

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO  
DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD (SELADIS)



**VALIDACIÓN DEL CULTIVO DE *Streptococcus agalactiae*  
EN MEDIO CROMOGÉNICO PARA LA DETECCIÓN DE COLONIZACIÓN  
VAGINO-RECTAL EN MUJERES EMBARAZADAS**

Tesis de grado para obtener el título de especialista

POR: ARIANA GRACIELA CARNERO URRESTI

TUTORA: DRA. RAQUEL CALDERÓN MORALES

LA PAZ-BOLIVIA

2019

## **Dedicatoria**

*A mis padres, por su amor y apoyo incondicional.*

## ÍNDICE

RESUMEN	
I.INTRODUCCIÓN. ....	1
II.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	3
III.JUSTIFICACIÓN. ....	5
IV.PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	8
V.OBJETIVOS. ....	9
A. OBJETIVO GENERAL.....	9
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
VI.HIPOTESIS.....	10
VII.ANTECEDENTES.....	11
VIII.MARCO TEÓRICO.....	18
A. Características generales del <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	18
B. Factores de virulencia .....	19
C. Influencia de la microbiota vaginal en la colonización por EGB .....	22
D. Epidemiología de la colonización por EGB durante la gestación.....	24
E. Enfermedades clínicas.....	25
1. Enfermedad en el recién nacido y el lactante. ....	25
a. Enfermedad neonatal de inicio temprano.....	26
b. Enfermedad neonatal de inicio tardío .....	29
2. Enfermedad en adultos .....	30
a. Enfermedad relacionada al embarazo .....	30

b. Enfermedad no relacionada al embarazo .....	31
F. Factores de riesgo.....	32
G. Métodos de diagnóstico.....	33
1. Obtención de la muestra .....	34
2. Medios de cultivo .....	35
a. Agar sangre de carnero .....	36
b. Medios cromogénicos .....	37
c. Otros medios de cultivo .....	39
3. Identificación.....	39
a. Test de CAMP.....	40
b. Sensibilidad a la bacitracina.....	40
c. Sensibilidad a sulfametoxazol trimetoprim.....	41
d. Prueba de bilis esculina.....	41
e. Otras pruebas de identificación.....	41
4. Técnicas de biología molecular .....	44
5. Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.....	45
H. Tratamiento .....	46
I. Prevención.....	49
IX.DISEÑO METODOLÓGICO.....	52
A. Tipo o diseño de estudio. ....	52
B. Sitio o contexto del estudio. ....	52
C. Universo y población o muestra.....	52
D. Tamaño de la muestra .....	53

E. Descripción de las técnicas y procedimientos más importantes .....	54
1. Preparación de medios de cultivo. ....	54
2. Obtención de muestras. ....	55
3. Procesamiento de las muestras. ....	58
a. Enriquecimiento selectivo en Caldo Todd Hewitt .....	58
b. Cultivo en agar sangre y CHROMagar Strep B.....	58
c. Identificación .....	60
d. Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos.....	64
4. Control de calidad.....	64
5. Análisis estadístico .....	64
6. Aspectos bioéticos .....	67
X.RESULTADOS .....	68
XI.DISCUSIÓN .....	75
XII.CONCLUSIONES .....	87
XIII.RECOMENDACIONES .....	89
XIV.PERSPECTIVAS FUTURAS .....	90
XV.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	91

ANEXOS

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla N° 1.</b> Cultivo de hisopados vaginal y rectal para <i>Streptococcus agalactiae</i> en CHROMagar Vs Agar Sangre de carnero. ....	68
<b>Tabla N° 2.</b> Parámetros estadísticos de validación del cultivo de muestras vaginales y rectales en CHROMagar Strep B vs Agar Sangre de carnero. ....	69
<b>Tabla N° 3.</b> Cultivo de hisopados vaginal para <i>Streptococcus agalactiae</i> en CHROMagar Vs Agar Sangre de carnero. ....	70
<b>Tabla N° 4.</b> Parámetros estadísticos de validación del cultivo de muestras vaginales en CHROMagar Strep B vs Agar Sangre de carnero. ....	71
<b>Tabla N° 5.</b> Cultivo de hisopados rectales para <i>Streptococcus agalactiae</i> en CHROMagar Vs Agar Sangre de carnero. ....	72
<b>Tabla N° 6.</b> Parámetros estadísticos de validación del cultivo de muestras rectales en CHROMagar Strep B vs Agar Sangre de carnero. ....	73
<b>Tabla N° 7.</b> Comparación de los parámetros estadísticos de validación del cultivo de muestras de hisopado vagino-rectal, vaginal y rectal en CHROMagar Strep B vs Agar Sangre de carnero. ....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura N°1.</b> Procedimiento para la toma de muestra de hisopado vaginal.....	56
<b>Figura N°2.</b> Procedimiento para la toma de muestra de hisopado rectal.....	57
<b>Figura N°3.</b> Características morfológicas de las colonias de <i>Streptococcus agalactiae</i> en Agar sangre de carnero.....	59
<b>Figura N°4.</b> Características morfológicas de las colonias de <i>Streptococcus agalactiae</i> en CHROMagar Strep B. ....	60
<b>Figura N°5.</b> Pruebas de identificación realizadas a las colonias con características morfológicas de <i>Streptococcus agalactiae</i> desarrolladas en Agar sangre y CHROMagar StrepB.....	61
<b>Figura N°6.</b> Flujograma diagnóstico de las pruebas de identificación realizadas a las colonias con características morfológicas de <i>Streptococcus agalactiae</i> desarrolladas en Agar sangre y CHROMagar Strep B.....	62
<b>Figura N°7.</b> Flujograma diagnóstico para el procesamiento de muestras. ....	63

## **ÍNDICE DE ANEXOS**

**Anexo 1:** Hoja de Información a la paciente

**Anexo 2:** Consentimiento informado

**Anexo 3:** Código interno del laboratorio para identificar las muestras

**Anexo 4:** Procedimiento de las pruebas utilizadas para la identificación de *Streptococcus agalactiae*.

**Anexo 5:** Prueba de sensibilidad para *Streptococcus agalactiae*.



## GLOSARIO DE TÉRMINOS

**Agar cromogénico:** medio de cultivo sólido que se basa en el uso de cromógenos (moléculas solubles incoloras) compuestas por un sustrato y un cromóforo. Cuando la enzima del organismo blanco cliva el conjugado cromogénico se libera el cromóforo exhibiendo su color distintivo y forma un precipitado.

**Beta-hemólisis:** Halo de transparencia que se observa en un cultivo de agar sangre alrededor de la zona de crecimiento de ciertas colonias bacterianas ocasionado por la hemólisis completa de los eritrocitos.

**Colonización:** Entrada y persistencia de bacterias sin causar enfermedad en el hospedero.

**Especificidad:** parámetro de validez de una prueba. Capacidad para identificar correctamente a quienes no tienen la enfermedad que se pretende diagnosticar o descartar.

**Estudios de validación:** Investigaciones que utilizan procesos por los que se establece la confiabilidad y relevancia de un procedimiento para un propósito específico.

**Prevalencia:** Número de casos de enfermedad o de personas enfermas, o de cualquier otro fenómeno (ej.: accidentes) registrados en una población determinada, sin distinción entre casos nuevos y antiguos.

**Razón de verosimilitud (likelihood ratio):** razón entre la posibilidad de observar un resultado en los pacientes con la enfermedad en cuestión versus la posibilidad de ese resultado en pacientes sin la patología.

**Razón de verosimilitud positiva (likelihood ratio +):** probabilidad de que una persona con la enfermedad tenga un resultado positivo para esa enfermedad dividido entre la probabilidad que una persona sin la enfermedad tenga un resultado positivo para esa enfermedad.

**Razón de verosimilitud negativa (likelihood ratio -):** probabilidad de que una persona con la enfermedad tenga un resultado negativo para esa enfermedad dividido entre la probabilidad que una persona sin la enfermedad tenga un resultado negativo para esa enfermedad.

**Sensibilidad:** Prueba de validez para identificar correctamente a los sujetos enfermos o proporción de individuos enfermos, identificados como tal por el examen.

**Transmisión vertical:** Transferencia de una infección materna a su descendencia en la gestación, en el parto o en el periodo perinatal.

**Valor predictivo positivo:** En pruebas de diagnóstico, la probabilidad de que una persona con un test positivo sea un real positivo (es decir, tenga la enfermedad).

**Valor predictivo negativo:** es la probabilidad de que la persona con una prueba negativa no tenga la enfermedad.

## LISTA DE SIGLAS Y ABREVIACIONES

**ATCC:** American type culture collection.

**CAMP:** Test de Christie- Atkins- Munch-Peterson.

**CDC:** Centers for disease control and prevention. (Centros para el control y prevención de enfermedades).

**CLSI:** Clinical and laboratory standards institute. (Instituto de normas clínicas y de laboratorio).

**EGB:** Estreptococo del grupo B.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno.

**NaOH:** Hidróxido de sodio.

**PAI:** Profilaxis antibiótica intraparto.

**PYR:** pirrolidonil arilamidasa.

**RVP:** Razón de verosimilitud positiva.

**RVN:** Razón de verosimilitud negativa.

**SELADIS:** Servicio de laboratorio de diagnóstico e investigación en salud.

**SXT:** Sulfametoxazol/Trimetoprim.

**VPP:** Valor predictivo positivo.

**VPN:** Valor predictivo negativo.

## RESUMEN

*Streptococcus agalactiae* es una bacteria gram positiva que coloniza el tracto genitourinario y gastrointestinal de humanos; en mujeres embarazadas la colonización por esta bacteria conlleva el riesgo de transmisión vertical hacia el recién nacido convirtiéndose en un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad neonatal de inicio temprano. En el departamento de La Paz Bolivia, hasta la fecha, no se conoce la situación actual de este problema ni se cuenta con la metodología específica para el aislamiento e identificación de esta bacteria a partir de muestras vagino-rectales. Por este motivo la presente tesis desarrolla un estudio de Test diagnóstico con el objetivo de validar el método de cultivo en agar cromogénico para *Streptococcus agalactiae* frente al cultivo en agar sangre de carnero, para la detección de colonización vagino-rectal de mujeres embarazadas que se encuentran entre las semanas 35 a 37 de gestación que acuden al Hospital de la Mujer entre agosto y noviembre del año 2016; para lo cual se obtuvieron muestras de hisopado vaginal y rectal a pacientes que acudieron a consulta prenatal al Hospital de la Mujer en el periodo establecido, las muestras fueron procesadas mediante cultivo y pruebas de identificación en el Laboratorio de Bacteriología del Instituto SELADIS obteniendo los siguientes resultados: índice de Kappa de 0,65, sensibilidad del 75% , especificidad del 98%, valor predictivo positivo del 60%, valor predictivo negativo del 99%, razón de verosimilitud positiva de 30,8 y negativa de 0,3; con una prevalencia de colonización materna del 4,7%. De acuerdo a los resultados se concluye que el método de cultivo en agar cromogénico para *Streptococcus agalactiae* es válido y aplicable para la detección de colonización vagino-rectal materna.

**Palabras clave:** *Streptococcus agalactiae*, colonización vagino-rectal, cultivo en agar cromogénico.

## SUMMARY

*Streptococcus agalactiae* is a gram positive bacterium that colonizes the genitourinary and gastrointestinal tract in humans; in pregnant women colonization with this bacterium leads to the risk of vertical transmission to the newborn becoming a risk factor for the development of early onset neonatal disease. In La Paz Bolivia, till the date, the current situation of this problem is unknown and there is no specific methodology for the isolation and identification of this bacterium from vaginal and rectal samples. For this reason, this thesis develops a diagnostic test study with the objective of validate the culture method in chromogenic media for *Streptococcus agalactiae* in comparison with blood agar culture, for the detection of vaginal-rectal colonization of pregnant women at 35 – 37 weeks' gestation that go to "Women hospital" between august and november of 2016, for which vaginal and rectal swab specimens were collected from all patients who went to prenatal medical consultation to "Women Hospital" in the time of the study, the samples were processed through culture and identification tests in the laboratory of bacteriology of the SELADIS institute obtaining the following results: Kappa index of 0,65, sensitivity of 75%, specificity of 98%, positive predictive value of 60%, negative predictive value of 99%, positive likelihood ratio of 30,8 and negative likelihood ratio of 0,3; with a maternal colonization prevalence of 4,7%. According with these results, I conclude that the culture method in chromogenic media for *Streptococcus agalactiae* is valid and applicable for the detection of vaginal-rectal colonization in pregnant women at 35 – 37 weeks' gestation.

**Key words:** *Streptococcus agalactiae*, vaginal-rectal colonization, chromogenic media culture.

**Validación del cultivo de *Streptococcus agalactiae* en medio cromogénico para la  
detección de colonización vagino-rectal en mujeres embarazadas**

**XVI.INTRODUCCIÓN.**

El *Streptococcus agalactiae* o estreptococo beta hemolítico del grupo B (EGB) es un microorganismo que coloniza el tracto genitourinario y gastrointestinal de los humanos después de la pubertad. Se observa colonización vaginal en el 2 al 34% de las embarazadas; su presencia en el aparato genital femenino en el momento del nacimiento puede conducir a la infección del recién nacido, la enfermedad neonatal por estreptococo del grupo B de inicio temprano se asocia con la adquisición in útero o perinatal del microorganismo. (Winn et al., 2008).

La detección de este agente mediante cultivo vaginal y rectal de mujeres embarazadas es útil como un método de prevención de la infección perinatal por esta bacteria, por lo tanto, en este estudio se cultivaron muestras vaginales y rectales de gestantes entre las semanas 35 a 37 de gestación que acudieron al Hospital de la Mujer entre agosto y noviembre del año 2016 para la búsqueda de *Streptococcus agalactiae*; las muestras de hisopado vaginal y rectal fueron procesadas en el laboratorio de bacteriología del Instituto SELADIS mediante cultivo en agar sangre de carnero que es considerado el método gold standar y en el agar cromogénico CHROMagar Strep B que fue el medio de cultivo en estudio; se emplearon pruebas bioquímicas complementarias para la identificación bacteriana que incluían la tinción de gram, catalasa, bilis esculina, sensibilidad a bacitracina y sulfametoxazol/trimetoprim (SXT) y test de Christie, Atkins y Munch – Petersen (Test de CAMP).

En nuestro medio no se realiza el screening para detectar colonización materna por el estreptococo del grupo B; en este sentido el presente trabajo pretende mostrar la utilidad de la aplicación de un método de cultivo empleando un medio cromogénico para la detección de *Streptococcus agalactiae* en mujeres embarazadas como un método de prevención de la infección neonatal de inicio temprano.

El presente estudio pretende validar un método de cultivo para *Streptococcus agalactiae* en un medio cromogénico (CHROMagar Strep B) para detectar la colonización vagino rectal en mujeres embarazadas.

## **XVII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La sepsis de origen bacteriano constituye una de las principales causas de morbimortalidad en el período neonatal. La incidencia y letalidad de la septicemia neonatal es variable, reportándose una incidencia entre 2 y 4/1.000 nacidos vivos en países desarrollados, hasta 10/1.000 nacidos vivos en otras series. La letalidad reportada oscila entre menos de 10 y 70%.

*Streptococcus agalactiae* emergió como patógeno neonatal en los años 1970 y desde entonces, en ausencia de medidas de prevención, ha representado la principal causa de infección bacteriana del recién nacido en países desarrollados, a pesar de las diferentes medidas de prevención implementadas, incluida la profilaxis antibiótica intraparto, el EGB sigue siendo el agente etiológico más frecuente de infecciones graves en el recién nacido y la causa más común de sepsis y meningitis neonatal.

La sepsis severa y muerte neonatal por transmisión vertical de este microorganismo continúa siendo un problema a nivel mundial. El factor de riesgo primario más importante para la enfermedad de inicio temprano es la colonización vaginal materna, cuyo reservorio es el tracto gastrointestinal.

La prevalencia reportada de colonización asintomática por *S. agalactiae* en el tercer trimestre del embarazo varía entre 2 y 34%: entre el 10% y el 40% en los países desarrollados y del 4-20% en los países en vía de desarrollo. Sin embargo no existen publicaciones que refieran la frecuencia de colonización por *Streptococcus agalactiae* en las gestantes del departamento de La Paz- Bolivia.



El 50% de los hijos de madres portadoras nacen colonizados y el 1-2% desarrolla una enfermedad invasiva, con alto riesgo de mortalidad neonatal, secuelas neurológicas, pulmonares y riesgo de infección recurrente. La infección neonatal se asocia a una mortalidad entre 5 y 20% y a secuelas en 30% de los sobrevivientes.

El hospital de la Mujer es hospital de segundo nivel que cuenta con los servicios de ginecoobstetricia y neonatología, entre otros, realizando actividades de atención en consulta externa e internación. Dentro de las actividades de atención en salud materna se atiende a mujeres gestantes de todas las edades, tanto del sector público como privado; a pesar del tipo de población atendida en este hospital –mujeres embarazadas y neonatos- y que las guías internacionales sugeridas por el Centro De Control de Enfermedades para disminuir la incidencia de enfermedad neonatal por el estreptococo del grupo B sugieren realizar un tamizaje universal de colonización vaginal-anal por *S. agalactiae* a todas las mujeres embarazadas, hasta la fecha su aplicación no se realiza de forma rutinaria en nuestro medio y tampoco se cuenta con la metodología ni con los medios de cultivo específicos necesarios para el aislamiento e identificación de esta bacteria.

## **XVIII.JUSTIFICACIÓN.**

El rol del laboratorio de bacteriología es crucial en el apoyo al diagnóstico de infecciones bacterianas ya que no solo permite confirmar el diagnóstico clínico sino que también es quien otorga el agente etiológico y su perfil de sensibilidad y resistencia para brindar un tratamiento adecuado al paciente; en este sentido es necesario que el laboratorio cuente con métodos de cultivo confiables, validados y dirigidos para el aislamiento y la identificación de cada grupo bacteriano o bacteria en particular, ya que si no se cuenta con la metodología adecuada es probable que no se aislen muchas especies bacterianas y por lo tanto se subestime el peso real de la infección.

En el departamento de La Paz Bolivia, hasta la fecha, no existen datos publicados referidos a la colonización materna por *Streptococcus agalactiae* y tampoco se cuenta con la metodología específica para el aislamiento e identificación de esta bacteria a partir de muestras vaginorectales; asimismo este cultivo no se realiza de forma rutinaria a las pacientes en estado de gestación que acuden a sus controles prenatales; por lo tanto la falta de información referida a la colonización materna y a la infección neonatal por esta bacteria puede ser debida a que no se realiza su búsqueda ni se aplica la metodología adecuada de pesquisa; de allí la importancia de validar un método de cultivo que permita realizar el tamizaje para la detección de gestantes colonizadas por el EGB.

El estado de portadora del *Streptococcus agalactiae* puede ser variable en el tiempo por lo tanto, los cultivos vagino-rectales realizados con menos de 5 semanas antes del parto predicen adecuadamente el estado de portadora en el momento del parto. La profilaxis con penicilina o ampicilina comenzada al menos 4 horas antes del parto interrumpe la transmisión vertical y

previene la infección neonatal, sin embargo, la aplicación sistemática de profilaxis antibiótica intraparto incrementa el número de embarazadas que reciben antibióticos en el parto y puede aumentar el riesgo de infección por bacterias resistentes, este hecho no se ha podido confirmar, pero dado que la sepsis por bacilos gramnegativos reviste especial gravedad se debe evitar el uso innecesario o prolongado de antibióticos ya que la administración de penicilina puede proporcionar suficiente presión selectiva como para que conduzca infecciones neonatales debido a microorganismos resistentes como *Escherichia coli*. Por este motivo se recomienda realizar un cribado universal de las embarazadas para detectar el estado de portadoras del EGB lo que permite administrar profilaxis intraparto únicamente en los casos necesarios, por lo tanto realizar un cultivo de muestras vaginales y rectales de gestantes entre las semanas 35-37 de embarazo permite la temprana detección de la colonización por este microorganismo siendo un método de prevención de infección perinatal; por lo tanto se debe contar con un método de cultivo validado que permita realizar el tamizaje para la detección de gestantes colonizadas.

