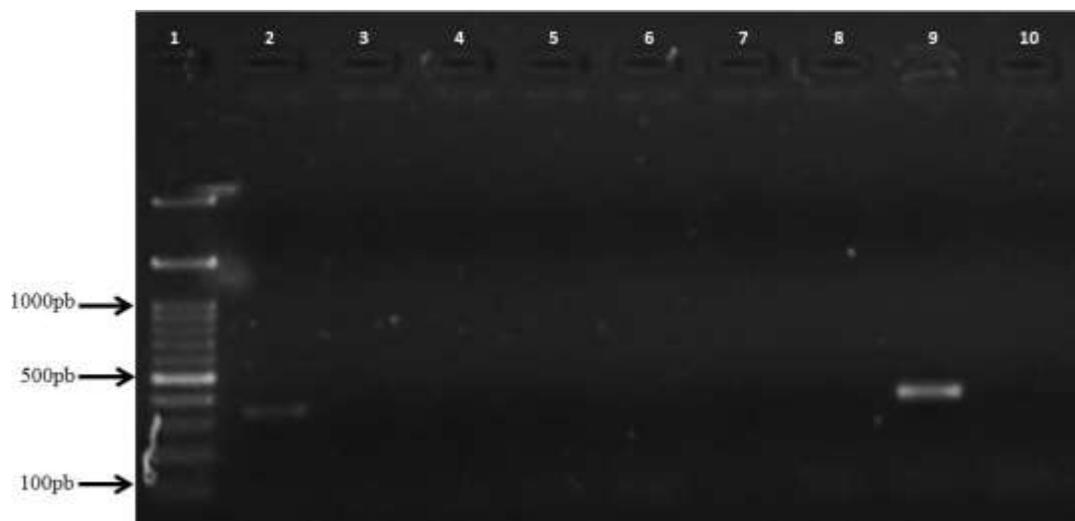


Figura 11. Gel de agarosa 1,5% de la corrida electroforética de la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del gen *mefA* (345pb) en los aislados de EGB. Carril 1: marcador de peso molecular de 100pb; carril 2: control positivo; carril 9: aislado positivo; carril 3,4, 5, 6, 7 y 8: aislados negativos; carril 10: control negativo.

Tabla 8.
Fenotipos y genotipos de los aislamientos de EGB.

Fenotipo	D-test	N	%	Genotipo	N	%
Sensible	-	11	57,9	Ninguno	11	57,9
M	-	0	0	Solo <i>mefA</i>	0	0
iMLSb (inducible)	+	1	5,3	<i>ermTR + mefA</i>	1	5,3
cMLSb (constitutivo)	-	7	36,8	Solo <i>ermB</i>	5	26,3
				<i>ermB + ermTR</i>	1	5,3
				Solo <i>ermTR</i>	1	5,3

Fuente: Autoría propia

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

PE es el fármaco de elección en el tratamiento de la infección causada por EGB o para la PAI, el cual está incluido en las pautas de detección de EGB (ACOG, 2020). Además se ha descrito en varios estudios que EGB se caracteriza por ser sensible a la PE, como los de Liébana-Martos et al., 2015, Bolukaoto et al., 2015, Nasri, Chehrei y Manavi, 2013, Nakamura et al., 2011, los que concuerdan con este estudio, donde se obtuvo un 100% de sensibilidad a PE.

En cuanto al perfil de susceptibilidad frente a macrólidos y lincosamidas en EGB los resultados en este estudio muestran que el 42,1% (8/19) fueron resistentes tanto a ERI como CLI. Estos porcentajes fueron mayores que los observados en España en el estudio de Campelo et al. (2012), en el que reportaron de 300 aislados de EGB causantes de infecciones, resistencias a ERI de 26% y CLI de 23% y aquellos reportados por De la Cruz et al. (2007) en Estados Unidos de un total de 100 aislados de EGB una resistencia de 29% tanto para ERI como para CLI. Liébana-Martos et al. (2015) en España reportó tasas de resistencia a ERI de 8,3% y a CLI de 4,1% en 24 aislados de EGB de neonatos y una resistencia a ERI y CLI de 16,5% y 10,1% respectivamente, en 188 aislados de EGB de gestantes. En el estudio de Eskandarian et al. (2015) en Malasia de 103 aislados de EGB, mostraron resistencias de 23% y 18% a ERI y CLI respectivamente. Y en la investigación de Bolukaoto et al. (2015) en Sudáfrica reportaron resistencia a ERI de 21% y CLI de 17% en 128 aislados de EGB de mujeres gestantes.