Este trabajo pretende mostrar la utilidad del empleo de un medio cromogénico que pone en evidencia de forma más clara la presencia de la bacteria, se realizó este cultivo en gestantes que acudieron al Hospital de la Mujer; los datos obtenidos permiten determinar el riesgo de infección perinatal por EGB. Con la aplicación de este método de cultivo las pacientes se beneficiarán al tener un resultado que reflejaba su estado de portadoras o no de esta bacteria y su necesidad de recibir profilaxis antibiótica intraparto.

Al no existir estudios similares referidos al cultivo que permita realizar el tamizaje para la detección de gestantes colonizadas por el estreptococo del grupo B en el Hospital de la Mujer

ni en nuestro medio, no se conoce la situación actual de este problema por lo que los resultados amplían el conocimiento acerca de la prevalencia de la colonización vagino-rectal por el estreptococo del grupo B en embarazadas en nuestro medio, lo cual podría incrementar el nivel de calidad en la atención a este grupo poblacional de alta prioridad en el ámbito de salud, además, los resultados se propondrán para su análisis en Hospital de la Mujer y su probable inclusión en los protocolos correspondientes.

Asimismo el método de cultivo propuesto para la detección de colonización vagino-rectal por estreptococo del grupo B podría ser implementado en investigaciones similares y/o en otros hospitales o centros de salud de atención a gestantes como método de prevención de enfermedad neonatal de comienzo temprano.

Al disponer de los resultados también se beneficiará a la población que demanda servicios en el hospital, ya que podría implementarse acciones de prevención y atención más efectivas disminuyendo el riesgo de complicaciones lo cual incide directamente en el costo económico para el sistema de salud y para la población afectada en particular. Con la aplicación rutinaria de este método de cultivo a todas las gestantes entre las semanas 35-37, se beneficiarían las gestantes y los neonatos, ya que se utilizarán medidas de prevención dirigidas a disminuir la sepsis, neumonía y meningitis neonatal, con la consiguiente disminución de posibles complicaciones y secuelas, disminución del tiempo de estadía en hospitales y por lo tanto el gasto para las familias y para el hospital.

## **XIX.PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.**

¿El método de cultivo en agar cromogénico para *Streptococcus agalactiae* es válido y aplicable para la detección de colonización vagino-rectal en mujeres embarazadas que se encuentran entre las semanas 35-37 de gestación que acuden al Hospital de la Mujer entre agosto y noviembre del año 2016?

## **XX.OBJETIVOS.**

### **C. OBJETIVO GENERAL.**

Validar el método de cultivo en agar cromogénico para *Streptococcus agalactiae* frente al cultivo en agar sangre de carnero, para la detección de colonización vagino-rectal de mujeres embarazadas.

### **D. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Comparar el cultivo en agar cromogénico para *Streptococcus agalactiae* frente al cultivo en agar sangre de carnero para la detección de colonización vagino-rectal de mujeres embarazadas.
2. Estimar la sensibilidad y especificidad diagnósticas del método de cultivo en agar cromogénico para *Streptococcus agalactiae* frente al cultivo en agar sangre de carnero.
3. Estimar los valores predictivos positivo y negativo del método de cultivo en agar cromogénico para *Streptococcus agalactiae*.
4. Determinar la razón de verosimilitud positiva y negativa del método de cultivo en agar cromogénico para *Streptococcus agalactiae*.
5. Determinar la prevalencia de colonización vagino-rectal por *Streptococcus agalactiae* de mujeres embarazadas que se encuentran entre las semanas 35-37 de gestación.

## **XXI.HIPÓTESIS**

El método de cultivo en agar cromogénico para *Streptococcus agalactiae* es válido y aplicable para la detección de colonización vagino-rectal en mujeres embarazadas que se encuentran entre las semanas 35-37 de gestación.

## **XXII.ANTECEDENTES**

En 1996, el centro de control de enfermedades (CDC) de Atlanta-Estados Unidos, en conjunto con el Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología (ACOG) y la Academia Americana de Pediatría (AAP) publicaron las guías para la prevención de sepsis por *S. agalactiae*. En ese momento propusieron dos estrategias de prevención igualmente aceptables: una basada sólo en factores de riesgo, y la otra agregaba el cultivo universal a las 35-37 semanas de gestación. Los resultados de la implementación de estas estrategias concluyeron que la utilización de factores de riesgo previene alrededor de 68% de la sepsis por *S. agalactiae* y que la incorporación de cultivo puede tener una eficacia de 88%, disminuyendo la incidencia de 1,7 a 0,4/1.000 nacidos vivos entre 1993 y 1999. (Tapia et al, 2007) Por ello, en el año 2002 reevaluaron las recomendaciones y se enfatizó que los protocolos con pesquisa universal son los que logran una menor incidencia de recién nacidos afectados y el CDC modificó su normativa y propuso aplicar sólo el protocolo basado en el cultivo universal a las madres gestantes. Esta misma idea se mantuvo en la reunión de reevaluación de las estrategias, cuyo consenso se publicó en 2010, que incluía acuerdos entre las autoridades del CDC, ACOG, AAP, American College of Nurses-Midwives (ACNM), American Academy of Family Physicians (AAFP) y la American Society of Microbiology (ASM). (Abarzúa et al., 2014)

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



el al, 2017). No obstante, se han reportado casos de infecciones neonatales graves y casos fatales por EGB en Brazil. (Edmond KM, et al, 2012).

Existen diversos estudios donde se determina la prevalencia de colonización de mujeres embarazadas por *Streptococcus agalactiae*; la prevalencia global es de 17,9%. (Seedat F, et al; 2017); este dato concuerda con los resultados de una revisión sistemática y metanálisis realizado por Russell, et al el 2017 donde demuestran que el EGB coloniza a mujeres embarazadas en todo el mundo con un valor global estimado de 18%. (Russell NJ, et al; 2017). La menor prevalencia se encuentra en las regiones del sur y este de Asia y la mayor en el Caribe. (Patras KA & Nizet V; 2018).

En un estudio realizado en Medellín Colombia durante 2010 se determinó la prevalencia de colonización recto-vaginal por *S. agalactiae* de 17,6%, este estudio fue de revisión de historias clínicas de gestantes tamizadas para colonización vaginorectal por EGB entre 35 a 37 semanas, utilizando un medio cromogénico (no especificado). (Ceballos et al., 2014), sin embargo, en otro estudio realizado en Medellín Colombia la prevalencia fue de 5,8%; en este estudio las muestras fueron de hisopado del introito vaginal y de la región anal y fueron cultivadas en agar nueva granada y en caldo Todd Hewitt suplementado con antibióticos a partir del cual se realizó un subcultivo en agar sangre al 5%. (Duque et al; 2010). En otro estudio de Colombia realizado en Bogotá se obtuvo una prevalencia de 0,38% a partir de 130 gestantes entre 35 y 37 semanas de gestación, en este estudio se obtuvieron muestras de introito vaginal y ampolla rectal, estos hisospos se transfirieron a caldo cerebro corazón con un disco de gentamicina y se incubaron 24 horas con 5% de CO<sub>2</sub> a 35 °C para después

sembrar en agar sangre. Se realizaron las pruebas de gram, catalasa, bilis esculina y test de CAMP para su identificación. (García et al., 2011).

En Temuco, Chile entre los años 2010 al 2012 se determinó el 14,4% de colonización de *S. agalactiae* en la región vaginal-anal de mujeres embarazadas de tercer trimestre. Las muestras fueron sembradas en caldo Todd-Hewitt suplementado con ácido nalidíxico (15 µg/ml) y gentamicina (8 µg/ml) y se incubaron a 37° C durante 18 a 24 h. Posteriormente, el hisopo fue resembrado en agar soya-tripticosa con sangre de cordero al 5%. A las colonias β-hemolíticas recuperadas se les realizó aglutinación por látex para *S. agalactiae*. (Abarzúa et al., 2014).

En Paraguay en los años 2010-2011 se realizó un estudio donde se determinó una frecuencia de colonización del 23,6%; en este estudio se incluyeron mujeres gestantes de 35 a 37 semanas de gestación a las que se les tomó hisopado del intrioto genital y anorectal que fueron introducidos en caldo Todd Hewitt con colistina y ácido nalidíxico por 18 horas y subcultivados en agar sangre al 5%; las colonias fueron identificadas por catalasa, bilis esculina, CAMP y serología. (Ortiz et al., 2013).

En un estudio realizado en Buenos Aires Argentina determinaron la prevalencia global de *S. agalactiae* de 17,4% y destacaron el excelente rendimiento del subcultivo en el medio cromogénico chromIDStreptoB de bioMérieux para detectar *S. agalactiae* en embarazadas luego del enriquecimiento en caldo de Todd Hewitt selectivo en comparación con el método propuesto por el CDC. (Montibello et al., 2011).; en otro estudio realizado entre 2003-2004 en Buenos Aires Argentina se determinó una prevalencia del 9,39%, sin embargo cabe resaltar que en este estudio se incluyeron gestantes entre 28 a 40 semanas de gestación; las muestras eran vaginorectales y la metodología incluía enriquecimiento en caldo Todd Hewitt y

resiembrada en agar sangre. (DI Bartolomeo et al., 2005). En otro estudio realizado en Argentina con el objetivo de determinar el porcentaje de colonización por EGB en las pacientes gestantes asistidas del 1° de julio de 2001 al 31 de diciembre de 2002 e implementar un programa de prevención de sepsis neonatal precoz por EGB a través de profilaxis antibiótica intraparto basado en cultivos; incluyeron 1756 pacientes a las que realizaron cultivos con hisopado vaginal y anal a 1228 (69.9%). Las muestras fueron incubadas en caldo cerebro corazón con colistina y subcultivadas en agar sangre de carnero, las colonias sospechosas fueron confirmadas por gram, catalasa, CAMP, bilis esculina, PYR e hidrólisis del hipurato. Encontraron que el porcentaje de colonización materna por EGB fue del 1.4% (17 pacientes) y se reportó un caso de sepsis neonatal compatible con EGB (0.6%) en una madre con cultivo negativo. (Larcher JS, et al, 2005).

En Lima- Perú, en un estudio publicado el año 2004, con el objetivo de determinar los niveles de colonización en secreciones vaginales y anorrectales de mujeres embarazadas en dos centros hospitalarios, estudiaron 238 gestantes con 26 semanas o más de gestación mediante hisopado de secreción vaginal y anorrectal empleando como medio de enriquecimiento selectivo caldo Todd Hewitt suplementado con gentamicina (0.8 mg/mL) y ácido nalidíxico (15 mg/ml). Realizaron el cultivo en agar sangre de carnero al 5%, identificándose el germen mediante el tipo de hemólisis, la prueba de CAMP, bacitracina y Sulfametoxazol / Trimetoprim. Aislaron *Streptococcus agalactiae* en 26 pacientes (10.9%). (Tamariz J, et al, 2004).

En general, las tasas de colonización genital por EGB en Latinoamérica varían entre el 2 y el 20.4%, como lo muestran los estudios realizados en México, Argentina, Colombia y Brasil.

(Reyna, et al, 2008; Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica, 2014; Reyna, et al, 2007).

Con respecto a estudios orientados a la comparación del medio cromogénico CHROMagar Strep B con otros medios de cultivo para el aislamiento de *Streptococcus agalactiae* se puede mencionar los siguientes:

Según un estudio realizado en París sobre comparación de 5 medios selectivos para el aislamiento de estreptococo del grupo B en hisopados vaginales de mujeres embarazadas, donde compararon medios cromogénicos y el medio de granada, se demostró que estos medios facilitan la detección de colonización materna por el estreptococo del grupo B, concluyen que el uso de medios cromogénicos tienen la mayor ventaja de que pueden ser incubados en atmósfera normal (sin anaerobiosis) y que permiten la detección de cepas no hemolíticas; siendo su mayor desventaja el hecho que requieren confirmación diagnóstica debido a que especies bacterianas cercanamente relacionadas pueden presentar el mismo aspecto fenotípico que el estreptococo del grupo B resultando en posibles falsos positivos. (Joubrel C et al, 2014)

Se realizó un estudio en Francia, de agosto a diciembre del 2009, con el objetivo de evaluar CHROMagar Strep B para la detección rutinaria de EGB en muestras perinatales en comparación con los medios de Granada, Agar Columbia con sangre de caballo y agar colimicina ácido nalidíxico. Este estudio incluyó 1356 muestras de las que se aisló EGB en 124 (prevalencia de 9,1%) de los cuales 5 EGB fueron aislados de placentas, 10 de aspirados gástricos, 23 de muestras urinarias y 86 de muestras genitales. La prevalencia fue de 11,5% con muestras genitales (86/749). Las muestras fueron sembradas en los medios de cultivo y

observadas al primer y segundo día de incubación en búsqueda de colonias presuntivas de EGB las que fueron identificadas mediante métodos de aglutinación en latex. Observaron que CHROMagar StrepB es más sensible comparado con las placas con agar sangre con 76,6% vs 53,2% en el primer día de incubación y 92,7% vs 64,5% en el segundo día. Asimismo observaron que CHROMagar Strep B produce colonias con el color esperado antes que el medio de Granada y que además permite la recuperación de cepas no hemolíticas. (Poisson, D.-M., et al; 2010).

En un estudio realizado en Francia cuyo objetivo fue evaluar el CHROMagar StrepB en comparación con agar sangre, incluyeron 285 hisopados vaginorectales que tuvieron una etapa de 24 horas de enriquecimiento en cald Todd-Hewitt suplementado con ácido nalidíxico y colistin y subcultivo en CHROMagar StrepB, en agar Columbia sangre y agar colimicin nalidixico; se obtuvo una prevalencia del 29,5% aislando 84 EGB; en CHROMagar StrepB aislaron 78 EGB, los 6 falsos negativos en este medio fueron de muestras paucimicrobianas (menos de 5 colonias en los agares empleados de comparación); asimismo se observó en el agar sangre una mayor cantidad de falsos negativos (n=35) asociados con sobrecrecimiento de bacilos y levaduras, lo que indica que el mal desempeño de este medio se relaciona con crecimiento abundante de flora rectal. Obtuvieron una sensibilidad del 92% para el CHROMagar StrepB y del 58% para el agar sangre. (Poisson et al, 2011).

En otro estudio realizado en Austria compararon el cultivo de muestras vagino/rectales en cuatro medios cromogénicos con el método convencional de preenriquecimiento recomendado por la CDC. Para ello incluyeron 242 hisopados vagino/rectales, obtenidos por las mismas pacientes, desde febrero a mayo del 2013. Los hisopos fueron emulsificados en 0,5 mL de

solución fisiológica al 0,9%, llevados al vortex por 5 segundos y 50 uL fueron inoculados en los medios StrepBSelec, Brilliance GBS, CHROMagar Strep B y ChromID Strepto B; los 250 uL restantes fueron transferidos a caldo Lim. Incubaron todos los medios a 35°C por 24 horas y 50 uL del caldo fueron inoculados en agar colistina, ácido nalidíxico con agar sangre de carnero al 5% e incubado a 35°C durante 18 horas. Realizaron la identificación de las colonias sospechosas fue por el método de MALDI TOF. De un total de 242 muestras, 21% fueron positivas para EGB en al menos un medio probado; obtuvieron los siguientes resultados de sensibilidad y especificidad: 92 y 100% para StrepBselect, 96 y 100% para Brilliance, 94 y 100 % para CHROMagar Strep B, 86 y 100 % para ChromID Strepto B y 90 y 100% para el método de preenriquecimiento selectivo. (Salem, N., & Anderson, J. J.; 2015).

Con respecto al tipo de muestra que permite la mayor recuperación del EGB, existen diversos estudios que concluyen que el hisopado vaginorectal aumenta el número de mujeres detectadas como positivas para EGB, en comparación con el hisopado vaginal o rectal. (El Aila NA, et al., 2010)

## XXIII.MARCO TEÓRICO.

### J. Características generales del *Streptococcus agalactiae*.

El estreptococo del grupo B o *Streptococcus agalactiae* es una bacteria gran positiva, es la principal causa infecciosa de morbilidad y mortalidad neonatal en los Estados Unidos. Se conoce que causa infecciones tanto de inicio temprano como de inicio tardío en neonatos, sin embargo, las intervenciones actuales solo son efectivas para la prevención de la enfermedad de inicio temprano. La enfermedad de inicio temprano por EGB ocurre dentro de la primera semana de vida mientras que la de inicio tardío ocurre después de la primera semana. (Morgan JA & Cooper DB, 2018).

El género *Streptococcus* incluye a un grupo de microorganismos gram positivos de forma esférica u ovoide de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ ; que normalmente se disponen en parejas o en cadenas. Para diferenciar las especies de este género se puede utilizar sus propiedades serológicas (grupos de Lancefield) o sus patrones hemolíticos (hemólisis completa o beta, hemólisis incompleta o alfa y ausencia de hemólisis o gamma  $\gamma$ ).

*Streptococcus agalactiae* es la única especie portadora del antígeno de grupo B de Lancefield por lo que es conocido también como estreptococo  $\beta$ -hemolítico del grupo B. Es un coco grampositivo, catalasa y oxidasa negativo, anaerobio facultativo, que se presenta formando cadenas de longitud variable. Tras 18-24 h de incubación en agar sangre, las colonias son de unos 2 mm de diámetro, lisas y rodeadas por un halo de  $\beta$ -hemólisis, aunque existen algunas cepas no hemolíticas. (Murray P & Pfaller M., 2006).

Fue descrito por primera vez como causa de mastitis bovina por Nocard y Mollereau en 1887, posteriormente fue identificado en hisopados genitales en 1935 por Lancefield y Hare, y en 1938 Fry describió 3 casos fatales en mujeres post parto. Esto fue notable debido a que todas las infecciones estreptocócicas severas previas eran atribuidas al estreptococo del grupo A. los reportes de enfermedad neonatal por EGB fueron esporádicos hasta 1960 cuando esta bacteria fue reconocida como la principal causa de sepsis neonatal de inicio temprano en los EEUU y en 1980 se convirtió en la causa más común de sepsis y meningitis neonatal en muchos países desarrollados. (Le Doare K & Heath PT; 2013).

Los aislamientos de EGB se clasifican en diez serotipos según las características antigénicas únicas de su polisacárido capsular (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX). Una revisión global reciente de aislamientos invasivos demostró que el serotipo III es el más frecuentemente identificado en todas las regiones que disponen de datos (48.9%), seguido por los serotipos Ia (22.9%), V (9.1%), Ib (7%) y II (6.2%). A pesar del hecho de que el estado inmunitario de las madres colonizadas parece tener un papel crucial en proveer protección a sus hijos, diversos estudios han sugerido que diferencias en la virulencia de los aislamientos de EGB pueden contribuir también en el desarrollo de infección neonatal. Diversos estudios han mostrado que las poblaciones de EGB tienen una distribución clonal, y que existen tipos clonales altamente virulentos que parecen ser los causantes de la mayor morbilidad y mortalidad producidas por este microorganismo. (Palacios et al, 2017).

### **K. Factores de virulencia**

El EGB es una bacteria bien adaptada a la colonización asintomática de humanos adultos, pero también es un patógeno potencialmente invasivo en ciertos neonatos susceptibles. Dado que



los recién nacidos son cuantitativamente y cualitativamente deficientes en sus mecanismos de defensa, incluyendo fagocitos, complemento y especificidad de anticuerpos, existe un microambiente en el cual se ha dado a conocer una variedad de factores de virulencia que presenta el EGB. El carácter multifuncional de los varios factores de virulencia del EGB representa un gran desafío para los mecanismos de defensa inmunitaria subdesarrollados del recién nacido. La naturaleza transitoria de la colonización vaginal por EGB refleja la combinación de determinantes de la bacteria, antagonismo por la flora comensal, respuesta inmune del hospedero, cambios en el estado del embarazo, cambios en el pH vaginal y cambios hormonales. (Patras KA & Nizet V; 2018).

El EGB induce la exfoliación del epitelio vaginal para establecer una infección perinatal invasiva y causar infección ascendente aumentando la diseminación bacteriana y la infección del útero. (Vornhagen J, et al; 2018).