En investigaciones dentro de Latinoamérica se han descrito porcentajes de resistencia a ERI y CLI menores a los encontrados en este estudio, como es el trabajo de Abarzúa et al. (2011) en Chile en 100 aislados de EGB de mujeres gestante, donde reportó resistencias de 17% y 13% a ERI y CLI, respectivamente. También los reportados en Colombia por Duque et al. (2011) donde determinaron una resistencia a ERI y CLI del 28% en 50 aislados de EGB en gestantes; en Brasil,

los datos reportados por Nakamura et al. (2011), donde mostraron resistencias a ERI de 11% y a CLI de 5% en 100 aislados de muestras causantes de infecciones y colonizaciones en adultos no gestantes; en Argentina el estudio de Oviedo et al. (2013) reportó resistencias a ERI de 11,6% y a CLI de 1,8% de un total de 112 aislados; y nuevamente en Brasil con lo reportado por Dutra et al. (2014) de 434 aislados de EGB con resistencias a ERI de 4,1% y de 3% a CLI, de aislamientos invasivos y no invasivos claramente inferiores a los encontrados en nuestro estudio; en Argentina con los estudios de Laczeski et al. (2014a) donde reporta una resistencia a ERI de 21,4% de 14 aislados de EGB serotipo V y Villar et al. (2013) que mostró una resistencia a ERI de 27,5% y a CLI de 30,3% de 142 aislados de EGB, valores más altos a los reportados por Oviedo et al. (2013) un año anterior en el mismo país; en Colombia, Crespo-Ortiz et al. (2014) en su estudio de 17 años, evidenciaron una resistencia a ERI de 2,8% y a CLI de 5,2% en el periodo de 1994-2001 y resistencias a ERI de 12,5% y a CLI de 9,4% durante el periodo de 2004-2012, donde se pudo observar el incremento de las tasas de resistencia a través de los años. Aunque, siguen siendo menores a los obtenidos en este trabajo.

Sin embargo, los resultados de esta investigación se aproximan a los encontrados en el estudio de Back, O'Grady y Back J. (2012), donde se encontraron valores de 38,4% de resistencia a CLI y 50,7% a ERI en 688 cultivos positivos para EGB de mujeres gestantes; a los reportados por DiPersio, L. y DiPersio, J. (2006), en 200 aislados con tasas de 54% y 33% de resistencia a ERI y CLI respectivamente.

En el trabajo de Jalalifar et al. (2019), determinaron en orinas procedentes de pacientes con infección del tracto urinario (100 aislados de EGB) resistencia a ERI (52%) y CLI (47%), datos similares a los obtenidos en este trabajo con 48,4% y 54,8% de resistencia a ERI y CLI respectivamente, en las muestras de orina de pacientes con infección del tracto urinario.

En este estudio el fenotipo predominante fue el cMLSb, presente en el 87,5% (7/8), de los aislados resistentes a macrólidos y lincosamidas, también descritos en trabajos previos, en algunos casos no con la misma frecuencia, pero sí como el principal fenotipo detectado, Campelo et al. 81% (63/78), De la Cruz et al. 79% (79/100), Duque et al. 86% (12/14), Back et al. 90% (94/105), Dutra et al. 72% (13/18), Liébana-Martos et al. 61% (20/31).

En cuanto al análisis genotípico de este estudio, el mecanismo de resistencia predominante es la producción de metilasa, mayoritariamente por el gen *ermB* en 75% (6/8) el cual es similar a lo reportado por Bergal et al. en Francia con una frecuencia de 76% (28/37); De la Cruz et al. en Estados Unidos en un 72% (72/100), Campelo et al. en España con un 82% (64/78), Di Persio et al. en Estados Unidos en un 60% (28/50), Bolukaoto et al. en Sudáfrica en 93% (27/29), casi en una totalidad de aquellos aislados resistentes a ERI y CLI. Por el contrario, en el estudio de Dutra et al. en Brasil el gen *ermA* fue el más frecuente, aunque en una baja frecuencia 39% (7/18) seguido del gen *ermB* en 28% (5/18). En lo reportado por Nakamura et al. en Brasil, también se puede observar que el gen *ermA* 73% (11/15) fue el más frecuente dentro de sus aislamientos resistentes e intermedios a ERI.

En *Streptococcus* spp. el fenotipo MLSb generalmente está mediado por genes de clase *ermA/ermB*. El gen *ermTR* fue descrito por primera vez en Finlandia por Kataja et al. en estreptococos del grupo A (Kataja, Huovinen y Seppala, 2000). La secuencia de nucleótidos de *ermTR* es 83% idéntica a la de *ermA* descrita en *Staphylococcus aureus* y en estafilococos coagulasa negativos, y desde el año 99 se incluyó entre la denominación *ermA* (Roberts et al., 1999). En nuestra población bacteriana, el aislado que tuvo un fenotipo de resistencia iMLSb albergaba el gen *ermTR*.

Dentro de nuestro país son pocos los estudios en relación a EGB y sus niveles de resistencia. Podemos mencionar a Tamariz et al. (2004), en su estudio sobre colonización, presenta una resistencia de 11.5% a ERI. Recientemente, se ha descrito un incremento en los aislamientos de EGB, como es el caso del estudio de Pulido y Soto (2019) donde en urocultivos recuperados entre 2010 y 2018 se observa un incremento del 1,6% a 5,6%. Estos datos demuestran que es necesario conocer los perfiles de susceptibilidad a los antimicrobianos de esta bacteria en nuestro país; y que su aislamiento ha ido en incremento en los últimos años tanto en gestantes como en pacientes adultos mayores y adultos no gestantes.

Uno de los mecanismos de resistencia frente a lincosamidas es el gen *lnu*, que en este estudio no fue investigado debido a su baja frecuencia, como lo demuestra el trabajo de Famiglietti et al. (2004). Este gen *lnu* tiene la capacidad de inactivar a las lincosamidas ya que codifica enzimas nucleotidil-tranferasas que inactivan a estos antibióticos (Faccone et al., 2010). Este gen es altamente asociado al fenotipo L que se caracteriza por la sensibilidad a ERI y la resistencia a lincosamidas (Villar y Jugo, 2013).

VI. CONCLUSIONES

- El 100% de los 19 aislados de EGB que fueron colectados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño “San Bartolomé”, son fenotípicamente cocos gram positivos, beta hemolíticos, catalasa negativa, con presencia del factor CAMP y resistentes a la bacitracina 0,04 U.
- En todos los aislamientos estudiados se pudo determinar que el 100% fueron susceptibles a la PE y AMP, que son drogas sugeridas de primera línea para la profilaxis intraparto.
- Se observaron altos niveles de resistencia en ERI y CLI (42,1%).
- El fenotipo más frecuentemente detectada fue el cMLSb (36,8%) entre los aislados con resistencia a ERI y CLI.
- El gen de resistencia más frecuentemente detectado fue el *ermB* (31,6%) en los aislados que presentaban resistencia a ERI y CLI.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de vigilancia de colonización de portadores de EGB en gestantes.
- Continuar con los estudios de susceptibilidad con un número mayor de aislamientos, en diferentes centros de salud.
- Es importante realizar la prueba de D-test por disco difusión para todos los aislamientos de EGB. Complementario a los resultados obtenidos en equipos automatizados.
- Se deberían investigar las distintas familias del gen *erm* presentes en EGB, no analizados en este estudio, en aislados que presenten resistencias a lincosamidas y macrólidos.
- Además, es necesario incluir la investigación del gen *lnu*, ya que se ha reportado la presencia de este gen en Latinoamérica, aunque en bajos niveles.
- Para complementar este estudio se debería realizar una investigación sobre los serotipos capsulares que se encuentran distribuidos en nuestro país ya que son escasos los estudios en relación a este tema.

VIII. REFERENCIAS

- Abarzúa, F., Arias, A., García, P., Ralph, C., Cerda, J., Riedel, I., y Gárate, C. (2011). Aumento de resistencia de *Streptococcus agalactiae* vaginal-anal en el tercer trimestre de gestación a eritromicina y clindamicina al cabo de una década de tamizaje universal. *Revista Chilena de Infectología*, 28(4), 334–337. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182011000500005>.
- Adwan, K. (2014). Fast DNA isolation and PCR protocols for detection of methicillin-resistant staphylococci. *Folia Microbiologica*, 59, 5–8. <http://doi.org/10.1007/s12223-013-0259-1>.
- Alfa, M. J., Sepehri, S., De Gagne, P., Helawa, M., Sandhu, G., y Harding, G. K. M. (2010). Real-time PCR assay provides reliable assessment of intrapartum carriage of group B *Streptococcus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), 3095–3099. <http://doi.org/10.1128/JCM.00594-10>.
- Arana, D. M., Rojo-Bezares, B., Torres, C., y Alós, J. I. (2014). First clinical isolate in Europe of clindamycin-resistant group B *Streptococcus* mediated by the *lnu(B)* gene. *Revista Española de Quimioterapia: Publicación Oficial de La Sociedad Española de Quimioterapia*, 27(2), 106–9.
- Back, E., O'Grady, E., y Back, J. (2012). High Rates of Perinatal Group B *Streptococcus* Clindamycin and Erythromycin Resistance in an Upstate New York Hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56 (2) 739-742; doi: 10.1128/AAC.05794-11.