La adherencia a las células epiteliales es un paso crítico para establecer la colonización materna y neonatal. Se ha observado un aumento de la adherencia a las células del epitelio vaginal y a proteínas de la matriz extracelular, in vitro, cuando el pH cambia de ácido a neutro. Varios determinantes de superficie expresados por el EGB contribuyen a la adherencia de las células del epitelio vaginal y cervical, estos incluyen: proteínas de superficie ricas en serina (Srr) Srr-1 y Srr-2, proteínas alpha-like, la proteína PilA del pili del EGB, adhesinas de superficie BsaB, BspA y BibA; el pili y otras proteínas de superficie promueven la adherencia a componentes de la matriz extracelular como colágeno, fibrinógeno, fibronectina y laminina. Además el EGB posee metalopeptidasas con la capacidad de romper todas estas cuatro

proteínas de la matriz extracelular, lo que podría facilitar el contacto con el tejido y la invasión o establecimiento en el nicho. (Patras KA & Nizet V; 2018).

El EGB tiene sistemas regulatorios codificados genéticamente que permiten la transición de un nicho comensal a uno invasivo, responde a cambios en el ambiente usando un sistema de dos componentes (TCS) que le permite sentir y responder a variaciones en las condiciones del ambiente del hospedero, controla la virulencia, la adherencia, resistencia a las defensas del hospedero y el metabolismo bacteriano; controla la expresión de la peptidasa C5a que inactiva la citoquina derivada del complemento. (Patras KA & Nizet V; 2018).

La bacteremia neonatal resulta de la inhalación de secreciones genitales y/o líquido amniótico infectado hacia los pulmones. La beta hemolisina del EGB promueve la invasión de las células del epitelio pulmonar y la subsecuente invasión de los vasos sanguíneos; en la sangre las bacterias sobreviven y se multiplican gracias al polisacárido capsular, el factor de virulencia más importante en la patogénesis de la infección neonatal por el EGB, que permite al microorganismo evadir los mecanismos de defensa del huésped, particularmente la opsonofagocitosis; a menos que exista un elevado nivel del complemento y de IgG anti-polisacárido capsular que permitan su opsonización, fagocitosis y muerte. Finalmente se liberan citoquinas proinflamatorias que resultan en daño celular principalmente en el sistema nervioso central. (Baker; 2013)

El estreptococo del grupo B puede formar estructuras tridimensionales parecidas a biofilm in vitro, estas comunidades multicelulares facilitan la persistencia de la bacteria en condiciones medioambientales de estrés aumentando su habilidad de colonizar y persistir en el hospedero, varias adhesinas juegan un rol en la formación de estas estructuras entre ellas las proteínas que

forman el pili. (Rosini R & Margarit I; 2015). Las condiciones ácidas características del área genital podría promover la formación de biofilm por el EGB. El biofilm vaginal no ha sido demostrado en modelos in vivo. (Patras KA & Nizet V; 2018).

Ante el reconocimiento de la invasión por patógenos bacterianos el sistema inmune del hospedero responde con el sistema del complemento; El EGB tiene diferentes factores para contraatacar al sistema del complemento: la capsula polisacárida evita el depósito de C3b, el C5a es degradado por la peptidasa ScpB producida por el EGB, el EGB secreta una proteína interferente con el complemento (CIP), la proteína de superficie BibA, una proteína inhibitoria del complemento a la proteína B expresada en su superficie (Bac). (Patras KA & Nizet V; 2018).

Otro mecanismo por el cual el EGB evade el sistema inmune innato es a través del mimetismo molecular ya que presenta ácido sialico en su cápsula polisacárida que es idéntico al presente en los glicolípidos y glicoproteínas de la superficie de las células del huésped. (Patras KA & Nizet V; 2018).

### **L. Influencia de la microbiota vaginal en la colonización por EGB**

Las especies de *Lactobacillus* forman parte de la microbiota vaginal en mujeres sanas, estas bacterias bajan el pH a través de la producción de ácido láctico protegiendo a la mujer de patógenos microbianos. Durante el embarazo hay una reducción de la diversidad microbiana en el área genital con predominio de *Lactobacillus*, clostridios, bacteroides y actinomicetes lo que lleva a una mayor disminución del pH vaginal con el objetivo de proteger a la madre y al feto de infecciones. Ciertas cepas de *Lactobacillus* tienen la capacidad de inhibir la adherencia

del EGB a las células del epitelio vaginal, asimismo se ha demostrado in vitro que los lactobacilos tienen actividad antimicrobiana contra el EGB con reducción de la colonización in vivo. Estudios preliminares in vitro del microbioma genital demuestran que existe cooperación del EGB con otros microorganismos de este ambiente; en mujeres embarazadas el EGB frecuentemente es co-aislado con *Cándida albicans* pero no se ha observado co-aislamiento con *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* y *Mycoplasma hominis*. El EGB se une directamente a *Cándida albicans* a través de la proteína BspA, que también facilita la adherencia celular; asimismo el EGB utiliza productos derivados de la microbiota genital para estimular su propio metabolismo. La presencia del EGB también podría incrementar las propiedades de virulencia de otros patógenos del área genital: el sobrenadante de cultivos del EGB incrementa la producción de la toxina del shock tóxico estafilocócico en *Staphylococcus aureus* y estas dos bacterias son frecuentemente co-aisladas de hisopados genitales. El EGB posee diversos mecanismos de resistencia para competir con los lactobacilos y con la microbiota genital: un transportador de manganeso (MntH) apoya el crecimiento del EGB durante la exposición al ácido láctico; es inherentemente resistente a la actividad antimicrobiana del nisin y lactobiótico producido por *Lactococcus lactis* gracias a la acción de una enzima (SaSNR) que reduce su actividad antibacteriana; in vitro el EGB también puede inhibir el crecimiento de estreptococos de los grupos A, B, C, G, de *Gardnerella vaginalis*, lactobacilos y difteroides; el EGB nunca ha sido aislado con otros estreptococos beta hemolíticos en estudios clínicos de hisopados genitales. (Patras KA & Nizet V; 2018).

La microbiota vaginal dominante está compuesta por bacterias de crecimiento lento mientras que la microbiota rectal consiste en mayor cantidad de bacterias de rápido crecimiento. En

ambos sitios el EGB generalmente está presente en cantidades pequeñas y crecerá como colonias pequeñas. El caldo Todd-Hewitt contiene ácido nalidíxico y gentamicina, dos antibióticos de amplio espectro dirigidos contra bacterias gram negativas digestivas; además el CHROMagar StrepB es selectivo contra bacilos gram negativos, estafilococos y levaduras. El enterococo permanece como una bacteria potencialmente obstructiva para el desarrollo del EGB ya que pueden impedir el crecimiento del EGB en caldos selectivos por competición. (Poisson et al; 2011)

**M.....E**

### **pidemiología de la colonización por EGB durante la gestación.**

El *Streptococcus agalactiae* es un microorganismo que puede colonizar de forma intermitente el área perineal y el tracto genital (Montibello et al., 2011). Se han reportado un amplio rango de tasas de colonización genital durante el embarazo, estas variaciones dependen de la región, de la población de individuos estudiados como también del método de toma de muestra y cultivo. (Patras KA & Nizet V; 2018).

La prevalencia de colonización de este germen en introito vaginal y en región ano-rectal es similar en mujeres embarazadas o no, con cifras que oscilan entre un 10-35%. (Ortiz et al., 2013).

Las tasas de colonización vagino-rectal a nivel mundial oscila entre 2.3%-36% dependiendo de la población en estudio, de los medios y técnicas de cultivo y de las áreas anatómicas de las que se toma la muestra. En los últimos 20 años, el desarrollo de los métodos de screening para la detección de colonización por EGB, la aplicación de profilaxis intraparto han resultado en

una disminución significativa en la incidencia de la enfermedad de inicio temprano por EGB en los países desarrollados: en 1990 habían aproximadamente 1.7 casos por cada 1000 nacidos vivos, en los últimos años esto ha disminuido a 0.34 a 0.37 por cada 10000 nacidos vivos. (Morgan JA & Cooper DB, 2018)

#### **N. Enfermedades clínicas.**

En un primer momento, los estreptococos del grupo B de Lancefield se identificaron como una causa de mastitis vacuna, pero desde entonces han supuesto una de las principales causas de septicemia y meningitis de los niños recién nacidos. Los estreptococos del grupo B son también causantes comunes de fiebre durante el parto y provocan, en ocasiones, infecciones graves en adultos que no guardan relación con el embarazo. (Dennis L., et al; 2005)

Es considerado actualmente una de las principales causas de meningitis, neumonía, sepsis neonatal, muerte neonatal, aborto séptico, corioamnionitis, endometritis, pielonefritis, celulitis, sepsis puerperal y ruptura prematura de membranas, entre otras infecciones perinatales. (Taminato et al., 2011).

#### **3. Enfermedad en el recién nacido y el lactante.**

El EGB no produce enfermedad únicamente en el recién nacido, sin embargo, el mayor impacto, tanto en severidad como en incidencia, es en el periodo neonatal hasta los primeros 90 días de vida. (Le Doare K & Heath PT; 2013)

El EGB se considera el agente etiológico más frecuente de sepsis neonatal en los países desarrollados, siendo la causa del 40-50% de todos los casos de sepsis de inicio temprano.

Existen dos tipos generales de infección por estreptococos del grupo B que afectan a los lactantes y se definen por la edad del paciente en el momento de su aparición. (Dennis L, et al; Recientemente se ha agregado un tercer síndrome clínico, la enfermedad de inicio tardío - tardío, el cual se inicia después de los 90 días de vida. Estos síndromes difieren en características epidemiológicas, patogénesis, hallazgos clínicos y pronóstico. (Pannaraj PS & Baker CJ., 2014)

### **c. Enfermedad neonatal de inicio temprano**

Se define como la infección que se presenta en los primeros 6 días de vida. (Le Doare K & Heath PT; 2013). La colonización materna por EGB en el tracto gastrointestinal o genital es un requisito para la ocurrencia de enfermedad de inicio temprano, y la transmisión ocurre con mayor frecuencia durante o justo antes del nacimiento. Se estima que el 25-35% de las mujeres embarazadas portan el EGB en la vagina y/o en el tracto gastrointestinal, el 50% las mujeres colonizadas transmiten la bacteria verticalmente al tracto gastrointestinal o vías respiratorias superiores de sus neonatos y de estos el 1% al 2% progresará para desarrollar enfermedad grave. (Baker CJ; 2013).

La enfermedad neonatal de inicio temprano causada por el estreptococo del grupo B usualmente comienza dentro de las 24 horas del nacimiento afectando a 2 neonatos por cada 1000 nacidos vivos, en el caso de no ser tratada lleva a la muerte. Una de cada 4 mujeres porta la bacteria en el área vaginal, esta puede infectar el líquido amniótico antes del parto o infectar al bebé durante el parto causando sepsis, neumonía o meningitis. (Heath PT & Jardine LA; 2014).

La infección se contrae durante el parto o momentos antes a partir de microorganismos que colonizan las vías genitales maternas. Cerca de 50% de los niños nacidos por vía vaginal de madres portadoras resultan colonizados, aunque sólo 1 a 2% de ellos llega a sufrir una infección clínicamente evidente. El parto prematuro y los factores de riesgo materno (parto prolongado, complicaciones obstétricas y fiebre materna) constituyen otros factores. (Dennis L, et al; 2005)

La ruta de infección por el EGB es la transmisión vertical desde la vagina de la madre colonizada. Los bebés pueden ser expuestos al EGB durante su paso por el canal vaginal en el momento del parto, aunque también puede ascender desde la vagina hacia el líquido amniótico como resultado de ruptura de membrana pretérmino, antes del trabajo de parto; sin embargo el EGB puede ascender incluso en la presencia de membranas intactas. La mayor cantidad de los bebés expuestos al EGB durante el parto se colonizan con esta bacteria aunque no necesariamente desarrollen signos o síntomas de la enfermedad. (Morgan JA & Cooper DB, 2018)

La presentación de la infección precoz coincide con la de otras formas de septicemia neonatal. Los datos típicos comprenden apnea, letargo e hipotensión. Casi todos los lactantes con enfermedad precoz sufren además bacteriemia, entre la tercera parte y la mitad presentan neumonía o síndrome apneico y otra tercera parte tiene meningitis. (Dennis L, et al; 2005)

El 85% de las infecciones neonatales por EGB son de presentación temprana, y aunque las manifestaciones clínicas pueden aparecer hasta el séptimo día de vida, el 90% de los recién nacidos afectados enferma en las primeras 24 horas. Los casos de enfermedad tardía se manifiestan a partir del séptimo día, y pueden adquirirse durante el paso a través del canal de



parto o en forma horizontal, por contacto con la madre colonizada u otras fuentes de transmisión horizontal. (Pannaraj PS & Baker CJ., 2014)

La enfermedad de inicio temprano se asocia con frecuencia a parto prematuro (< 37 semanas de gestación) y a la presencia de complicaciones obstétricas, tales como rotura prolongada de las membranas fetales (> 12 a 18 horas), fiebre intraparto, corioamnionitis y complicaciones infecciosas posparto. Puede presentarse rápidamente, con signos evidentes al nacer o dentro de las 24 horas de vida en el 90% de los casos (98% dentro de las primeras 12 horas), y se manifiesta típicamente como bacteriemia sin un foco infeccioso evidente o neumonía, y con menos frecuencia como meningitis. (Edwards MS, et al, 2011; Heath PT, et al., 2009).

La letalidad reportada en los países desarrollados varía entre alrededor del 30% en los recién nacidos menores de 33 semanas de edad gestacional y el 2-3% en los recién nacidos a término. (Phares CR, et al. 2008).

A principios de la década de 1970, la tasa de sepsis temprana por EGB en los EE.UU. se calculaba en 1.7 casos por cada 1000 recién nacidos vivos, con una letalidad cercana al 50%. (Verani JR, et al, 2010). Sin embargo, a medida que se ha desarrollado el conocimiento sobre la fisiopatogenia y el comportamiento clínico de la enfermedad, así como el papel de la colonización previa como principal factor de riesgo conocido, aunado al desarrollo de guías clínicas para la prevención de la enfermedad a finales de la década de 1990, se ha logrado una disminución de dicha tasa a 0.37 casos por cada 1000 recién nacidos vivos en la actualidad. Aun así, sigue siendo la causa más común de sepsis y meningitis neonatal en los EE.UU. y en otros países desarrollados. (Phares CR, et al. 2008; Verani 2010).

#### **d. Enfermedad neonatal de inicio tardío**

Las infecciones tardías afectan a los lactantes de entre una semana y tres meses de edad, y aparece a una edad promedio de tres o cuatro semanas. El microorganismo infeccioso se contrae durante el parto (como sucede en las infecciones precoces) o con posterioridad, por el contacto con la madre o con el personal de la sala de recién nacidos que estén colonizados o por otra fuente. La meningitis supone la manifestación más común de infección tardía. Los niños presentan fiebre, letargo o irritabilidad, comen mal y sufren crisis convulsivas. Los otros tipos de infección tardía comprenden bacteriemia sin una causa identificada, osteomielitis, artritis séptica y celulitis facial vinculada a adenitis submandibular o preauricular. (Dennis L., et al; 2005)

La incidencia global de enfermedad neonatal invasiva por EGB es de 0.49 por cada 1000 nacidos vivos; la incidencia es más alta en Africa (1.12) que en Asia (0,30). La incidencia de la enfermedad neonatal de comienzo temprano es de 0.41 y la de inicio tardío de 0.26. (Madrid L, et al; 2017)

La enfermedad neonatal invasiva por EGB contribuye al desarrollo de encefalopatía neonatal que causa mortalidad y de discapacidad a largo plazo. (Tann CJ, et al; 2017); la meningitis por EGB esta relacionada con discapacidad en el desarrollo neuronal, afecta a 1 de cada 5 niños que sobreviven a la enfermedad; y se ve reflejada en discapacidad cognitiva, motora, visual o auditiva. (Kohli-Lynch M, et al; 2017).

#### **4. Enfermedad en adultos**

##### **c. Enfermedad relacionada al embarazo**

La mayor parte de las infecciones por estreptococos del grupo B de los adultos guarda relación con el embarazo y el parto. La fiebre durante el parto (la manifestación más común) se acompaña a veces de síntomas y signos de endometritis o corioamnionitis (distensión abdominal y dolor del útero o los anexos con la palpación). Tanto los hemocultivos como los exudados vaginales suelen ser positivos. La bacteriemia tiene a menudo carácter transitorio, pero en ocasiones determina la aparición de meningitis o endocarditis. (Dennis L., et al. 2005)

El EGB se relaciona con endometritis, corioamnionitis, bacteremia e infección de herida postparto; también puede causar infección del tracto urinario, neumonía, sepsis puerperal y aborto espontáneo. (Le Doare K & Heath PT; 2013)

La colonización materna por EGB se ha relacionado con el nacimiento de niños muertos, debido a una infección ascendente hacia el útero (nacimiento de un feto de más de 1000 gramos y/o más de 28 semanas de gestación sin signos de vida y con evidencia de enfermedad invasiva por EGB aislado a partir de un sitio estéril). (Nan C, et al 2015; Seale AC, et al; 2017); asimismo se ha relacionado con nacimiento prematuro, especialmente en los casos donde existe infección ascendente (bacteriuria). La enfermedad materna por EGB se determina por el aislamiento de EGB a partir de un sitio estéril en una mujer embarazada o postparto (hasta 42 días de postparto) con signos clínicos de sepsis. (Tann CJ, et al; 2017). Se estima que la incidencia de enfermedad materna por EGB es de 0,38 por cada 1000 embarazadas. (Hall J, et al; 2017).

#### **d. Enfermedad no relacionada al embarazo**

Las infecciones de los adultos que no guardan relación con el período puerperal afectan de ordinario a personas ancianas o con alguna enfermedad crónica de base, como la diabetes mellitus o un tumor maligno. Entre las infecciones descritas con cierta frecuencia en los adultos cabe citar la celulitis y la infección de las partes blandas (incluidas las úlceras cutáneas diabéticas infectadas), la infección urinaria, la neumonía, la endocarditis y la artritis séptica. Se han descrito también meningitis, osteomielitis y abscesos intraabdominales o pélvicos. (Dennis L., et al; 2005)

El EGB raramente produce enfermedad en adultos sanos, sin embargo puede causar infecciones en personas diabéticas, adultos mayores y pacientes inmunocomprometidos; puede presentarse infección de piel o tejidos blandos, bacteremia a foco desconocido, neumonía, osteomielitis y, en raras ocasiones, meningitis o endocarditis; estas enfermedades se asocian a una enfermedad de base como diabetes mellitus, enfermedad del corazón y cáncer. (Le Doare K & Heath PT; 2013). También se ha reportado un caso de síndrome de orina púrpura en una mujer de 83 años. (Ficher KN, et al; 2016).

El EGB vaginal generalmente es considerado como no patógeno; esto está respaldado por un estudio de revisión que estudió mujeres con irritación vulvar, dolor vaginal o vulvar, fisura vulvar, descarga vaginal o eritema vaginal, en las que se aisló EGB, los resultados del estudio sugieren que el EGB juega un rol secundario y probablemente coloniza un epitelio previamente dañado por infecciones por candida o una dermatosis. (Sonnex C; 2013).

## **O. Factores de riesgo**

Numerosos factores maternos, obstétricos y neonatales han sido asociados o identificados como factores de riesgo de colonización materna, transmisión del EGB de la madre al bebe, colonización neonatal o enfermedad por EGB. (Le Doare K & Heath PT; 2013)

Se han identificado factores de riesgo biológico y socioeconómico para la colonización genital por el EGB. Los factores biológicos incluyen: antecedentes de ruptura prematura de membranas, colonización gastrointestinal por EGB y mayor edad materna. Un estudio demostró que la edad materna mayor a 36 años es asociada con colonización permanente por EGB y otro estudio demostró una mayor colonización por EGB en mujeres mayores de 40 años. La etnia, obesidad, bajo consumo de vitamina D, la higiene, la actividad sexual, la ocupación de trabajadores en salud y el analfabetismo también han sido asociados con colonización genital por EGB. (Patras KA & Nizet V; 2018).

El principal factor de riesgo para la infección de inicio temprano por EGB es la colonización del tracto genital de la madre por el EGB. Esta bacteria es flora normal del tracto gastrointestinal por lo que se piensa que es el principal reservorio para la colonización materna. Esta colonización puede ser transitoria por lo que los cultivos para EGB deben ser obtenidos en cada embarazo. La bacteriuria por EGB durante cualquier etapa del embarazo es un marcador de colonización genital por lo que estas pacientes deben recibir tratamiento profiláctico aun si el cultivo para EGB sea negativo entre las semanas 35 a 37 de gestación. (Morgan JA & Cooper DB, 2018). La colonización vaginal se considera el factor de riesgo más importante porque incrementa el riesgo en más de 29 veces. (Alvarez CA, et al, 2014). Cuando la mujer embarazada esta colonizada por EGB el riesgo de desarrollar enfermedad

neonatal de inicio temprano es del 1.1% cuando no existe profilaxis antibiótica intraparto mientras que con la profilaxis se predice que el riesgo disminuya a un 0,3%. (Russell NJ, et al; 2017).

Otros factores de riesgo incluyen que la madre sea joven, que sea de raza negra. Además, los recién nacidos de madres menores de 20 años o de raza negra/hispana. (Le Doare K & Heath PT; 2013)

Características del trabajo de parto que son considerados como factores de riesgo incluyen: el trabajo de parto pretermino (menos de 37 semanas), fiebre materna durante el trabajo de parto (mayor a 36°C) y ruptura de membrana prolongada (mayor a 18 horas). (Morgan JA & Cooper DB, 2018). Sin embargo, estudios recientes indican que más de la mitad de los casos de infección neonatal se presentan en ausencia de estos factores de riesgo. Un factor determinante para el desarrollo de infección neonatal es la existencia en la embarazada de un bajo título de anticuerpos frente a la cepa colonizante. (de Cueto, 2005).

Aproximadamente 10 a 30 % de las mujeres embarazadas tienen colonización genital por EGB. Las pacientes colonizadas tienen 25 veces más probabilidad que las pacientes no colonizadas, de tener a un bebé que desarrolle la enfermedad de inicio temprano por EGB. Sin medidas preventivas el 1 al 2 % de los bebés nacidos de madres colonizadas con EGB desarrollará la infección de inicio temprano. (Morgan JA & Cooper DB, 2018)

#### **P. Métodos de diagnóstico.**

La principal defensa contra la enfermedad neonatal de comienzo temprano por EGB es la administración profiláctica de antibióticos a la madre durante el trabajo de parto, por lo que

resulta importante identificar a las pacientes que se beneficiarían con esta medida profiláctica, por tal motivo el método de detección del EGB debe ser confiable.

## **6. Obtención de la muestra**

El momento de la obtención de la muestra es importante para la identificación de madres colonizadas debido a que el estado de colonización puede variar durante el embarazo. La colonización materna a comienzo del embarazo no es un factor predictivo para enfermedad neonatal de comienzo temprano debido a que la colonización puede ser transitoria, por tal motivo el screening se realiza en el tercer trimestre. El valor predictivo negativo del cultivo para EGB realizado a las 5 semanas antes del parto es de 95 a 98%, sin embargo, la utilidad clínica disminuye cuando el cultivo prenatal se lleva a cabo con más de 5 semanas del parto porque el valor predictivo negativo disminuye. (Verani JR, et al; 2010) El centro para el control y prevención de enfermedades (CDC) recomienda un screening universal basado en cultivo de muestra rectovaginal para EGB en todas las pacientes entre las semanas 35 a 37 de gestación. Los cultivos se deben realizar en este periodo porque el valor predictivo negativo del cultivo para EGB es mayor (95% a 99%) en las primeras 5 semanas después de la obtención de la muestra. (Morgan JA & Cooper DB, 2018)

Para el estudio de las gestantes portadoras se recomienda la toma conjunta de muestra vaginal y anorrectal en la 35-37 semana de gestación. Hisopar tanto la vagina como el recto aumenta el rendimiento del cultivo comparado con hisopar solo la vagina. El uso de medios de transporte adecuados puede ayudar a mantener la viabilidad del EGB en áreas donde no es posible el procesamiento inmediato por el laboratorio, sin embargo la recuperación disminuye entre los 1 a 4 días principalmente a elevadas temperaturas. (Verani JR, et al; 2010).

## 7. Medios de cultivo

El EGB puede crecer en medios simples, pero favorece su crecimiento el suplemento del medio con sangre y el empleo de medios selectivos favorece su recuperación. Como agentes selectivos se emplean, gentamicina, ácido nalidíxico, colistina o cristal violeta. Como técnica de cultivo, tradicionalmente, se ha recomendado el empleo de caldos de enriquecimiento selectivos (por ejemplo, el caldo Todd-Hewitt), con posterior subcultivo en agar sangre. El cultivo para EGB en agar Columbia tiene una sensibilidad del 56%, una especificidad del 84%, VPP de 52% y VPN de 86%; mientras que cuando es precedido por enriquecimiento selectivo, estos valores son de 78% sensibilidad, 84% de especificidad, 60 % de VPP y 93% de VPN. (El Aila NA, et al., 2010)

Sin tomar en cuenta el medio seleccionado para la identificación del EGB, el uso de un caldo de enriquecimiento aumenta su detección sustancialmente; cuando se siembra directamente la muestra en el agar sin usar un caldo de enriquecimiento hasta un 50% de mujeres colonizadas pueden tener un resultado negativo. Ejemplos de estos caldos son el caldo Todd-Hewitt suplementado con gentamicina (8ug/mL) y ácido nalidíxico (15ug/mL) o caldo TransVag; o con colistin (10ug/mL) y ácido nalidíxico (15ug/mL) o caldo Lim. La adición de 5% de sangre de carnero puede aumentar la recuperación del EGB. Los caldos de enriquecimiento selectivo pueden contener sustancias cromogénicas que cambien de color ante la presencia del EGB hemolítico lo que puede facilitar su detección, sin embargo los EGB no hemolíticos no serían detectados. Esta etapa de enriquecimiento aumenta el tiempo en el que se obtiene el resultado final, pero para este screening la exactitud del resultado es más importante que el tiempo. (Verani JR, et al; 2010).



El uso de un caldo de enriquecimiento selectivo como Todd-Hewitt suplementado con 15 ug/mL de ácido nalidíxico y 8 ug/mL de gentamicina ayuda a suprimir el desarrollo de la microbiota intestinal gram negativa.

Durante esta etapa de enriquecimiento selectivo se ha observado que el *Enterococcus faecalis*, presente en las muestras vaginorectales, puede suprimir el crecimiento del EGB causando que los cultivos sean negativos para EGB; este tipo de resultados falsos negativos pueden evitarse inoculando un medio de cultivo adecuado antes del enriquecimiento en caldo. (Rosa-Fraile M & Spellerberg B; 2017).

Después del enriquecimiento el método convencional para la identificación del EGB es a través de su aislamiento en placas de agar sangre e identificación presuntiva por test CAMP o identificación serológica por aglutinación en latex empleando antisuero para el EGB. (Verani JR, et al; 2010)

#### **d. Agar sangre de carnero**

Cuando se sospecha estreptococos, las muestras para cultivo deben sembrarse en un medio apropiado que contenga sangre con una base de peptona lo suficientemente rica como para favorecer el desarrollo de estos microorganismos con requerimientos nutricionales especiales. El medio base de agar debe ser un medio de infusión de peptona a la que se agrega sangre de carnero en una concentración del 5% como células indicadoras de hemólisis. Las concentraciones más bajas de sangre en los medios hacen más difícil el reconocimiento de la reacción hemolítica, mientras que las concentraciones más altas pueden ocultar por completo la hemólisis. La observación y la interpretación correcta de las propiedades

hemolíticas de los estreptococos son muy importantes porque la realización de pruebas ulteriores se basa sobre esta evaluación inicial. Después de 18 a 24 horas de incubación en agar sangre, las colonias de estreptococos beta hemolíticos del grupo B tienen 0,5 mm de diámetro o más, el margen de hemólisis alrededor de la colonia es reducido y en general la hemólisis es más tenue y menos evidente, en comparación con otros estreptococos beta hemolíticos. Una proporción importante de estreptococos del grupo B (hasta 11%) pueden ser no hemolíticos. (Winn, et al; 2013)

#### **e. Medios cromogénicos**

Existen medios cromogénicos que cambian de color ante la presencia del EGB, estos medios pueden facilitar la detección de cepas hemolíticas pero la mayoría no detecta a los no hemolíticos. (Verani JR, et al; 2010)

Los medios de cultivo cromogénico contienen sustratos de enzimas ligados a cromógenos e indoxyl, los microorganismos blanco son caracterizados por sistemas enzimáticos específicos que metabolizan el sustrato y producen la liberación del cromógeno, subsecuebtamente las moléculas de indoxyl son oxidadas en la presencia de oxígeno y el compuesto indigo formado precipita dentro de las colonias dando un color de contraste brillante. Estos medios deben ser incubados en atmósfera normal debido a que la incubación en anaerobiosis suprime el desarrollo de colonias coloreadas al impedir la oxidación del compuesto indoxyl. Debido a la presencia de compuestos cromogénicos estos medios no deben ser expuestos a la luz. Estos medios también contienen compuestos selectivos para incrementar la selctividad. (Rosa-Fraile, M & Spellerberg, B; 2017).

Los medios cromogénicos no son 100% sensibles ni específicos; la falta de un cromógeno específico para EGB limita su especificidad. Otras especies bacterianas presentes en las muestras rectovaginales como *Enterococcus spp*, *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus spp*, también pueden desarrollar como colonias semejantes a EGB, por lo tanto para evitar el reporte de resultados falsos positivos, los medios cromogénicos para EGB requiere confirmación de las colonias sospechosas mediante otras pruebas adicionales. Los medios cromogénicos no se basan en la detección de pigmento del EGB y por lo tanto tienen la capacidad de detectar cepas no hemolíticas. En muestras en las que existe un gran desarrollo de bacterias comensales puede ser difícil detectar un pequeño número de colonias de EGB, aunque sea raro, se han reportado resultados falsos negativos en cepas que forman colonias de apariencia atípica. (Rosa-Fraile, M & Spellerberg, B; 2017).

Chromagar Strep B es un medio de cultivo empleado para el aislamiento y diferenciación del *Streptococcus agalactiae* (EGB). En comparación con el agar sangre CNA y Granada tendría las siguientes ventajas: fácil interpretación por la lectura más fácil gracias a una intensa coloración de colonias malva, alta sensibilidad por la detección de EGB, incluyendo cepas no hemolíticas, con una sensibilidad cercana al 100%, alta especificidad al permitir la diferenciación de EGB de otras bacterias por inhibición selectiva o por contra-coloración, rapidez debido a que los resultados podrían leerse en 18-24h, simplicidad por incubación en condiciones aeróbicas sin necesidad de CO<sub>2</sub>.

El empleo de un medio de cultivo cromogénico como CHROMagar Strep B facilita la lectura por la coloración malva de las colonias y tiene propiedades selectivas que inhibe el desarrollo

de la mayoría de bacilos gram negativos, estafilococos, levaduras y lactobacilos que puedan estar presentes en las muestras.

#### **f. Otros medios de cultivo**

El estreptococo del grupo B, a diferencia de otros estreptococos beta hemolíticos, produce un pigmento de color rojo naranja llamado granadina, que es característico y por tanto es un método específico que permite su identificación. A pesar de esta ventaja, la expresión de granadina esta invariablemente ligada a la expresión de la beta hemolisina porque ambas están codificadas en un solo locus genético y por lo tanto las cepas no hemolíticas no producen este pigmento y por lo tanto no pueden ser detectadas por este método. Para la detección de este pigmento se utiliza el medio de Granada en el cual, las cepas beta hemolíticas de EGB producen colonias pigmentadas. Existen dos clases de medio de cultivo de granada: el agar y el caldo; de los cuales, el agar debe ser incubado en anaerobiosis. (Rosa-Fraile, M & Spellerberg, B; 2017).

### **8. Identificación**

La identificación de la bacteria, a partir de las colonias aisladas, se puede realizar mediante la detección de antígeno o mediante pruebas bioquímicas; un aislamiento estreptocócico se puede clasificar de forma provisional dentro del grupo B basándose en las pruebas bioquímicas, como la hidrólisis de agar de esculina y bilis (99 a 100% negativos), la sensibilidad a la bacitracina (resistencia en 92% de las cepas) y la producción de factor CAMP (resultados positivos en 98 a 100%). (Dennis L., et al; 2005).

#### **f. Test de CAMP**

La prueba de CAMP (denominada así por Christie, Atkins y Munch-Petersen) se utiliza para identificar presuntivamente estreptococos del grupo B. El factor CAMP no es por si solo hemolítico pero lisa eritrocitos de carnero pretratados con la beta lisina estafilocócica. Se realiza utilizando una cepa de *S. aureus* productora de beta hemolisina (ATCC 25923). El test de CAMP consiste en realizar una estría de la cepa a probar perpendicularmente a una estría de la cepa de *Stafilococcus aureus* en agar sangre de carnero. Los estreptococos del grupo B secretan una proteína llamada factor CAMP que interactúa con la beta hemolisina producida y secretada por *S. aureus* para producir una hemólisis mayor o sinérgica, esta aparece como un área en forma de puntade flecha de mayor hemólisis en el lugar donde las dos líneas de crecimiento están más proximas. (Winn, et al; 2013). Esta prueba es altamente sensible pero no es 100% específica ya que algunas cepas de estreptocococs del grupo A pueden producir el factor CAMP; a pesar de ello, tiene la ventaja que esta citolisina es diferente de la beta hemolisina y del pigmento del EGB y, por lo tanto, esta presente en cepas no hemolíticas y/o no pigmentadas. (Rosa-Fraile, M & Spellerberg, B; 2017).

#### **g. Sensibilidad a la bacitracina**

Se utiliza para la identificación presuntiva de estreptococos beta hemolíticos. La prueba se realiza en un medio de agar sangre con un disco diferencial de bacitracina de 0,04 Unidades. Cualquier zona de inhibición alrededor del disco se considera una prueba positiva. Aunque es una prueba económica, simple y bastante precisa, no es altamente específica (5% de las cepas del EGB pueden ser sensibles a bacitracina). En consecuencia esta prueba se realiza a menudo junto con la prueba de sensibilidad a trimetoprim sulfametoxazol porque los estreptococos de

los grupos C y G suelen ser sensibles a este antibiótico, mientras que los estreptococos del grupo A y B son resistentes. (Winn, et al; 2013)

#### **h. Sensibilidad a sulfametoxazol trimetoprim**

Distingue presuntivamente los estreptococos de los grupos A y B de otros estreptococos beta hemolíticos. Cuando se utiliza junto con la prueba de la bacitracina, ayuda a separar los estreptococos no A, no B, que pueden ser sensibles a la bacitracina, porque tanto las cepas A como B son resistentes al SXT, mientras que los grupos C, F y G son sensibles. La prueba se efectúa de la misma forma que la bacitracina salvo que se utiliza un disco que contiene 1,25 ug de trimetoprim y 23,75 ug de sulfametoxazol. Cualquier zona de inhibición indica sensibilidad a SXT. (Winn, et al; 2013)

#### **i. Prueba de bilis esculina**

Esta prueba se utiliza para la identificación presuntiva de especies de *Enterococcus* y estreptococos del grupo D. Los microorganismos que son bilis esculina positivos pueden crecer en presencia de bilis al 40% e hidrolizar la esculina produciendo un color negro dentro de las 24 horas. (Winn, et al; 2013).

#### **j. Otras pruebas de identificación**

##### **Hidrólisis del hipurato de sodio**

Los estreptococos del grupo B pueden hidrolizar el hipurato en glicina y ácido benzoico. Para la prueba se inocula el microorganismo en caldo con hipurato de sodio y se incuba durante toda la noche a 35°C, las células se centrifugan y se extrae el sobrenadante al cual se agrega

un reactivo con cloruro férrico con formación de un precipitado pesado. Si el precipitado se mantiene luego de 10 minutos hay ácido benzoico y la prueba de hidrólisis del hipurato es positiva. Como alternativa puede agregarse reactivo de ninhidrina al sobrenadante para detectar glicina libre, con este método la aparición de un color azul intenso es positiva. (Winn, et al; 2013)

La mayoría de las cepas de EGB hidrolizan hipurato de sodio produciendo glicina; sin embargo, otros estreptococos, particularmente enterococos también producen reacciones positivas; la falta de especificidad reduce su uso en la identificación confiable de EGB. (Rosa-Fraile, M & Spellerberg, B; 2017).

### **Pirrolidonil arilamidasa (PYR)**

La prueba de hidrólisis de PYR es una prueba presuntiva para estreptococos del grupo A y grupo D; reemplaza a la prueba de la bacitracina. La enzima detectada se llama pirrolidonil arilamidasa, se inocula caldo que contiene PYR L-pirrolidonil-B-naftilamida con el microorganismo y se incuba a 35°C durante 4 horas. Durante este tiempo se hidroliza PYR y se detecta b-naftilamida libre mediante el agregado del acoplador de colorante diazo N, N-dimetilaminocinnamaldehído. Se desarrolla color rojo si PYR ha sido hidrolizado. Esta prueba es altamente sensible para estreptococos del grupo A y la mayoría de las especies de *Enterococcus*. (Winn, et al; 2013). Por lo tanto puede ser empleada para diferenciar EGB (resultado negativo) de enterococos beta hemolíticos y estreptococos del grupo A que dan resultados positivos. (Rosa-Fraile, M & Spellerberg, B; 2017).

## **Aglutinación en latex**

Las colonias con características similares a EGB pueden ser sometidas a test de aglutinación en latex que determinan la presencia del antígeno del grupo B de Lancefield; estos test son específicos debido a que *Streptococcus agalactiae* es la única especie de estreptococo que alberga este antígeno; sin embargo, *Streptococcus porcinus*-que puede estar presente en el tracto genital de mujeres embarazadas- tiene reacciones cruzadas con EGB en estos test de aglutinación; por este motivo las cepas positivas requieren otras pruebas de identificación. (Rosa-Fraile & Spellerberg; 2017)

Las pruebas de aglutinación en latex han sido utilizadas para el diagnóstico rápido de infecciones sistémicas por EGB, sobre todo meningitis durante el periodo neonatal. La sensibilidad de los productos de aglutinación en latex para la detección de antígenos de estreptococos del grupo B varía entre alrededor del 85% al 100% aunque algunos estudios han comunicado sensibilidades de tan solo 27% a 54%. La especificidad varía entre el 80% y 100%. A pesar de la realización de estas pruebas en ensayos clínicos que condujeron a la aprobación para su uso, muchos laboratorios han dejado de ofrecerlas de rutina ya que además del costo relativamente alto, no se ha confirmado su utilidad diagnóstica y pronóstica después de años de experiencia. Los métodos de detección directa de EGB en muestras rectovaginales son relativamente poco sensibles en comparación con el método de amplificación en caldo recomendado por la CDC. Los ensayos rápidos en formato de aglutinación en latex no deben utilizarse para el cribado de muestras de hisopados rectovaginales para EGB. (Winn, et al; 2013). En el Documento de Consenso Español para la prevención de la infección neonatal por el Estreptococo del grupo B, se ha desaconsejado expresamente, para determinar la



colonización por este microorganismo en las gestantes, el empleo de técnicas de detección de antígeno directamente sobre exudados vaginales o rectales, por la elevada frecuencia de resultados falsos negativos.

La prueba de confirmación es el test de aglutinación en latex para estreptococo del grupo B, no obstante, existe el reporte del aislamiento de una cepa aislada del hisopado vagino-rectal de una mujer embarazada sometida a screening para EGB; cuyas colonias en agar sangre de carnero era beta hemolíticas semejantes al EGB que mostró aglutinación con el antisuero del grupo B de Lancefield pero era CAMP negativa. Después de realizar otras pruebas de identificación se confirmó que el aislamiento correspondía a *Enterococcus faecalis*. De la misma forma, fue identificado en otra mujer embarazada un *Enterococcus durans* que presentaba aglutinación con antisueros de Lancefield del grupo A, B, C, D, F y G. (Savini et al, 2015).