- Bergal, A., Loucif, L., Benouareth, D. E., Bentorki, A. A., Abat, C., & Rolain, J. M. (2015). Molecular epidemiology and distribution of serotypes, genotypes, and antibiotic resistance genes of *Streptococcus agalactiae* clinical isolates from Guelma, Algeria and Marseille, France. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 34(12), 2339–2348. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2487-6>
- Bergh, K., Stoelhaug, A., Loeseth, K., y Bevanger, L. (2004). Detection of group B streptococci (GBS) in vaginal swabs using real-time PCR with TaqMan probe hybridization. *The Indian journal of medical research*, 119 Suppl. 221-3.
- Bolukaoto, J., Monyama, C., Chukwu, M., Lekala, S., Nchabeleng, M., Maloba, M.,...Moyo, S. (2015). Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women in Garankuwa, South Africa. *BMC Research Notes*, 8, 364. doi:10.1186/s13104-015-1328-0.
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., y Mietzner, T. (2011). *Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología médica* (25a ed.). México DF. Mc Graw Hill Education.
- Brunton, L., Lazo, S., Parker, L. (2006). *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la Terapéutica* (11ª ed.). Estados Unidos. McGraw Hill.
- Buxton, R. (2005). Blood agar plates and hemolysis: *Streptococcus* and other catalase negative gram-positive cocci. [Internet]. *American Society for Microbiology*. Disponible en: <https://www.asmscience.org/content/education/imagegallery/image.2881>.
- Campelo, F.A., Pedrosa, A.C., Antúnez, I.Á., y Capuz, B.L. (2012). Phenotypes and Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides in *Streptococcus agalactiae* Isolates with

- Clinical Significance in an Eight-Year Period (2002-2010). *Revista Española de Quimioterapia*, 25(1).
- Centers for Disease Control and Prevention. (2010). Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. *Mmwr*, 59(No. RR-10),1–32.
- Chaiwarith, R., Jullaket, W., Bunchoo, M., Nuntachit, N., Sirisanthana, T., y Supparatpinyo, K. (2011). *Streptococcus agalactiae* in adults at Chiang Mai University Hospital: a retrospective study. *BMC infectious diseases*. doi: 10.1186/1471-2334-11-149.
- Christie, R., Atkins, N.E., y Munch-Petersen, E. (1994). A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Aust J Exp Biol Med Sci*; 22: 197-200.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement, 35, M100-S29, 2019.
- Cools, P. y Melin, P. (2017). Group B Streptococcus and perinatal mortality. *Research in Microbiology*, 168(9-10), 793–801.
- Crespo-Ortiz, M.P., Henao-Giraldo, E.A., Espitia, L.M., y Herrera-Jaramillo, M.H. (2012). “Colonización por *Streptococcus agalactiae* en mujeres gestantes de los centros de atención de la ESE Norte en Cali”. *Ciencia&Salud*; p1(2):23-31.
- 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, 428.
- Dahesh, S., Hensler, M.E., Van Sorge, N.M., Gertz, Jr. R.E., Schrag. S., Nizet, V., y Beal B.W. (2008). Point mutation in the group B streptococcal pbp2x gene conferring decreased susceptibility to b-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*; 52:2915-8. doi: 10.1128/AAC.00461-08.

- De la Cruz, W. P., Richardson, J. Y., Broestler, J. M., Thornton, J. A., & Danaher, P. J. (2007). Rapid determination of macrolide and lincosamide resistance in group B streptococcus isolated from vaginal-rectal swabs. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 2007, 46581. <https://doi.org/10.1155/2007/46581>
- De La Rosa, M. y Prieto, J. (2003). *Microbiología en Ciencias de la Salud*. 2 ed. España: Elsevier.
- Di Bartolomeo, S., Gentile, M., Priore, G., Valle, S., y Di Bella, A. (2005). *Streptococcus agalactiae* en embarazadas. Prevalencia en el Hospital Nacional Alejandro Posadas. *Revista Argentina de Microbiología*, 37(3), 142–144.
- Díaz, M., Claver, D., y Pérez, J. (2008). Infecciones por *Streptococcus agalactiae* en un servicio de neonatología abierto. *Rev Cubana Pediatr*, 80(4).
- DiPersio, L.P., y DiPersio, J.R. (2006). High Rates of Erythromycin and Clindamycin Resistance among OBGYN Isolates of Group B Streptococcus. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 54: p 79-82.
- Duque, C.M., Gómez, B., Sánchez, D.M., Uribe, O.L. (2011). Perfil de sensibilidad de *S. agalactiae* obtenido a partir de muestras de introito vaginal y región perineal de mujeres gestantes de Medellín (Colombia). *Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 9 (15): 31-34
- Dutra, V., Alves, V., Olendzki, A., Dias, C., De Bastos, A., Santos, G., y Fracalanza, S. (2014). *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. *BMC Infectious Diseases*, 14(1), 323.
- Edwards, M.S. y Baker, C.J. (2016). *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B). En *Mandell, Douglas, Bennett. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica*. (8ªed.) p. 2467-75. Volumen 2. Barcelona: Elsevier Saunders.