## **9. Técnicas de biología molecular**

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos para EGB, como la reacción en cadena de la polimerasa, pueden realizarse del caldo de enriquecimiento o después del subcultivo, cuando estos métodos se emplean a partir de muestras no enriquecidas tienen una sensibilidad variable entre 62,55 y 98,5% y especificidad entre 64,5% y 99,6% comparados con el gold estándar; la sensibilidad aumenta entre 92,55 al 100% con el uso de un paso de enriquecimiento previo; sin embargo esto aumenta el tiempo en el que se obtiene el resultado. (Verani JR, et al; 2010)

A pesar de que estas pruebas permitirían tener resultados específicos y sensibles en menos tiempo, su uso es limitado, la información actual no indica su uso en reemplazo al cultivo a las

35 a 37 semanas de gestación o el criterio basado en riesgos utilizado en mujeres con un estado desconocido de colonización al momento del parto; además, el tiempo adicional que requiere el enriquecimiento de la muestra impide que pueda ser empleado en el momento del parto y la sensibilidad de las pruebas en ausencia de este paso no es adecuado en comparación con el cultivo. Sumado a todo esto se debe considerar la complejidad del método, requerimiento de personal, ambientes y equipamiento y los costos y que no permite realizar el test de susceptibilidad para mujeres alérgicas a la penicilina. (Verani JR, et al; 2010)

### **10. Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos**

Los aislamientos de estreptococos beta hemolíticos no sensibles a penicilina o ampicilina son extremadamente raros por lo que se considera que las cepas de EGB mantienen sensibilidad a estos antimicrobianos; por este motivo las pruebas de susceptibilidad a la penicilina y ampicilina- antibióticos de elección para el tratamiento de estreptococos beta hemolíticos- no se realizan de forma rutinaria en estos aislamientos. En mujeres con alergia a la penicilina que tienen un elevado riesgo de anafilaxis el antibiótico más usado es la clindamicina; cuando se aísla un EGB en este tipo de población deben realizarse pruebas de sensibilidad antimicrobiana para determinar resistencia a la clindamicina debido a que la resistencia a este antimicrobiano está incrementando. Para ello se emplea el método de difusión del doble disco con eritromicina y clindamicina (test-D), para identificar resistencia inducible; los aislamientos que tienen el test D positivo se considera que tienen resistencia inducible a clindamicina y por lo tanto se deben considerar resistentes a este antimicrobiano. (CLSI; 2016).

## **Q. Tratamiento**

Desde la década de 1980 se reportó que administrar tratamiento antibiótico intraparto a las mujeres embarazadas colonizadas por EGB reduce la transmisión vertical y desde 1996 esta práctica fue recomendada por el centro de control de enfermedades. (Rosa-Fraile M & Spellerberg B; 2017).

La administración endovenosa de antibióticos intraparto a las gestantes portadoras, iniciada cuatro horas antes o más antes del nacimiento, es la única medida eficaz actualmente aceptada para interrumpir la transmisión vertical y evitar la sepsis neonatal. Después de la administración intraparto de penicilina G la colonización genital disminuye rápidamente lo que puede explicar su efecto como profiláctico. La administración de antibióticos durante la gestación resulta ineficaz para erradicar la colonización vaginal, ya que, al suprimir el tratamiento, la vagina vuelve a colonizarse a partir del recto. Se recomienda la administración de profilaxis intraparto en las siguientes circunstancias: a) en todas las mujeres identificadas como portadoras vaginales o rectales durante la gestación, b) en todos los partos de menos de 37 semanas en los que se desconozca si la gestante es o no portadora, c) en todas las embarazadas que hayan presentado bacteriuria por el estreptococo del grupo B en la gestación, d) en las mujeres que previamente hayan tenido un hijo con enfermedad perinatal por este microorganismo demostrada, independientemente del resultado de los cultivos de seguimiento, y e) cuando no se disponga de los resultados del cultivo, pero existan factores de riesgo tales como la rotura prolongada de membranas (>18 h), o la presencia de fiebre intraparto (>38° C).

Se recomienda administrar, al comienzo del trabajo de parto ampicilina i.v., penicilina G i.v. En caso de alergia a los  $\beta$ -lactámicos, puede utilizarse la clindamicina i.v. o eritromicina i.v. (Ohlsson A & Shah VS; 2014).

La penicilina G intravenosa es el tratamiento de elección para la profilaxis antibiótica intraparto contra el EGB. Se debe administrar 5 millones de unidades de Penicilina G intravenosa, seguido de 2.5 a 3 millones de unidades cada 4 horas durante el trabajo de parto. El objetivo es obtener una concentración adecuada de antibiotico en el líquido amniótico y circulación fetal. La ampicilina es una alternativa si la penicilina no esta disponible, la dosificación de ampicilina es 2 gramos por vía intravenosa seguido de 1 gramo cada 4 horas hasta el parto. Estos antibióticos no deben ser administrados en pacientes con alergia a la penicilina; el tratamiento profiláctico en aquellas pacientes con antecedentes de anafilaxis, angioedema, distres respiratorio o urticaria tras el uso de penicilinas o cefalosporinas es guiado por las pruebas de sensibilidad antimicrobiana; si el EGB es sensible tanto a eritromicina como a clindamicina entonces se debe dar clindamicina intravenosa 900 mg cada 8 horas. Si el resultado de las pruebas de sensibilidad indican que la bacteria es resistente a clindamicina, se debe dar vancomicina intravenosa 1 gramo cada 12 horas. La cefazolina puede ser administrada si la paciente no tiene antecedentes de anafilaxis, angioedema, distres respiratorio o urticaria tras el uso de penicilinas o cefalosporinas, en una dosificación de 2 gramos intravenosa seguido de 1 gramo cada 8 horas hasta el parto. (Morgan JA & Cooper DB, 2018)

La microbiota genital materna, incluido el EGB, parece que no desarrolla resistencia antibiótica por presión selectiva después de la administración de la profilaxis antibiótica intraparto. (Patras KA & Nizet V; 2018).

El tratamiento profiláctico no puede aplicarse indiscriminadamente a todas las embarazadas, debido a las posibles reacciones adversas y al costo que ello supondría; solamente debe administrarse a aquellas gestantes en las que se demuestre colonización vaginal/rectal por el estreptococo del grupo B entre las 35 y 37 semanas del embarazo. (Alvarez CA, Toraño PG & Llanes CR, 2014). La exposición a antibióticos en la etapa neonatal se ha asociado a cambios en el microbioma. (Cotten CM; 2015). Asimismo el incremento en la profilaxis antibiótica intraparto podría asociarse con un cambio en los patógenos que causan sepsis en neonatos pretermino o con bajo peso al nacer, pudiendo convertir a *Escherichia coli* como el agente más prevalente. (Heath PT & Jardine LA; 2014).

Existen revisiones que evalúan el uso de clorexidina vaginal en forma de lavados, gel o crema durante el parto como una posible forma de reducir la infección; sin embargo no ha sido asociado con reducción de ninguno de los principales resultados de la infección de inicio temprano por el EGB (sepsis, meningitis, neumonía); no existen estudios que soporten el uso de desinfección genital con clorexidina en el parto para prevenir la enfermedad de inicio temprano por EGB. (Ohlsson A, et al; 2014).

## **R. Prevención**

Existen dos enfoques para la prevención de la enfermedad neonatal de comienzo temprano por el EGB: manejo basado en el riesgo y screening basado en cultivo antes del parto. (Homer CS, et al; 2014).

Para la prevención de la enfermedad de inicio temprano por el EGB existen las siguientes recomendaciones: (Money D. & Allen V; 2013)

1. Ofrecer a todas las mujeres entre las semanas 35 a 37 de gestación un screening para la colonización por EGB a través de cultivo vaginal y rectal.
2. Dar profilaxis antibiótica intravenosa al iniciar el parto o cuando exista ruptura prematura de membrana a toda mujer con cultivo vagini-rectal positivo para EGB realizado entre las semanas 35 a 37, a toda mujer con un infante previamente infectado con EGB y a toda mujer con bacteriuria por EGB en el actual embarazo.
3. Manejar a toda mujer con menos de 37 semanas de gestación con trabajo de parto o con ruptura prematura de membranas con profilaxis antibiótica para EGB por un mínimo de 48 horas, a menos que tenga un cultivo vagino-rectal negativo para EGB o un test rápido basado en la detección de ácido nucleico realizado en las pasadas 5 semanas.
4. Tratar a todas las mujeres con fiebre intraparto y signos de corioamnionitis con antibióticos intravenosos de amplio espectro, sin importar el estado de EGB y la edad gestacional.

5. Solicitar test de susceptibilidad antimicrobiana a los aislamientos de EGB aislados de orina y de hisopados vagino-rectales en todas las mujeres en las que se sospecha que tienen un riesgo significativo de anafilaxis con penicilina.

6. Pasadas las 37 semanas de gestación, si se desconoce el estado de colonización por EGB porque no se haya realizado el cultivo o si los resultados del cultivo no están disponibles y existe ruptura de membranas por más de 48 horas se debe administrar profilaxis antibiótica intravenosa por EGB.

7. Si una mujer con ruptura prematura de membranas con menos de 37 semanas de gestación tiene cultivo positivo para EGB o no se conoce su estado de colonización se debe administrar profilaxis antibiótica intravenosa para EGB por 48 horas, así como otros antibióticos si fuera indicado, mientras se espera el parto.

Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los EE.UU. (CDC), en conjunto con diversas asociaciones médicas de dicho país, en su última revisión del año 2010 recomiendan la búsqueda intencionada de colonización vaginal o rectal por EGB en toda mujer embarazada entre las semanas 35 y 37 de gestación, para evaluar el uso de Profilaxis antibiótica intraparto la cual sería administrada a toda mujer embarazada colonizada. Para la PAI se administra, durante por lo menos 4 horas antes del parto y hasta el alumbramiento, penicilina G por vía intravenosa (i.v.) en una dosis inicial de 5 millones de unidades internacionales (UI) seguida por una dosis de mantenimiento de 2.5 millones de UI cada 4 horas. La ampicilina (2 g i.v. dosis inicial seguida por 1 g i.v. cada 4 h) es una alternativa. En caso de alergia a la penicilina sin riesgo de anafilaxia se recomienda la administración de cefazolina, pero cuando existe dicho riesgo se recomienda la administración de clindamicina o

vancomicina. La cefazolina se recomienda por su capacidad de alcanzar concentraciones elevadas en el líquido amniótico y de prevenir la enfermedad de inicio temprano; se administra a una dosis inicial de 2 g seguida de 1 g cada 8 horas. La administración de 900 mg de clindamicina cada 8 horas solo puede utilizarse cuando el EGB aislado es sensible. Sin embargo, en los EE.UU., el 30% de los aislamientos de EGB son resistentes a la clindamicina, por lo que si se desconoce la sensibilidad de la cepa debe administrarse vancomicina, 1 g cada 12 horas. Se recomienda administrar esta profilaxis a todas las mujeres embarazadas con demostración de infección urinaria o bacteriuria por este microorganismo, a aquellas con un hijo previo con infección grave por EGB y a las que tienen un estado de colonización desconocido y parto pretérmino o con rotura de las membranas fetales  $\geq$  18 horas, o con fiebre. (SLIPE-2014; Phares CR, et al. 2008; . Pannaraj PS, 2014).

Se ha demostrado que un factor de riesgo mayor para el desarrollo de la enfermedad neonatal de inicio temprano y de inicio tardío por el EGB son concentraciones muy bajas de IgG materna dirigida contra los antígenos de la capsula de polisacáridos de la bacteria. Mujeres colonizadas con el EGB que tuvieron bebés sanos tuvieron concentraciones significativamente mayores de IgG anti la capsula de polisacáridos en comparación con mujeres cuyos bebés desarrollaron la enfermedad. Esta es la base para el desarrollo de una vacuna que provoque anticuerpos en la madre para proteger al bebé. (Baker; 2013) se espera que la vacuna de polisacárido conjugado (PCV por sus siglas en inglés) sea capaz de inducir en la madre, una respuesta inmunológica elevada de IgG anti polisacárido capsular del EGB y de esta forma pueda proteger al bebé mediante transferencia de estos anticuerpos a través de la placenta. (Lin SM, et al; 2018).



## **XXIV.DISEÑO METODOLÓGICO.**

### **F. Tipo o diseño de estudio.**

Test diagnóstico para la estimación de los índices de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo, y razones de verosimilitud positiva y negativa del medio de cultivo CHROMagar Strep B.

### **G. Sitio o contexto del estudio.**

Se tomaron muestras de hisopado vaginal y rectal de embarazadas entre 35 y 37 semanas de gestación que acudieron al Hospital de la Mujer para su control prenatal entre agosto y noviembre del 2016. Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Bacteriología del Instituto SELADIS.

### **H. Universo y población o muestra.**

Universo o población blanco: Mujeres embarazadas entre las semanas 35-37 de gestación.

Población accesible: Mujeres embarazadas entre las semanas 35-37 de gestación que acudieron a consulta externa en el turno de la mañana en el Hospital de la mujer en los meses de agosto a noviembre del año 2016.

### **7. Criterios de inclusión:**

Mujeres embarazadas que estaban entre las semanas 35-37 de gestación que acudieron a consulta externa en el turno de la mañana al hospital de la mujer entre

agosto a noviembre del año 2016, que decidieron participar voluntariamente en la investigación firmando el consentimiento informado (Anexos 1 y 2).

**8. Criterios de exclusión:**

Pacientes con tratamiento antibiótico 48 horas antes de la toma de muestra.

**9. Criterios de eliminación:**

No se eliminó ninguna muestra debido a que todas cumplieron los criterios de inclusión.

**I. Tamaño de la muestra**

El tamaño muestral se calculó con el software Epi Info, para un diseño de test diagnóstico, con un nivel de confianza del 95%, con un poder del 80%, con un error aceptable del 5%, una sensibilidad de 90% y una población accesible de 140 mujeres embarazadas atendidas en un trimestre en el Hospital de la Mujer, se obtuvo una muestra de 70 pacientes.

El muestreo fue no probabilístico consecutivo debido a que se seleccionaron a las pacientes que cumplían los criterios de inclusión, a medida que acudieron a la consulta en el período determinado.

## **J. Descripción de las técnicas y procedimientos más importantes**

### **1. Preparación de medios de cultivo.**

Se preparó caldo Todd Hewitt (Hardy Diagnostics), agar sangre (Oxoid) y CHROMagar™ Strep B (CHROMagar) de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes.

El caldo Todd Hewitt fue suplementado con gentamicina (8ug/mL) y ácido nalidíxico (15ug/mL) después de esterilizado.

Para ello se partió de una solución de gentamicina de 80 mg/mL y se añadió el volumen necesario para obtener una concentración final de 8ug/mL.

Para el segundo suplemento se preparó una solución madre de ácido nalidixico a partir de la sustancia pura (Laboratorios LAFAR, 99,6% de pureza) a una concentración de 500ug/mL; debido a que el ácido nalidíxico es muy poco soluble en agua se utilizó NaOH (1mol/L) gota a gota hasta solubilizarlo (2 gotas fueron suficientes para solubilizarlo) y se aforó con agua; a partir de esta solución madre se tomó el volumen necesario para suplementar el caldo a una concentración de 15ug/mL.

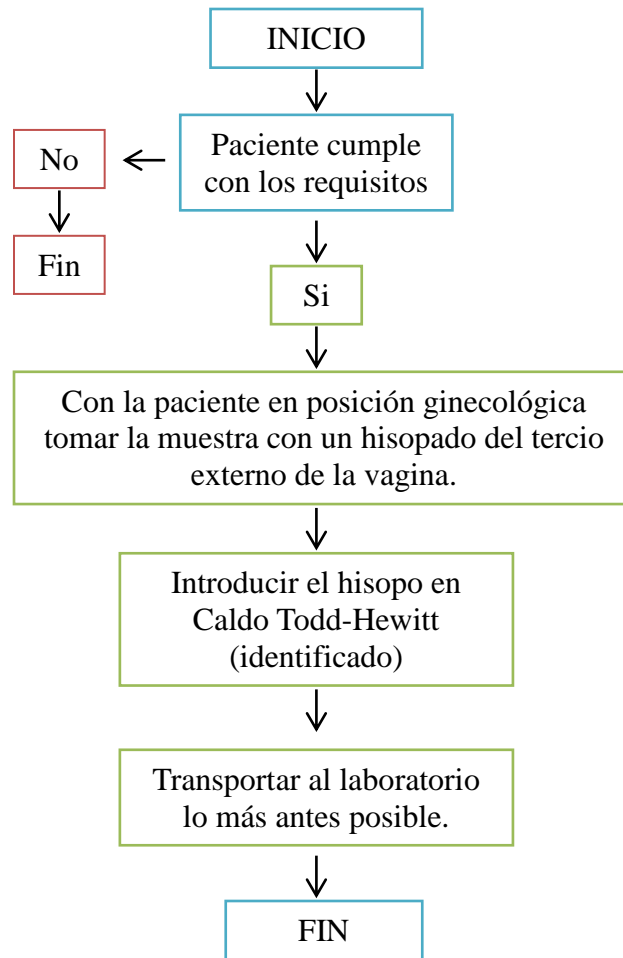
El agar sangre se preparó según las recomendaciones del fabricante y se suplementó con sangre de carnero (Matermed) al 5%.

Los medios se conservaron en refrigeración a 8°C hasta su utilización.

## **2. Obtención de muestras.**

Se tomaron muestras vaginales y rectales a gestantes que se encontraban entre las semanas 35 a 37 de gestación que acudieron al Hospital de la Mujer a su control prenatal, que decidieron voluntariamente formar parte del estudio y que firmaron el consentimiento informado. Se utilizó un código numérico/alfabético para identificar las muestras de cada paciente (Anexo 3) según el orden de atención de las mismas.

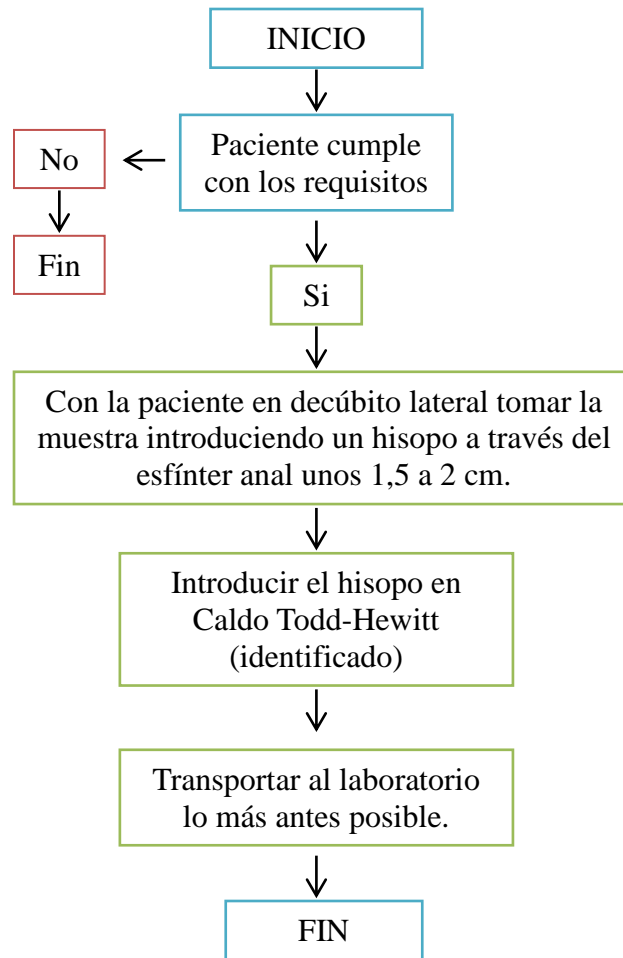
La muestra vaginal se tomó introduciendo un hisopo a la porción más externa de la vagina (sin utilizar espéculo), rotándolo contra la porción media de la pared vaginal; el hisopo fue retirado cuidadosamente para prevenir la contaminación con la microbiota de la piel.



Fuente: Laboratorio de Bacteriología, Instituto SELADIS.

**Figura N°1.** Procedimiento para la toma de muestra de hisopado vaginal.

Se utilizó un segundo hisopo para la muestra rectal, se introdujo el hisopo unos 1,5 cm a 2 cm a través del esfínter anal y se tomó la muestra realizando movimientos de rotación.



Fuente: Laboratorio de Bacteriología, Instituto SELADIS.