- Emaneini, M., Mirsalehian, A., Beigvierdi, R., Fooladi, A., Asadi, F., Jabalameli, F., y Taherikalani, M. (2014). High Incidence of Macrolide and Tetracycline Resistance among *Streptococcus agalactiae* strains isolated from Clinical Samples in Tehran, Iran. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2), 157–161.
- Eskandarian, N., Ismail, Z., Neela, V., Van Belkum, A., Desa, M., y Amin Nordin, S. (2015). Antimicrobial susceptibility profiles, serotype distribution and virulence determinants among invasive, non-invasive and colonizing *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus) from Malaysian patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34(3), 579–584.
- Faccone, D., Lalonardi, F., Abel, S., Machain, M., Errecalde, L., Littvik, A.,...Corso, A. (2010). “Multiple-Clones of *Streptococcus agalactiae* harbouring InuB gene”. *Journal of Infection in developing countries*, 4(9):580-582.
- Famiglietti, A., Quinteros, M., Pedrari, S., Corso, A., Lopardo, H., Marín, M.,...Soloaga, R. (2004). Actualización del consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en cocos Gram positivos. *Revista Argentina de Microbiología*, 35: 29-40.
- Farley, M.M., Harvey, C., Stull, T., Smith, J.D., Schuchat, A., Wenger, J.D., y Stephens, D.S. (1993). A population-based assessment of invasive disease due to group B Streptococcus in nonpregnant adults. *N Engl J Med*, 328: pp. 1807-1811.
- Forbes, B. A., Sahm, D., y Weissfeld, A. (2009). *Bailey & Scott 's. Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
- García, D. A., Mojica, M. E., Méndez, I. A., Pachón, D. P., Prieto, A. C., y Al., E. (2011). Prevalencia del *Streptococcus agalactiae* en maternas usuarias del Hospital Militar

- Central. Bogotá, (Colombia) año 2010. *Revista Colombiana de Obstetricia Y Ginecología*, v.62 n.4(4), 302–307.
- Gardiner, B., Grayson, M., Wood, G. (2013). Inducible resistance to clindamycin in *Staphylococcus aureus*: validation of Vitek-2 against CLSI D-test. *Pathology* 45:181–184. 10.1097/PAT.0b013e32835ccdda.
- Gosiewski, T., Brzychczy-Wloch, M., y Heczko, P. B. (2012). The application of multiplex PCR to detect seven different DNA targets in group B streptococci. *Folia Microbiologica*, 57(3), 163–167.
- Gunn, B.A. (1976). SXT and Taxo A disks for presumptive identification of group A and B streptococci in throat cultures. *J Clin Microbiol* (4). 192-193.
- Heelan, J., Hasenbein, M., y McAdam, A. (2004). Resistance of group B streptococcus to selected antibiotics, including erythromycin and clindamycin. *Journal of clinical microbiology*, 42(3), 1263–1264.
- Huber, C., McOdimba, F., Pflueger, V., Daubenberger, C., y Revathi, G. (2011). Characterization of Invasive and Colonizing Isolates of *Streptococcus agalactiae* in East African Adults. *Journal Of Clinical Microbiology*, 49(10), 3652-3655. doi: 10.1128/jcm.01288- 11.
- Jalalifar, S., Havaei, S.A., Motallebirad, T., Moghim, S., Fazeli, H., Esfahani, B.N. (2019). Determination of surface proteins profile, capsular genotyping, and antibiotic susceptibility patterns of Group B *Streptococcus* isolated from urinary tract infection of Iranian patients. *BMC research notes*, 12(1): 437. doi:10.1186/s13104-019-4428-4.
- Jaramillo-Jaramillo, A., Cobo-Ángel, C., Moreno-Tolosa, Y., y Ceballos-Márquez, A. (2018). Resistencia antimicrobiana de *Streptococcus agalactiae* de origen humano y bovino. *CES*

Medicina Veterinaria y Zootecnia, 13(1), 62-79. <https://dx.doi.org/10.21615/cesmvz.13.1.5>.