**Figura N°2.** Procedimiento para la toma de muestra de hisopado rectal.

Los hisopos se depositaron en dos tubos diferentes con caldo Todd Hewitt previamente identificados con el código de cada paciente, tipo de muestra y fecha y se transportaron al laboratorio lo más rápido posible.

### **3. Procesamiento de las muestras.**

#### **e. Enriquecimiento selectivo en Caldo Todd Hewitt**

Los hisopos con muestras de secreción vaginal y rectal fueron incubados en los tubos con medio de enriquecimiento selectivo Caldo Todd Hewitt suplementado con antibióticos (Gentamicina 0.8 mg/ mL y Ácido Nalidíxico 15 mg/mL) por un período de 18-24 horas a 37°C

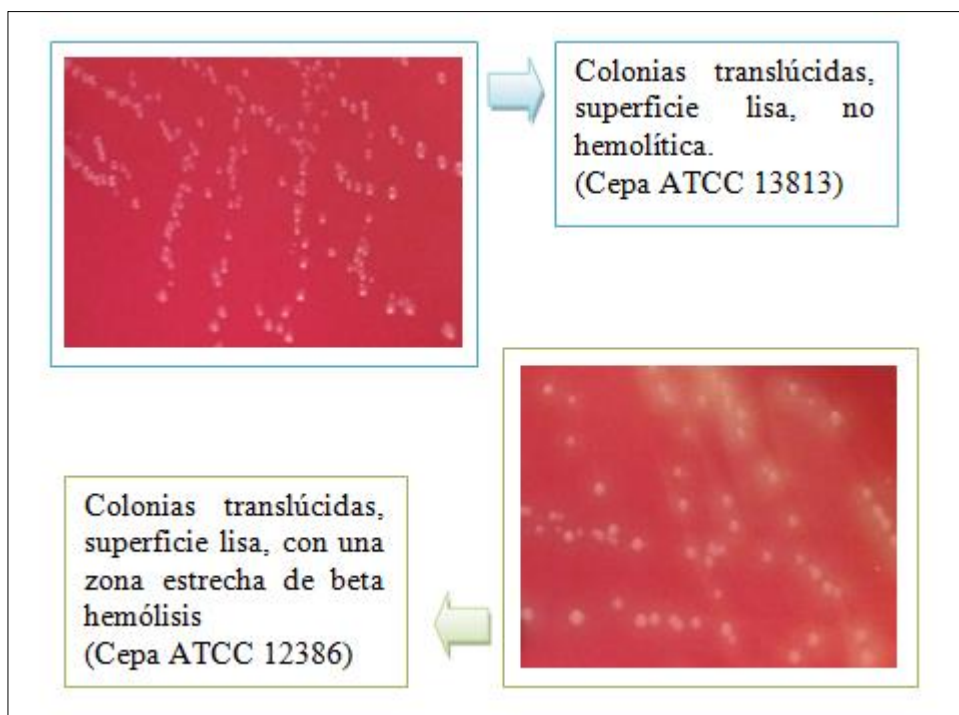
#### **f. Cultivo en agar sangre y CHROMagar Strep B**

Después de la incubación en Caldo Todd Hewitt se procedió a la siembra por estría agotamiento en agar sangre de carnero al 5% y CHROMagar Strep B.

Para evitar sesgos causados al momento de la lectura de los cultivos se recomienda procesar las muestras en diferentes tiempos en el gold estándar y en el medio en estudio para evitar que la lectura del desarrollo en el medio gold estándar influya en la lectura del agar cromogénico y viceversa; sin embargo en este estudio debido a las características de las muestras que no pueden ser guardadas para procesarlas después, y tampoco pueden ser tomadas en diferente momento (ya que la colonización puede ser transitoria o intermitente) se decidió identificar las muestras mediante códigos numérico/alfabéticos, de tal forma que la parte numérica fue utilizada para identificar el cultivo en agar sangre y la parte alfabética para identificar en CHROMagar y de esta manera evitar el posible sesgo creado por el investigador al momento de la lectura del desarrollo bacteriano.

Por lo tanto las cajas petri se identificaron con el código numérico/alfabético otorgado a cada paciente tomando el número para identificar las placas de agar sangre y la letra para identificar las placas de CHROMagar Strep B.

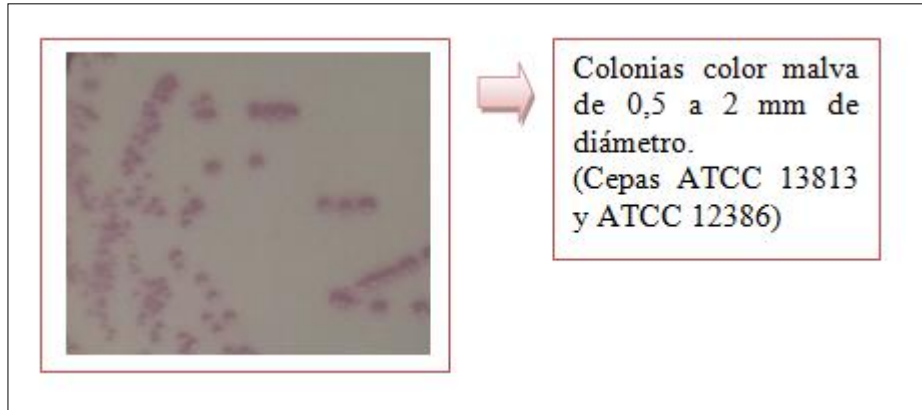
Las placas se incubaron 24 horas a 37 °C y se inspeccionaron por separado para la búsqueda de colonias sugestivas de estreptococo del grupo B; en agar sangre: colonias pequeñas de 0,5 a 1 mm de diámetro, translúcidas, superficie lisa, con una zona estrecha de beta hemólisis o no hemolíticas; en agar cromogénico: colonias de color malva; como se muestran a continuación:



Fuente: Laboratorio de Bacteriología, Instituto SELADIS.

**Figura N°3.** Características morfológicas de las colonias de *Streptococcus agalactiae* en Agar sangre de carnero.





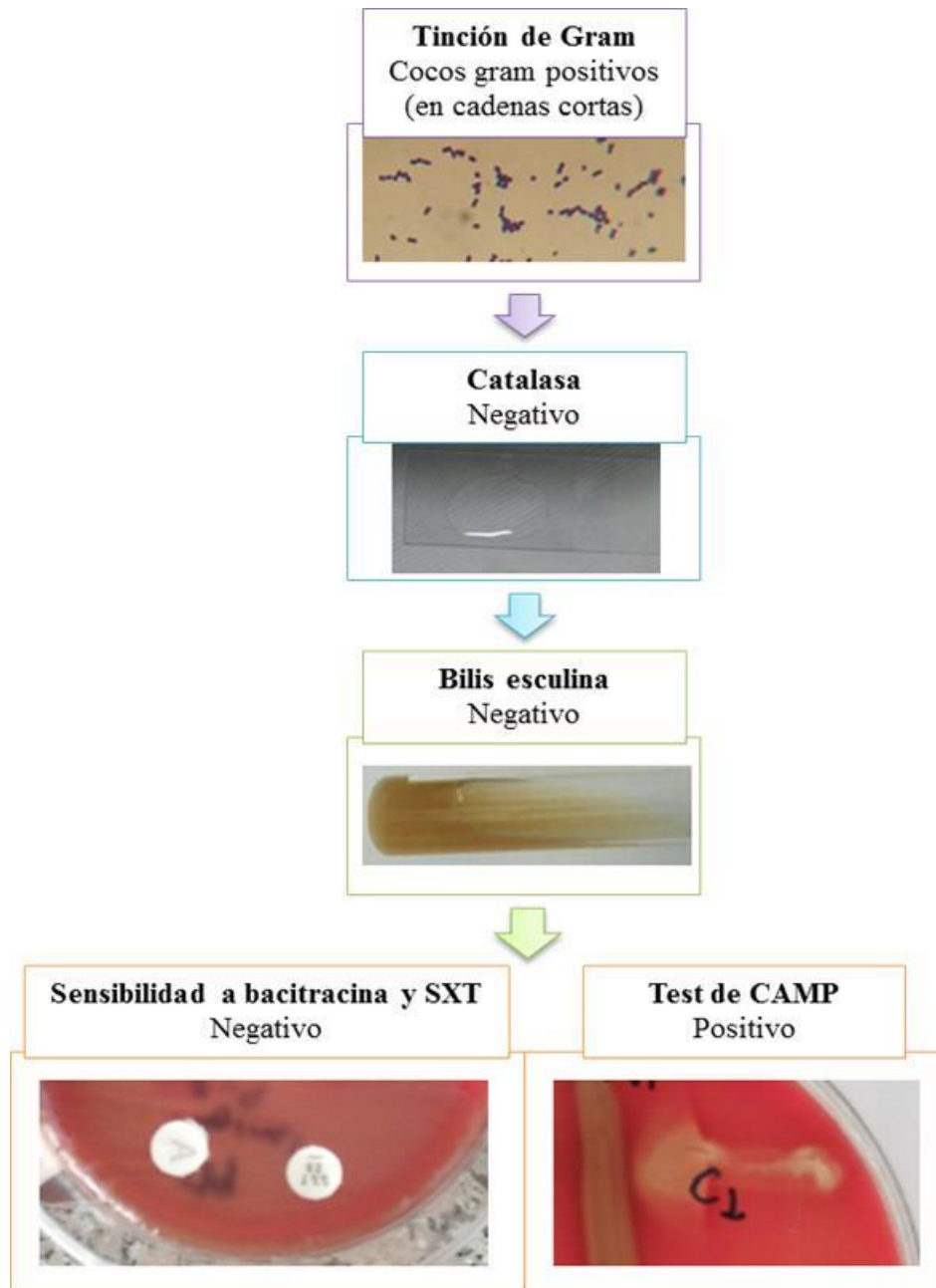
Fuente: Laboratorio de Bacteriología, Instituto SELADIS.

**Figura N°4.** Características morfológicas de las colonias de *Streptococcus agalactiae* en CHROMagar Strep B.

Si a las 24 horas no se observaba desarrollo de colonias características de *Streptococcus agalactiae* se re-incubaban las placas hasta las 48 horas y se inspeccionaban nuevamente.

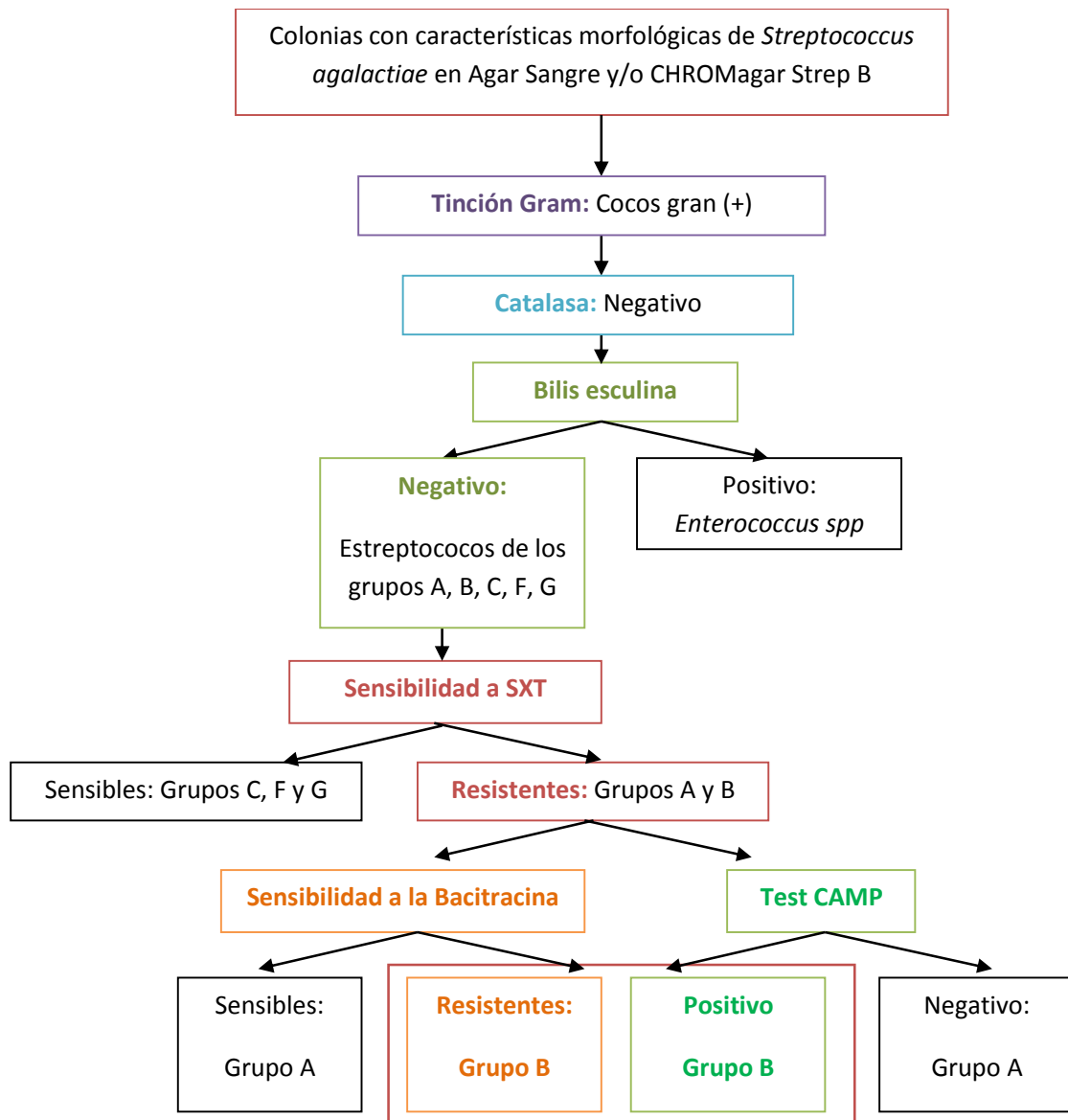
#### **g. Identificación**

A todas las colonias con características compatibles con *Streptococcus agalactiae* en agar sangre o CHROMagar Strep B fueron sometidas a pruebas de identificación (Anexo 4): tinción Gram, catalasa ( $H_2O_2$  al 3%), bilis esculina, sensibilidad a bacitracina 0,04 UI (BD Microbiology), sensibilidad a Sulfametoxazol-Trimetoprim (1,25ug de trimetoprim y 23,75ug de sulfametoxazol; Oxoid) y Test de CAMP, como se muestra a continuación:



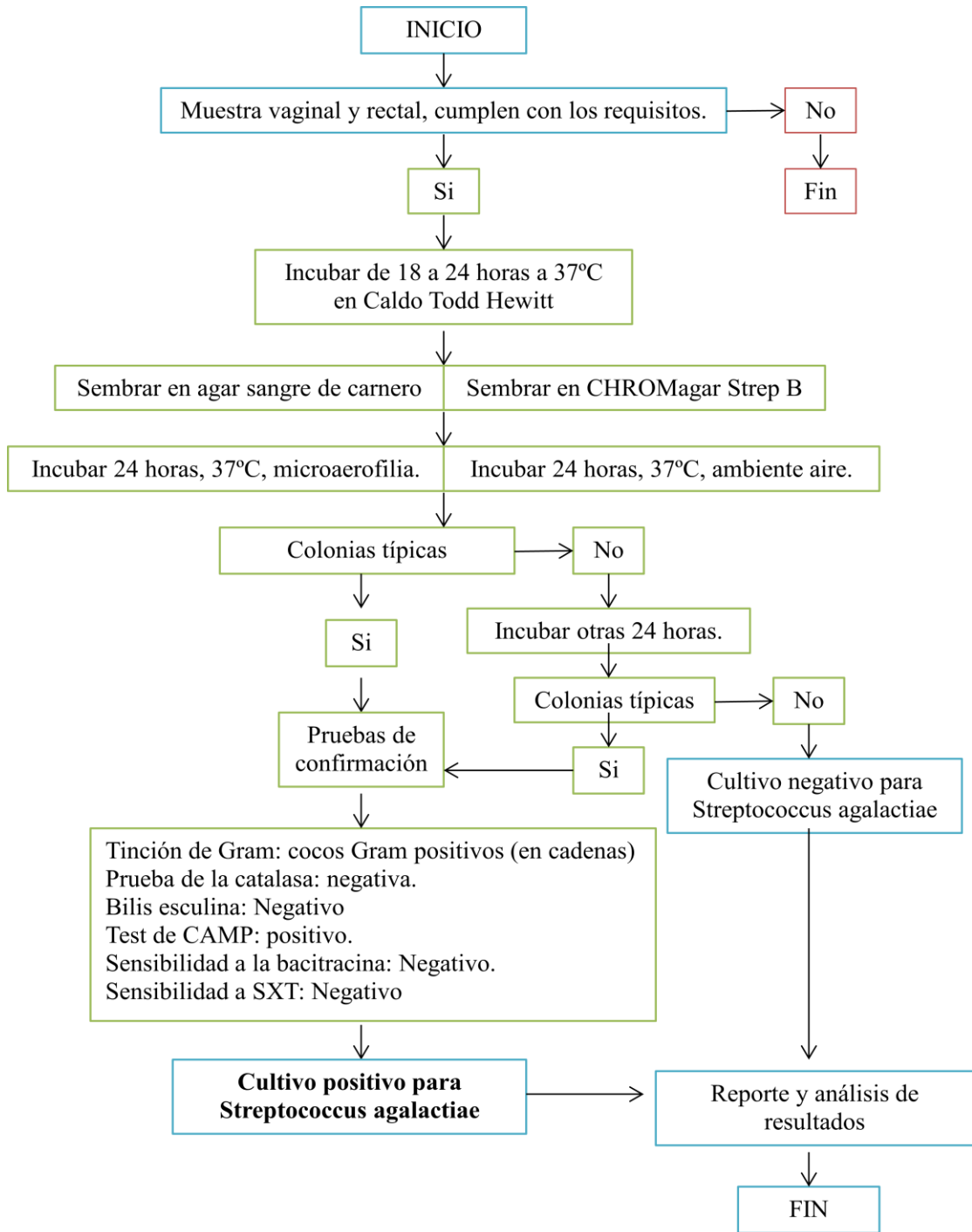
Fuente: Laboratorio de Bacteriología, Instituto SELADIS.

**Figura N°5.** Pruebas de identificación realizadas a las colonias con características morfológicas de *Streptococcus agalactiae* desarrolladas en Agar sangre y CHROMagar StrepB.



Fuente: Laboratorio de Bacteriología, Instituto SELADIS.

**Figura N°6.** Flujograma diagnóstico de las pruebas de identificación realizadas a las colonias con características morfológicas de *Streptococcus agalactiae* desarrolladas en Agar sangre y CHROMagar Strep B.



Fuente: Laboratorio de Bacteriología, Instituto SELADIS..

**Figura N°7.** Flujograma diagnóstico para el procesamiento de muestras.

#### **h. Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos**

Las cepas de *Streptococcus agalactiae* aisladas de pacientes que refirieron alergia a la penicilina fueron sometidas a pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos por el Método de Kirby - Bauer de acuerdo a las recomendaciones de la CLSI, para clindamicina de 2ug (Oxoid) y eritromicina de 15ug (Oxoid) utilizando el método de doble disco (test D) para la detección de resistencia inducible a la clindamicina. (Anexo 5).

#### **4. Control de calidad**

Se utilizaron las cepas ATCC de *Streptococcus agalactiae* 12386 (cepa beta hemolítica) y ATCC 13813 (cepa no hemolítica) para el control de calidad de los medios y de las pruebas de identificación.

#### **5. Análisis estadístico**

##### **Test a probar**

El test a probar es el cultivo en el agar cromogénico CHROMagar Strep B para detectar colonización vagino rectal materna por el EGB.

##### **Gold estándar**

Cultivo en agar sangre de carnero.

## Parámetros estadísticos utilizados

Se estimaron los siguientes parámetros estadísticos: Índice kappa, sensibilidad y especificidad diagnósticas, valores predictivos positivo y negativo, razones de verosimilitud positiva y negativa en base a la tabla de contingencia de doble entrada o tabla 2x2.