Kataja, J., Huovinen, P., y Seppala, H. (2000). Erythromycin resistance genes in group A streptococci of different geographical origins: the macrolide resistance study group. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:789-792.

Koneman, E. (2008). *Diagnóstico Microbiológico*. Argentina: Editorial Medica Panamericana.

Laczeski, M., Pegels, E., Oviedo, P., Quiroga, M., y Vergara, M. (2013). *Streptococcus agalactiae*, primer estudio en Misiones de genes de resistencia asociados a serotipos capsulares. *Rev. Cienc. Tecnol.*, 20, 68-74.

Laczeski, M., Novosak, M., Quiroga, M., y Vergara, M. (2014a). Primer estudio molecular de *Streptococcus agalactiae* serotipo V en Misiones, Argentina. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología*, 34(4), 132–139.

Laczeski, M., Pegels, E., Oviedo, P., Quiroga, M., y Vergara, M. (2014b). Molecular Profiles and Antimicrobial Susceptibility of First Isolates of *Streptococcus agalactiae* Serotype IX in Argentina. *Advances in Microbiology*, 4, 474-483.

Laczeski, M., Vergara, M., Pegels, E., Oviedo, P., Novosak, M., Soto, P., y Quiroga, M. (2014c). Estudios moleculares de cepas invasivas de *Streptococcus agalactiae* (SGB). *SEM@FORO - Boletín Informativo de la Sociedad Española de Microbiología*; <http://micromolecular.es/project/estudios-moleculares-de-cepas-invasivas-de-streptococcus-agalactiae-sgb/>.

Leszczyński, P., Sokół-Leszczyńska, B., Pietrzak, B., Sawicka-Grzelak, A., y Wielgoś, M. (2017). Erythromycin or Clindamycin - is it Still an Empirical Therapy against

- Streptococcus agalactiae* in Patients Allergic to Penicillin? *Polish Journal of Microbiology*, 66 (2): 265-268.
- Liébana-Martos, M.C., Cabrera-Alavargonzalez, J., Rodríguez-Granger, J., Miranda-Casas, C., Sampedro-Martínez, A., Gutiérrez-Fernández, J.,...Navarro-Marí, J. (2015). Serotipos y patrones de resistencia antibiótica en aislados betahemolíticos de *Streptococcus agalactiae* de madres colonizadas y recién nacidos con enfermedad invasiva. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 33(2):84–88.
- Lin, F.Y., Azimi, P.H., Weisman, L.E., Philips, J.B., Regan, J., Clark, P.,...Gill. V. (2000). Antibiotic Susceptibility Profiles for Group B Streptococci Isolated from Neonates, 1995-1998. *Clin Infect Dis*, 31(1):76-9.
- Lindahl, G., Stålhammar-Carlemalm, M., y Areschoug, T. (2005). Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. *Clin Microbiol Rev*, 18:102-127.
- MacFaddin, J.F. (1980). *Biochemical test for identification of medical bacteria*. In 2nd ed. Williams and Wilkins. Baltimore, 18-36.
- Mandell, G., Bennett, J., y Dolin, R. (2006). *Enfermedades infecciosas: principios y Prácticas*. 6 ed. España: Elsevier.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., y Tenover, M. A. (2014). *Microbiología Médica* (7th ed.). España: Elsevier.
- Nakamura, P., Schuab, R., Neves, F., Pereira, C., Paula, G., & Barros, R. (2011). Antimicrobial resistance profiles and genetic characterisation of macrolide resistant isolates of *Streptococcus agalactiae*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(2), 119–122.