		Gold estándar		Total
		Positivo	Negativo	
Prueba analizar	a Positivo	Verdaderos	Falsos	a+b
		Positivos (a)	Positivos (b)	
	Negativo	Falsos	Verdaderos	c+d
		Negativos (c)	negativos (d)	
Total		a+c	b+d	(a+b+c+d)

Las fórmulas para el cálculo de los parámetros estadísticos son las siguientes:

$$\text{Índice de Kappa} = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

Donde:

Po: Porcentaje de acuerdos observados

Pe: Porcentaje de acuerdos esperados

$$Po = \frac{a+d}{N}$$

$$Pe = [(a+b)/n * (a+c)/n] + [(c+d)/n * (b+d)/n]$$

$$\text{Certeza diagnóstica} = \frac{a+d}{a+b+c+d}$$

$$\text{Sensibilidad} = \frac{A}{a+c}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{D}{b+d}$$

$$\text{VPP} = \frac{A}{a+b}$$

$$\text{VPN} = \frac{D}{c+d}$$

$$\text{RVP} = \frac{\text{Sensibilidad}}{1-\text{especificidad}}$$

$$\text{RVN} = \frac{1-\text{Sensibilidad}}{\text{Especificidad}}$$

$$\text{Prevalencia} = \frac{a+c}{a+b+c+d}$$

## Programa

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa de Microsoft Excel donde se calcularon los parámetros estadísticos a partir de las fórmulas expresadas anteriormente.

## **6. Aspectos bioéticos**

A cada paciente se le entregó una hoja de información (Anexo 1) y se le explicó el objetivo, la utilidad del estudio, los riesgos y beneficios si decidían formar parte del mismo; si la paciente decidía de forma libre formar parte del estudio se obtuvo su firma en un consentimiento informado, (Anexo 2) además para salvaguardar la confidencialidad de la paciente, toda la información se mantuvo en forma segura y anónima. No se dió a conocer los nombres de las pacientes ni en el proceso de elaboración de la tesis ni en los resultados de la misma.



## XXV.RESULTADOS

En el periodo de estudio fueron atendidas 86 pacientes embarazadas entre las semanas 35 a 37 de gestación, en consulta externa de ginecoobstetricia del Hospital de La Mujer como parte de su control prenatal. La edad promedio de las pacientes fue de 29 años. Se tomaron 172 hisopados ya que por cada paciente se recolectó un hisopado genital y un hisopado rectal.

De todas las pacientes, 6 resultaron positivas para colonización vaginal o rectal por *Streptococcus agalactiae* correspondiente al 6,97% de colonización. De las 6 pacientes colonizadas por esta bacteria, 2 fueron recuperadas por hisopado rectal y 4 por hisopado vaginal. Los resultados generales se muestran en la tabla 1.

**Tabla N° 1.** Cultivo de hisopados vaginal y rectal para *Streptococcus agalactiae* en CHROMagar Vs Agar Sangre de carnero.

	Agar Sangre		Total	
	Positivo	Negativo		
CHROMagar	Positivo	3	2	5
	Negativo	1	80	81
Total		4	82	86

Fuente: Laboratorio de Bacteriología, Instituto SELADIS.

La tabla de contingencia 2x2 muestra que de las 86 pacientes que participaron en el estudio se aislaron 6 cepas de *Streptococcus agalactiae*, de las cuales: 3 fueron aisladas por ambos métodos de cultivo, 2 fueron aisladas solo en CHROMagar Strep B y 1 fue recuperada solo en agar sangre. En base a la tabla de contingencia se obtuvieron los siguientes parámetros estadísticos:

**Tabla N° 2.** Parámetros estadísticos de validación del cultivo de muestras vaginales y rectales en CHROMagar Strep B vs Agar Sangre de carnero.

<b>Muestras vaginales y rectales</b>	
<b>Indicador</b>	<b>Porcentaje</b>
Índice de Kappa	0,65
Sensibilidad	75%
Especificidad	98%
Valor Predictivo Positivo	60%
Valor Predictivo Negativo	99%
Razón de verosimilitud positiva	30,8
Razón de verosimilitud negativa	0,3
Prevalencia	4,7%

Fuente: Laboratorio de Bacteriología, Instituto SELADIS.

**Tabla N° 3.** Cultivo de hisopados vaginal para *Streptococcus agalactiae* en CHROMagar Vs Agar Sangre de carnero.

		Agar Sangre		Total
		Positivo	Negativo	
CHROMagar	Positivo	2	1	3
	Negativo	1	82	83
Total		3	3	86

Fuente: Laboratorio de Bacteriología, Instituto SELADIS.

A partir de las muestras de hisopado genital se aislaron un total de 4 cepas de *Streptococcus agalactiae*, de las cuales: 2 fueron aisladas por ambos métodos de cultivo, 1 fue aislada solo en CHROMagar Strep B y 1 fue recuperada solo en agar sangre, obteniendo los siguientes parámetros estadísticos:

**Tabla N° 4.** Parámetros estadísticos de validación del cultivo de muestras vaginales en CHROMagar Strep B vs Agar Sangre de carnero.

<b>Muestras vaginales</b>	
<b>Indicador</b>	<b>Porcentaje</b>
Índice Kappa	0,65
Sensibilidad	67%
Especificidad	99%
Valor Predictivo Positivo	67%
Valor Predictivo Negativo	99%
Razón de verosimilitud positiva	55.3
Razón de verosimilitud negativa	0.3
Prevalencia	3.5%

Fuente: Laboratorio de Bacteriología, Instituto SELADIS.

**Tabla N° 5.** Cultivo de hisopados rectales para *Streptococcus agalactiae* en CHROMagar Vs Agar Sangre de carnero.

		Agar Sangre		Total
		Positivo	Negativo	
CHROMagar	Positivo	1	1	2
	Negativo	0	84	84
Total		1	85	86

Fuente: Laboratorio de Bacteriología, Instituto SELADIS.

Se aislaron 2 cepas de *Streptococcus agalactiae* a partir de muestras de hisopado rectal, de estas 1 fue aislada por ambos medios de cultivo y 1 fue aislada solo en CHROMagar Strep B, por lo que se tienen los siguientes resultados:

**Tabla N° 6.** Parámetros estadísticos de validación del cultivo de muestras rectales en CHROMagar Strep B vs Agar Sangre de carnero.

<b>Muestras rectales</b>	
<b>Indicador</b>	<b>Porcentaje</b>
Índice de Kappa	0,66
Sensibilidad	100%
Especificidad	99%
Valor Predictivo Positivo	50%
Valor Predictivo Negativo	100%
Razón de verosimilitud positiva	85
Razón de verosimilitud negativa	0
Prevalencia	1.2%

Fuente: Laboratorio de Bacteriología, Instituto SELADIS.

**Tabla N° 7.** Comparación de los parámetros estadísticos de validación del cultivo de muestras de hisopado vagino-rectal, vaginal y rectal en CHROMagar Strep B vs Agar Sangre de carnero.

<b>Indicador</b>	<b>Tipo de muestra</b>		
	<b>Hisopado vagino-rectal</b>	<b>Hisopado Vaginal</b>	<b>Hisopado rectal</b>
Índice Kappa	0,65	0,65	0,66
Sensibilidad	75%	67%	100%
Especificidad	98%	99%	99%
Valor Predictivo Positivo	60%	67%	50%
Valor Predictivo Negativo	99%	99%	100%
Razón de verosimilitud positiva	30,8	55,3	85
Razón de verosimilitud negativa	0,3	0,3	0
Prevalencia	4,7%	3,5%	1,2%

Fuente: Laboratorio de Bacteriología, Instituto SELADIS.

Cuando se trabaja con muestras de hisopado vaginal y rectal y con muestras solo vaginales, el índice de Kappa es de 0,65 y con muestras solo rectales es de 0,66; según estos valores la concordancia se clasifica como buena entre el cultivo en agar sangre de carnero y el CHROMagar Strep B como métodos de detección de colonización materna por *S. agalactiae*.

## XXVI.DISCUSIÓN

La validez de un estudio puede verse severamente afectada si se utilizan mediciones poco fiables (Cerde J & Villarroel L; 2008). Un parámetro estadístico que permite evaluar la concordancia o reproducibilidad de instrumentos de medida cuyo resultado es categórico (2 o más categorías) es el índice de kappa; representa la proporción de acuerdos observados más allá del azar respecto del máximo acuerdo posible más allá del azar. Este índice tomará valores entre 0 (total desacuerdo) y 1 (máximo acuerdo). (Abraira V; 2000). En este sentido, en el presente estudio de validón del cultivo en medio cromogénico para la detección de colonización materna vagino-rectal por el EGB, se obtuvo que el índice de kappa es de 0,65 tanto para muestras de hisopado vagino-rectal como para muestras solo de hisopado vaginal y de 0,66 cuando se trabaja solo con muestras rectales. Ambos resultados del índice de kappa expresan que la concordancia entre ambos métodos de cultivo es buena.

La sensibilidad es la probabilidad de que la prueba dé positiva si la condición de estudio está presente; también se puede definir como la proporción de verdaderos positivos respecto al total de enfermos. La especificidad es la probabilidad de que la prueba dé negativa si la enfermedad está ausente, dicho de otra forma, es la proporción de verdaderos negativos respecto al total de sujetos sanos. (Ochoa SC & Orejas G; 1999). Estas proporciones son parámetros inherentes a la prueba diagnóstica y no dependientes de la prevalencia de la enfermedad. (Bravo GS & Cruz QJ; 2015). El aspecto más importante es que el examen puede clasificar correctamente al paciente sano como sano; es decir, los verdaderos negativos. Un examen con una alta especificidad es muy útil cuando el resultado es positivo, pues la tasa de falsos positivos es muy baja. (Medina MC; 2011)



Los medios cromogénicos proveen un medio de identificación para el EGB rápido y fácil, sin embargo estos medios no son 100% sensibles ni 100% específicos; la falta de un cromógeno específico para EGB limita su especificidad lo que puede llevar a errores en la identificación. (Rosa-Fraile, M % Spellerberg, B; 2017).

En este estudio se obtuvo una sensibilidad del CHROMagar Strep B del 75% y una especificidad de 98% frente al agar sangre, esto indicaría que el cultivo en CHROMagar Strep B no sería tan útil detectando pacientes colonizadas en comparación con el agar sangre; sin embargo, a todas las cepas sospechosas de ser EGB desarrolladas en cromagar se les realizaron las pruebas de identificación ya que, si bien es cierto el CHROMagar Strep B es un medio cromogénico para el aislamiento y la diferenciación de *S.agalactiae*, las instrucciones de uso del fabricante indica que la identificación definitiva puede requerir pruebas adicionales tales como CAMP, PYR, catalasa o pruebas inmunológicas; por lo tanto, los resultados expresados como falsos positivos para CHROMagar Strep B corresponden a aislamientos de *Streptococcus agalactiae* que únicamente por razones estadísticas debían ser expresadas como falsas negativas. Esto demuestra que en realidad el cultivo en CHROMagar Strep B pudo aislar al EGB en dos pacientes que el cultivo en agar sangre no detectó.

La sensibilidad y especificidad obtenidas del CHROMagar son menores a los reportados por otros autores (Salem, N., & Anderson, J. J.; 2015 reportaron una sensibilidad de 94% y una especificidad de 100%; Poisson, D.-M., et al; 2010 obtuvieron una sensibilidad de 92,7%); cabe resaltar que en dichos estudios se tomaron en cuenta muestras vaginales en comparación con el presente estudio que incluyó asimismo muestras rectales; la diferencia en los valores podría estar causada por el desarrollo masivo de la microbiota acompañante de crecimiento

rápido presente en las muestras rectales que podrían haber enmascarado y/o inhibido el crecimiento del EGB.

Aunque asumamos que el patrón de referencia tiene una validez absoluta, es frecuente que esta validez no sea perfecta. A menudo, se asigna dicho papel a la prueba diagnóstica disponible con la que existe mayor experiencia; por lo tanto, es importante tener en cuenta que un “patrón oro” puede ser imperfecto y sin embargo, su validez debe ser asumida por cuestiones de operatividad. (Ochoa SC & Orejas G; 1999). En este sentido, el uso de agar sangre puede conducir a resultados falsos negativos debido a que no es un medio selectivo y la microbiota rectal tiene una gran cantidad de bacterias de rápido crecimiento entre las que el EGB están frecuentemente presente en menor número. Resultados falsos positivos en agar sangre de carnero podrían deberse al desarrollo de enterococos beta hemolíticos cuyas características se asemejan a las colonias de EGB. Por este motivo debe realizarse pruebas de identificación presuntivas o de confirmación a todas las colonias cuyas características se asemejen a las de EGB. (Verani JR, et al; 2010).

Una fuente probable de resultados falsos negativos es que si bien, se utilizan medios selectivos, estos no están destinados a la inhibición de enterococos que forman parte de la microbiota rectal. En este aspecto, el agar cromogénico tiene la ventaja de ayudar a diferenciar los enterococos de los EGB por la diferencia de color, sin embargo, si el desarrollo de enterococs es masivo, existe el riesgo que encubran las colonias de EGB.

En este estudio se observó desarrollo de enterococos en 71% de muestras vaginales y en 96% de muestras rectales sembradas en CHROMagar lo que es mayor a lo reportado en otras literaturas donde reportan que el desarrollo de enterococos puede ser de hasta 60%. A esto se

suma el hecho que los enterococos pueden impedir el crecimiento de EGB en caldos por competición debido a que las características de crecimiento de los enterococos son muy similares a las de los EGB y las pocas diferencias de susceptibilidad no son favorables para el EGB.

En agar cromogénico pueden observarse como colonias de color malva algunas cepas de estreptococos de los grupos C, F y G; la mayoría de *Streptococcus* del grupo A, algunas pocas cepas de estafilococos y algunas cepas de *Lactobacillus* pueden aparecer como colonias de color malva pálido a violeta; todas podrían llevar a la interpretación de resultados falsamente positivos por lo que se recomienda realizar otras pruebas adicionales de identificación presuntiva.

Par evitar el reporte de resultados falsos positivos en CHROMagar StrepB se emplearon diferentes pruebas de identificación. La tinción de gran permite diferenciar principalmente a los lactobacilos que se observan como bacilos gran (+); la prueba de la catalasa es útil para diferenciar a estafilococos (catalasa +).

La prueba de sensibilidad a la bacitracina es una prueba simple, económica y bastante precisa para la diferenciación de estreptococos del grupo A (sensibles) de los estreptococos del grupo B (resistentes); se realiza junto con la prueba de sensibilidad al sulfametoxazol/trimetoprima para diferenciar a los estreptococos de los grupos A y B (resistentes) de los estreptococos de los grupos C, F y G que son sensibles.

La prueba de CAMP es una prueba altamente sensible para la identificación presuntiva de estreptococos del grupo B ya que incluso las cepas no hemolíticas son CAMP positivas.

Por último la prueba de bilis esculina se utilizó para la diferenciación de estreptococos del grupo B (negativos) de enterococos (positivos) principalmente en aquellas colonias aisladas de agar sangre de carnero, debido a la similitud en la morfología de las colonias entre ambas cepas.

La sensibilidad y la especificidad son medidas importantes de la exactitud diagnóstica de una prueba, pero no pueden ser usadas para estimar la probabilidad de enfermedad en un paciente individual. Los valores predictivos positivos y negativos proporcionan estimaciones de la probabilidad de la enfermedad. Vale decir, es la probabilidad de que la prueba diagnóstica entregue el diagnóstico correcto, si esta resulta positiva o negativa. El Valor Predictivo Positivo corresponde a la probabilidad de que el paciente tenga la enfermedad, dado que el test resultó positivo mientras que el Valor Predictivo Negativo es la probabilidad de que el paciente no tenga la enfermedad, dado que la prueba diagnóstica resultó negativa. (Bravo GS & Cruz QJ; 2015).

Los valores predictivos tienen utilidad postprueba, ya que informan de la probabilidad de enfermedad una vez realizada la prueba y conocido su resultado. Sin embargo, sus predicciones tienen una validez limitada, porque dependen de la prevalencia del fenómeno en estudio en la población donde se aplica. (Talavera JO, et al; 2011). Quizá esta influencia por la prevalencia sea el motivo por el cual estos parámetros estadísticos no son reportados en los estudios de investigación, en los que se enfocan más en los datos de sensibilidad y especificidad. Debido a que, si la prevalencia de la enfermedad en la población de la cual se obtuvieron los valores predictivos de la prueba diagnóstica es diferente a la prevalencia de la enfermedad en nuestra población, no es posible hacer uso de dichos valores predictivos. Se

obtuvo un valor predictivo positivo para muestras vagino-rectales, vaginales y rectales de: 60%, 67% y 50% respectivamente y los valores predictivos negativos fueron de 99%, 99% y 100%. Con estos resultados se puede observar que los VPP son relativamente bajos mientras que los VPN son muy altos, esto se debe a la prevalencia de la colonización materna ya que un incremento en la prevalencia provoca un incremento en el valor predictivo positivo, con una disminución del valor predictivo negativo (una prueba positiva en una población con alta prevalencia de la enfermedad prácticamente hace el diagnóstico, sin embargo, una prueba negativa no lo descarta); al contrario, una disminución de la prevalencia provoca un incremento en el valor predictivo negativo y una disminución del valor predictivo positivo (una prueba negativa en una población con una baja prevalencia de la enfermedad prácticamente descarta la enfermedad). (Talavera JO, et al; 2011).

Los likelihood ratios o razones de verosimilitud se definen como cuántas veces es más probable que un paciente con la enfermedad tenga un determinado resultado en el test que pacientes sin la enfermedad. En el caso de resultados dicotómicos el LR positivo toma valores entre 1 y el infinito, mientras que el LR negativo toma valores entre el 1 y el 0. Si la razón de verosimilitud es igual a 1, la probabilidad del diagnóstico es la misma antes y después de aplicar la prueba. En este caso la prueba es inútil, no tiene capacidad discriminante. Cuanto más se aleje de 1 el valor de la razón de verosimilitud, con mayor fuerza la prueba nos sacará de la zona de incertidumbre diagnóstica, los LR no se ven afectados por la prevalencia de la enfermedad. (Bravo GS & Cruz QJ; 2015). La principal utilidad de los CP es que permiten calcular la probabilidad postprueba a partir de cualquier prevalencia. La probabilidad postprueba para una RVP se refiere a la probabilidad de obtener un resultado positivo cuando la prueba es positiva y corresponde al VPP; la probabilidad postprueba para una RVN se

refiere a la probabilidad de obtener un resultado positivo cuando la prueba es negativa; equivalente a 1-VPN. (Talavera JO, et al; 2011). En el presente estudio, se obtuvieron los siguientes resultados para muestras vagino-rectales, vaginales y rectales: LRP de 30,8; 55,3 y 85 respectivamente y LRN de 0,3 para muestras vagino-rectales y vaginales y 0 para muestras rectales. Estos parámetros estadísticos tampoco suelen ser reportados en los estudios de investigación por lo que no es posible realizar sus comparaciones con otros estudios similares.

La prevalencia puede interpretarse como la probabilidad esperada de tener el fenómeno en estudio (enfermedad) antes de realizar la prueba diagnóstica. Esta probabilidad preprueba se comporta como un punto de partida en la predicción diagnóstica. (Ochoa SC & Orejas G; 1999). Se obtuvo una prevalencia de colonización vaginal/rectal por *S. agalactiae* del 4,7%; sin embargo este dato refleja únicamente el desarrollo obtenido en el medio agar sangre, considerado como gold estándar; no obstante, si se toma en cuenta además a las cepas que fueron aisladas del CHROMagar, la prevalencia aumenta a un 6,97% como se muestra en los resultados.

Ambos resultados muestran una prevalencia menor con respecto a lo reportado en países desarrollados; estas variaciones pueden deberse a diferencias en virulencia de las cepas, niveles de anticuerpos anti-EGB maternos o susceptibilidad genética como lo reporta Le Doare K & Heath PT (2013). Sin embargo, la prevalencia es similar a lo reportado en algunos países sudamericanos como Argentina (1,4%) y Perú (10,9%). (Larcher JS, et al, 2005; Tamariz J, et al, 2004).