- Nasri, K., Chehrei, A., y Manavi, M. S. (2013). Evaluation of vaginal group B streptococcal culture results after digital vaginal examination and its pattern of antibiotic resistance in pregnant women. *Iranian journal of reproductive medicine*, 11(12), 999–1004.
- Nauto-Ccorihuaman, E. (2019). *Streptococcus agalactiae* en gestantes de 35 a 37 semanas que acuden a control prenatal en el Instituto Nacional Materno Perinatal. *Rev Peru Investig Matern Perinat*; 8(4): 25-29. <https://doi.org/10.33421/inmp.2019170>.
- Nitschke, H., Slickers, P., Müller, E., Ehricht, R., y Monecke, S. (2014). DNA microarray-based typing of *Streptococcus agalactiae* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(11), 3933–3943.
- Nuccitelli, A., Rinaudo, C. D., y Maione, D. (2015). Group B *Streptococcus* vaccine: state of the art. *Therapeutic Advances in Vaccines*, 3(3), 76–90.
- Oviedo, P., Pegels, E., Laczeski, M., Quiroga, M., y Vergara, M. (2013). Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. First study in a province of Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 253–258.
- Palacios-Saucedo, G., Hernández-Hernández, T.I., Rivera, L., Briones, E., Caballero-Trejo, A. Vazquez-Guillen, J.,...Rodríguez-Padilla, C. (2017). Infección perinatal por estreptococo del grupo B: Panorama global, en América Latina y en México. *Gaceta Medica de Mexico*. 153. 361-370.
- Paterson, D. L. y Kim, B. (2009). *Antimicrobial Drug Resistance*. <http://doi.org/10.1007/978-1-60327-595-8>.
- Pinto, T., Costa, N., Vianna Souza, A., Da Silva, L., Corrêa, A., y Fernandes, F. (2013). Distribution of serotypes and evaluation of antimicrobial susceptibility among human and bovine *Streptococcus agalactiae* strains isolated in Brazil between 1980 and 2006. *The*

Brazilian Journal Of Infectious Diseases, 17(2), 131-136. doi: 10.1016/j.bjid.2012.09.006.

Portillo, A., Lantero, M., Zarazaga, M., Gastañares, M.J., Olarte, I., Undabeitia, E., Ruiz-Larrea, F. y Torres, C. (2000). Resistencia a antibióticos macrólidos-lincosamidas-estreptograminas y mecanismos implicados en cepas clínicas de "*Streptococcus*" spp. en *La Rioja. Zubía*, ISSN 0213-4306, Nº 12.

Prevention of Group B Streptococcal Early-Onset Disease in Newborns: ACOG Committee Opinion, Number 797. *Obstet Gynecol.* 2020; 135(2): e51-e72. doi:10.1097/AOG.0000000000003668.

Puertas-Prieto, A., Lara-Oya, A., Liébana Martos, C., Rodríguez-Granger, J., Cobo, F., Sampedro, A.,...Navarro-Mari, J. (2017). *Streptococcus agalactiae*: prevención y desarrollo de vacunas. *Revista Española de Quimioterapia*, 30(5), 312-318.

Pulido, A. y Soto, J. (2019). Incremento de aislamientos de *Streptococcus agalactiae* en cultivos de orina en un hospital materno-infantil de Lima, Perú. *Anales de la Facultad de Medicina*, 80(2), 266-267.

Remington, J. y Klein, J. (1995). *Infectious Diseases of the fetus and newborn*. 4 ed. Saunders: USA.

Roberts, M. C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L.B., Rood, J. y Seppala, H. (1999). Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2823-2830.

Rubio, M. y Sanchez, G. (2016). Frecuencia de *Streptococcus agalactiae* en secreción vaginal y zona ano-rectal en gestantes atendidas en el Hospital Nacional Cayetano Heredia, en el

- periodo de enero a mayo del 2016 [Tesis de pregrado]. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima.
- Shabayek, S. y Spellerberg, B. (2018). Group B Streptococcal Colonization, Molecular Characteristics, and Epidemiology. *Front. Microbiol.* 9:437. doi:10.3389/fmicb.2018.00437.
- Tamariz, J., Obregon, M., Jara, J., Diaz, J., Jefferson, L. y Guerra, H. (2004). Colonización vaginal y anorectal por *Streptococcus agalactiae* en gestantes de los Hospitales Nacionales Cayetano Heredia y Arzobispo Loayza. *Revista Médica Herediana*, 15(3), 144-150.
- Tamariz, J., Cruz, J., Atencia, A., Figueroa, J., Horna, G., Guerra, H. (2009). Resistencia a clindamicina inducida por eritromicina en *Staphylococcus aureus* aislados de tres hospitales de Lima, Perú. *Acta Médica Peruana*, 26: 12-16.
- Torres, C. y Cercenado, E. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de cocos grampositivos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*. 28(8). 541-553.
- Uh, Y., Hwang, G.Y., Jang, I.H., Cho, H.M., Noh, S.M., Kim, H.Y., Kwon, O. y Yoon, K.J. (2007). Macrolide Resistance Trends in β -Hemolytic Streptococci in a Tertiary Korean Hospital. *Yonsei Med J.* 48: p 773-778.
- Ulett, G., Webb, R., Ulett, K., Cui, X., Benjamin, W., Crowley, M. y Schembri, M. (2010). Group B *Streptococcus* (GBS) urinary tract infection involves binding of GBS to bladder uroepithelium and potent but GBS-specific induction of interleukin 1alpha. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(6), 866–870. doi:10.1086/650696.

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

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

IX. ANEXOS

ANEXO 1

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS MICROBIOLÓGICO Y MOLECULAR

I) DATOS MICROBIOLÓGICOS DE *Streptococcus agalactiae*

1. Muestra clínica:

Urocultivo () Hemocultivo () Secreciones (): _____

Hisopado Rectal () otros: _____

2. Fecha de aislamiento e identificación: _____ Código _____

3. Método de identificación:

Manual () Sistema automatizado Vitek ()

4. Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas en estudio:

Antibióticos	MIC	S	I	R
Ampicilina				
Penicilina				
Levofloxacino				
Eritromicina				
Clindamicina				
Vancomicina				

5. Fenotipo:

D-test Positivo () D-test Negativo ()

II) RESULTADO DE PRUEBA MOLECULAR:

Prueba PCR para genes	Resultado PCR (+/-)	Producto (pb)	Observaciones
<i>ermB</i>			
<i>ermTR</i>			
<i>mefA</i>			

ANEXO 2

Operacionalización de variables

VARIABLE	TIPO	ESCALA DE MEDICION	INDICADOR VALORACION
V. DEPENDIENTE			
Genes de resistencia	Cuantitativa	Nominal	Nº, %
	Politómica	<i>ermB, ermTR, mefA</i>	
Fenotipo de resistencia	Cuantitativa	Nominal	Nº, %
	Politómica	Sensible, M, cMLSb, iMLSb	
Perfil de susceptibilidad	Cuantitativa	Nominal	Nº, %
	Politómica	Sensible, Intermedio, Resistente	
V. INDEPENDIENTE			
<i>S. agalactiae</i>	Categorica-cualitativa	Nominal	Nº, %
	Dicotómica	Presencia Ausencia	

ANEXO 3 Consolidado de resultados

CÓDIGOS DE MUESTRAS	Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL)								D-TEST				FENOTIPO DE RESISTENCIA		GENES DE RESISTENCIA						
	AMP		PEN		CLJ		ERY		LVX		VAN		Eritromicina (15µg)		Clindamicina (2µg)		Resultado	FENOTIPO DE RESISTENCIA	erm B	erm TR	mef A
19A1423	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	<=0,25	<=0,25	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	22	S	S	20	S	-	S	-	-	-	
19A1433	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	<=0,25	<=0,25	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	24	S	S	21	S	-	S	-	-	-	
19A1474	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	0,5	<=0,5	<=0,25	<=0,25	0,5	<=0,5	25	S	S	21	S	-	S	-	-	-	
19A2356	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	>=8	<=0,5	<=0,25	<=0,25	>=8	<=0,5	6	R	R	20	R	+	iMLSb	-	+	+	
19A2620	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	24	S	S	22	S	-	S	-	-	-	
19A2664	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	26	S	S	22	S	-	S	-	-	-	
19A3027	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	>=8	<=0,5	<=0,25	<=0,25	2	<=0,5	6	R	R	6	R	-	cMLSb	+	-	-	
19A3032	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	>=8	<=0,5	<=0,25	<=0,25	>=8	<=0,5	11	R	R	6	R	-	cMLSb	-	+	-	
19A3058	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	25	S	S	21	S	-	S	-	-	-	
19A3262	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	>=8	<=0,5	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	6	R	R	6	R	-	cMLSb	+	-	-	
19A3330	<=0,25	<=0,12	1	1	1	<=0,5	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	6	R	R	6	R	-	cMLSb	+	-	-	
19A3367	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	26	S	S	23	S	-	S	-	-	-	
19A3474	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	>=8	<=0,5	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	12	R	R	6	R	-	cMLSb	+	-	-	
19A352	<=0,25	<=0,12	1	1	0,5	<=0,5	<=0,25	<=0,25	0,5	<=0,5	6	R	R	6	R	-	cMLSb	+	-	-	
19A3734	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	25	S	S	23	S	-	S	-	-	-	
19A3816	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	21	S	S	23	S	-	S	-	-	-	
19A3830	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	>=8	<=0,5	<=0,25	<=0,25	>=8	<=0,5	6	R	R	6	R	-	cMLSb	+	+	+	
19A3870	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	27	S	S	24	S	-	S	-	-	-	
19A3896	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	0,5	<=0,5	<=0,25	<=0,25	0,5	<=0,5	26	S	S	24	S	-	S	-	-	-	