La prevalencia de la colonización materna varía mucho según los diferentes estudios realizados: Ceballos et al reportaron una prevalencia de 17,6% en Medellín – Colombia el año

2014, mientras que el año 2010 Duque et al reportaron una prevalencia de 5,8%; en Bogotá-Colombia el año 2011 Garcia et al reportaron una prevalencia de 0,38%; en Tamuco-Chile el año 2014 Abarzúa et al reportaron una prevalencia de 14,4%; en Paraguay la prevalencia reportada por Ortiz et al el año 2013 fue de 23,6%; en Lima – Perú se encontró una prevalencia de 10,9% el año 2004 reportado por Tamariz et al. Se puede observar que uno de los factores que podrían tener mayor influencia en estas variaciones es el método de cultivo utilizado para el aislamiento del estreptococo del grupo B. Esto puede observarse claramente en los estudios realizados en Colombia donde se ha reportado prevalencias desde 0,38% hasta 17,6%; la menor prevalencia de 0,38% se obtuvo al incubar las muestras en caldo cerebro corazón con gentamicina y su posterior resiembra en agar sangre; una prevalencia de 5,8% se reportó al emplear caldo Todd Hewitt y subcultivo en agar sangre; y la mayor prevalencia de 17,6% al emplear un medio cromogénico. La prevalencia obtenida en el presente estudio de 4,7% se asemeja a la reportada en Colombia el año 2010 de 5,8% (Duque et al; 2010) en la que utilizaron una metodología de cultivo semejante de enriquecimiento en Todd Hewitt y posterior resiembra en agar sangre.

Se reportan estudios similares realizados en Argentina donde los resultados de prevalencia varían significativamente 17,4% (Montibello et al; 2011), 9,39% (DI Bartolomeo et al; 2005), 1,4% (Larcher et al; 2005) ; la prevalencia del presente estudio es mayor a la reportada el 2005 en Argentina, donde encontraron una prevalencia de colonización de 1,4% a partir de una población de 1756 gestantes; sin embargo la metodología de cultivo empleada fue diferente ya que en ese estudio incubaron sus muestras en caldo cerebro corazón con colistina y las subcultivaron en agar sangre de carnero. En otro estudio de Argentina del año 2005 donde la metodología de estudio fue similar (muestras vagino-rectales enriquecidas en caldo

Todd Hewitt y resiembra en agar sangre) la prevalencia fue de 9,39%, mayor a lo encontrado en este estudio de 4,7%; sin embargo cabe resaltar que en el estudio de Argentina la población en estudio incluía a gestantes entre 28 a 40 semanas de gestación en comparación con este estudio que solo incluyó a gestantes entre 35 a 37 semanas de gestación según lo recomendado por la CDC; este factor puede explicar la diferencia de prevalencia ya que se sabe que la colonización materna por EGB es variable. Al igual que lo observado en Colombia, la mayor prevalencia en Argentina -reportada el año 2011- de 17,4%, fue con el uso de un medio cromogénico después de el enriquecimiento en Caldo Todd Hewitt; en comparación con el presente estudio el agar cromogénico empleado fue diferente (chromIDStreptoB de bioMérieux) además que la población estudiada fue mayor (962 embarazadas).

Otro factor que se debe considerar es la cantidad de gestantes incluidas en los estudios. Se puede observar que la prevalencia de colonización del presente estudio es menor en comparación con lo reportado por Chile el año 2014 – prevalencia de 14,4% - a pesar de que la metodología empleada fue similar (Todd Hewitt y posterior resiembra en agar sangre) cabe recalcar que en Chile se realiza en cultivo selectivo para *Streptococcus agalactiae* a todas las gestantes entre 35 a 37semanas de gestación; esto podría explicar la mayor prevalencia ya que se basaron en una base de datos de 2 años (de mayo de 2010 a mayo de 2012) y por lo tanto la población estudiada fue mucho mayor (1181 mujeres); lo mismo podría explicar la diferencia encontrada con el estudio realizado en Paraguay el 2013 ya que en el lapso de abril del 2010 hasta agosto del 2011 estudiaron 203 embarazadas encontrando una prevalencia de 23,6%.

El estudio realizado en Perú el año 2004 empleó una metodología similar de enriquecimiento en Caldo Todd Hewitt y resiembra en agar sangre; a pesar de ello la prevalencia reportada en



el país vecino es mayor con 10,9%; esto podría deberse a que incluyeron a 238 gestantes y que además incluyeron gestantes desde las 26 semanas de gestación.

Existen estudios que indican que uno de los factores biológicos de colonización vaginal por EGB es la edad materna mayor a 36 años y colonización persistente en mujeres mayores a 40 años (Patras KA & Nizet V; 2018); esto podría explicar el porcentaje de prevalencia encontrado en el presente estudio debido a que la edad promedio de las mujeres estudiadas fue menor con un valor de 29 años.

En este estudio se utilizó como gold estándar el agar sangre de carnero al 5%, el medio de cultivo a validar fue el CHROMagar Strep B; todas las colonias sospechosas desarrolladas en ambos medios fueron sometidas a pruebas de identificación, por lo tanto, el gold estándar empleado en este estudio es un gold estándar compuesto (desarrollo en medio de cultivo más pruebas de identificación).

El medio CHROMagar Strep B es una buena alternativa al agar sangre para el subcultivo del caldo Todd-Hewitt, ya que recupera un porcentaje mayor de estreptococos del grupo B, el motivo puede ser a que el aspecto característico que presentan las colonias en CHROMagar permite recuperar aquellas cepas cuya hemólisis pasa desapercibida en cultivos mixtos o las que carezcan de ella. Es posible que una vez adquirida la destreza en la detección del estreptococo del grupo B en este medio, pocas veces fuera necesaria las pruebas de identificación posteriores de las colonias, ya que las colonias sospechosas de EGB siempre fueron confirmadas en nuestros aislados.

La adecuada técnica de toma de muestra es importante al momento de lograr el máximo de detección de portación. Si se toma sólo vaginal y no rectal, se pierde un tercio de las pacientes colonizadas, y con ello a un grupo importante de mujeres embarazadas que son potenciales transmisoras de *S. agalactiae* a su recién nacido. (Verani JR, et al; 2010)

Con las actuales guías de prevención de sepsis neonatal precoz por EGB, implementadas en otros países, se ha producido una caída sostenida en las cifras de neonatos afectados, principalmente entre 1996 y mediados de la década del 2000. Con posterioridad a ello, las tasas se han mantenido bajas, pero estables. Eso sugiere que este tipo de protocolos de prevención logran una importante reducción de esta patología, pero no su erradicación ya que no es 100% protectora, pudiendo la madre adquirir el microorganismo con posterioridad a la semana del tamizaje, ya que el estado de colonización por EGB en una mujer embarazada puede cambiar desde el cultivo de screening hasta el momento del parto. Esto sugiere que se requiere mejorar la sensibilidad de los métodos usados en el screening preparto.

Existen métodos de biología molecular que permiten realizar el screening en el momento del parto debido a que ofrecen un resultado en menos de 75 minutos; sin embargo para nuestra realidad, estos métodos son aún muy caros, además que requieren personal calificado, ambientes con requerimientos específicos, no permiten realizar pruebas de sensibilidad y resistencia y pueden tener limitaciones técnicas como inhibidores de la PCR o presencia significativa de moco.

La detección de colonización materna por *Streptococcus agalactiae* no se practica de forma universal y rutinaria en nuestro medio como parte de los estudios del control prenatal; probablemente debido a la ausencia de estudios que permitan conocer la prevalencia de

mujeres gestantes colonizadas y por lo tanto no se emplee una metodología adecuada para el aislamiento de este germen. Bajo este panorama es posible que se este subestimado su importancia ya que existe información de casos de sepsis en neonatos por *Streptococcus agalactiae*. (Flores, M, 2007) y reportes de casos en los que no se pudo identificar al agente causal pudiendo alguno corresponder a *Streptococcus agalactiae* en los que debido a la falta de un adecuado método de aislamiento e identificación no se llegó a un diagnóstico certero. La aparente falta de la enfermedad en nuestro medio puede deberse a que la enfermedad no es reconocida y al uso de antibióticos de amplio espectro antes de realizar los cultivos que pueden evitar la identificación del EGB en el laboratorio. (Johri AK, et all; 2013).

La falta de información en nuestro medio acerca de la infección producida por este microorganismo, ha excluido su importancia en enfermedades frecuentes en neonatos y gestantes. El presente estudio demuestra que en nuestra población existe colonización materna por este agente, por lo tanto el riesgo de infección neonatal está presente; asimismo los resultados ratifican la importancia del empleo de una metodología de aislamiento apropiada ya que las características morfológicas macroscópicas de esta bacteria pueden llevar a que pase desapercibido especialmente en un cultivo mixto.

Los resultados permiten fortalecer la importancia de mantener un seguimiento etiológico de la sepsis neonatal de manera que se puedan implementar medidas preventivas adecuadas a nuestra realidad; en tal sentido sería conveniente ampliar estudios similares a fin de conocer la real magnitud del problema en nuestro entorno. En base a tal información las autoridades de Salud podrían implementar las medidas preventivas y de control necesarias.

## XXVII.CONCLUSIONES

El método de cultivo en agar cromogénico para *Streptococcus agalactiae* es válido y aplicable para la detección de colonización vagino-rectal en mujeres embarazadas que se encuentran entre las semanas 35-37 de gestación.

1. Existe una buena concordancia entre el cultivo en CHROMagar Strep B y en agar sangre de carnero expresado en el índice de kappa de 0,65.
2. En el 75% de los casos el cultivo en CHROMagar Strep B da un resultado positivo cuando existe colonización materna por *Streptococcus agalactiae* mientras que en el 97,5% de los casos dará un resultado negativo cuando no existe colonización materna por esta bacteria.
3. Si se obtiene un resultado positivo en el cultivo en CHROMagar Strep B existe una probabilidad del 60% de tener colonización materna por *Streptococcus agalactiae* dada la prevalencia del 4,6% mientras que la probabilidad de que no exista colonización materna por *Streptococcus agalactiae* es del 99% cuando el resultado del cultivo es negativo.

4. Es 30,7 veces más frecuente que el cultivo en CHROMagar Strep B sea positivo cuando existe colonización materna y 0,26 veces más probable tener un resultado positivo cuando no existe colonización materna.
  
5. La prevalencia de colonización vagino-rectal de mujeres embarazadas que se encuentran entre las semanas 35-37 de gestación que acuden al Hospital de la Mujer en el segundo trimestre del año 2016 fue de 4,7%.

## XXVIII.RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un estudio con mayor población y mayor tiempo de duración para obtener un dato más robusto de la prevalencia de la colonización materna por estreptococo del grupo B en nuestra población. Por este motivo sería adecuado realizar un estudio multicéntrico. Aun con el resultado de prevalencia menor al esperado por bibliografía de otros países, considero que la detección de colonización materna por estreptococo del grupo B debería ser aplicada de forma rutinaria en todos los centros de salud que atienden control prenatal ya que permitiría prevenir el desarrollo de enfermedad neonatal de inicio temprano y ayudaría reducir la morbi-mortalidad por estreptococo del grupo B en neonatos.

Asimismo se deberían realizar estudios de costo efectividad de la aplicación de estas medidas de prevención ya que publicaciones de otros países calculan menores costos con la implementación del cultivo prenatal que con el uso de estrategias basadas en factores de riesgo, disminuyendo el número de recién nacidos con sepsis precoz por *S. agalactiae* y muerte. Estos estudios son necesarios en nuestro país para determinar las estrategias de prevención más adecuadas para nuestra realidad.

El CHROMagar Strep B puede ser utilizado en lugar del agar sangre de carnero al 5% para la detección materna de colonización ya que es más selectivo que el agar sangre inhibiendo gran parte de la microbiota acompañante y más fácil de interpretar debido a la coloración de las colonias, lo que ahorra tiempo de procesamiento e insumos al laboratorio; sin embargo debe ser acompañado por pruebas de identificación posteriores para confirmar que el aislamiento sea *Streptococcus agalactiae* y de este modo asegurar que el uso de antibióticos intraparto sean realmente necesarios.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, muestran la necesidad de realizar trabajos de investigación que identifiquen la magnitud del problema en nuestro medio a fin de orientar la implementación de las medidas preventivas necesarias.

## **XXIX.PERSPECTIVAS FUTURAS**

A espera del desarrollo de la vacuna para estreptococo del grupo B, la aplicación rutinaria e universal de la detección de colonización materna es la mejor alternativa para prevenir la infección neonatal de inicio temprano por este agente; lo que permitiría además obtener las cepas del *Streptococcus agalactiae* para realizar pruebas de serotipificación y de esta manera determinar cuáles son las cepas que se encuentran en nuestro medio y saber si las vacunas que están en desarrollo podrían ser aplicadas a nuestra población de forma efectiva.

### XXX.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarzúa F, Argomedo C, Meissner A, Díaz T, Garrido P, Fariña S & Chahin C. (2014). Prevalencia de portación vaginal-anal de *Streptococcus agalactiae* en el tercer trimestre de gestación y susceptibilidad a macrólidos y lincosamidas, en mujeres embarazadas de Clínica Alemana Temuco, Chile. *Rev Chilena Infectol*; 31 (3): 305-308. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v31n3/art09.pdf>
- Abraira V. (2000). El índice kappa. *SEMERGEN*; 27(5): 247-249. Disponible en: [file:///C:/Users/Sandra/Downloads/kappa\\_semergen.pdf](file:///C:/Users/Sandra/Downloads/kappa_semergen.pdf)
- Alvarez CA, Toraño PG & Llanes CR. (2014). Colonización vaginal/rectal por *Streptococcus agalactiae* en gestantes de Melena del Sur, Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 66 (3), 415-423. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/mtr/v66n3/mtr09314.pdf>
- Baker CJ. (2013). The spectrum of perinatal group B streptococcal disease. *Vaccine*. 28;31 Suppl 4:D3-6.
- Barajas VN & 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. *Rev. Cienc. Salud*. 9 (3), 251-258. Disponible en: <http://revistas.urosario.edu.co/index.php/revsalud/article/viewFile/1822/1654>
- Bianchi-Jassir F, Seale AC, Kohli-Lynch M, Lawn JE, Baker CJ, Bartlett L, Cutland C, Gravett MG, Heath PT, Ip M, Le Doare K, Madhi SA, Saha SK, Schrag S, Sobanjo-Ter Meulen A, Vekemans J & Rubens CE. (2017). Preterm Birth Associated With Group B



Streptococcus Maternal Colonization Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Infect Dis*.6;65(suppl\_2):S133-S142.

Bravo GS & Cruz QJ. (2015). Estudios de exactitud diagnóstica: Herramientas para su Interpretación. *Revista Chilena de Radiología*. 21(4): 158-164. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchradiol/v21n4/art07.pdf>

Ceballos CA, Loaiza N, Romero J, Ospina M & Vásquez ME. (2014). Caracterización de las gestantes tamizadas para *Streptococcus agalactiae* y su relación con sepsis neonatal temprana, en la Clínica del Prado de Medellín (Colombia), año 2010. *Infectio*, 18(2), 66-71. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v18n2/v18n2a05.pdf>

Cerda LJ & Villarroel LD. (2008). Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Rev Chil Pediatr*; 79 (1): 54-58. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rcp/v79n1/art08.pdf>

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2016. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing, M100-S26.

Cotten CM. (2015). Antibiotic stewardship: reassessment of guidelines for management of neonatal sepsis. *Clin Perinatol*;42(1):195-206.

Dennis L. Kasper, Eugene Braunwald, Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, et al. 2010. Harrison online: principios de medicina interna. 16ªed. Parte VI. Enfermedades infecciosas > Sección 5. Enfermedades causadas por bacterias grampositivas > Capítulo 121. Infecciones estreptocócicas y enterocócicas

- DI Bartolomeo S, Gentile M, Priore G, Valle S, DI Bella A. (2005). *Streptococcus agalactiae* en embarazadas. Prevalencia en el Hospital Nacional Alejandro Posadas. *Revista Argentina de Microbiología*, 37, 142-144. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v37n3/v37n3a07>
- Duque CM, Gómez B, Uribe O, Gutiérrez M, Ruiz E, Leudo GA, Montiel SS. (2010). Comparación de métodos para la recuperación y determinación de la prevalencia de *Streptococcus agalactiae* en mujeres gestantes de Medellín. *Infectio*; 14(2), 105-111. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v14n2/v14n2a04.pdf>
- Edmond KM, Kortsalioudaki C, Scott S, Schrag SJ, Zaidi AK, Cousens S & Heath PT. (2012). Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *Lanceta.*; 379 (9815): 547-56. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Group+B+streptococcal+disease+in+infant>
- Edwards MS, Nizet V & Baker CJ. (2011). Group B streptococcal infections. En: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, editors. *Infectious diseases of the fetus and newborn*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. p. 419-69.
- El Aila NA, Tency I, Claeys G, Saerens B, Cools P, Verstraelen H, Temmerman M, Verhelst R & Vaneechoutte M. (2010). Comparison of different sampling techniques and of different culture methods for detection of group B streptococcus carriage in pregnant women. *BMC Infect Dis.* 29;10:285.

- Ficher KN, Araújo AA, Houly SG, Lins PR, Silva M Jr & Góis AF. (2016). Purple urine bag syndrome: case report for *Streptococcus agalactiae* and literatura review. *J Bras Nefrol.* 38(4):470-472.
- Flores M. (2007). Incidencia de sepsis neonatal en recién nacidos en el hospital La Paz durante el periodo julio del 2005 a julio del 2007. UMSA. FCFB.
- García DA, Mojica ME, Méndez IA, Pachón DP, Prieto AC, Santamaría EV, Calixto OJ, Murcia CC & Palmera H. (2011). Prevalencia del *Streptococcus agalactiae* en maternas usuarias del hospital militar central, Bogotá (Colombia) año 2010. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 62 (4), 302-307. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcog/v62n4/v62n4a02.pdf>
- Hall J, Adams NH, Bartlett L, Seale AC, Lamagni T, Bianchi-Jassir F, Lawn JE, Baker CJ, Cutland C, Heath PT, Ip M, Le Doare K, Madhi SA, Rubens CE, Saha SK, Schrag S, Sobanjo-Ter Meulen A, Vekemans J & Gravett MG. (2017). Maternal Disease With Group B Streptococcus and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Infect Dis.* 6; 65(suppl\_2):S112-S124.
- Heath PT, Balfour GF, Tighe H, et al. (2009). Group B streptococcal disease in infants: a case control study. *Arch Dis Child*;94:674-80.
- Heath PT, Jardine LA. (2014). Neonatal infections: group B streptococcus. *BMJ Clin Evid.* 02:323

- Homer CS, Scarf V, Catling C & Davis D. (2014). Culture-based versus risk-based screening for the prevention of group B streptococcal disease in newborns: a review of national guidelines. *Women Birth*;27(1):46-51.
- Johri AK, Lata H, Yadav P, Dua M, Yang Y, Xu X, Homma A, Barocchi MA, Bottomley MJ, Saul A, Klugman KP & Black S. (2013). Epidemiology of Group B Streptococcus in developing countries. *Vaccine*. 31 Suppl 4:D43-5.
- Joubrel C, Gendron N, Dmytruk N, Touak G, Verlaguet M, Poyart C & Réglie-Poupet H. (2014). Comparative evaluation of 5 different selective media for Group B Streptococcus screening in pregnant women. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 80(4), 282-4. 2017, De Pubmed Base de datos.
- Jones N, Oliver KA, Barry J, et al. (2006) Enhanced invasiveness of bovine-derived neonatal sequence type 17 group B streptococcus is independent of capsular serotype. *Clin Infect Dis*.;42:915-24. 68.
- Kohli-Lynch M, Russell NJ, Seale AC, Dangor Z, Tann CJ, Baker CJ, Bartlett L, Cutland C, Gravett MG, Heath PT, Ip M, Le Doare K, Madhi SA, Rubens CE, Saha SK, Schrag S, Sobanjo-Ter Meulen A, Vekemans J, O'Sullivan C, Nakwa F, Ben Hamouda H, Soua H, Giorgakoudi K, Ladhani S, Lamagni T, Rattue H, Trotter C & Lawn JE. (2017). Neurodevelopmental Impairment in Children After Group B Streptococcal Disease Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Infect Dis*.6;65(suppl\_2):S190-S199.

- Larcher JS, Capellino F, de giusto R, Travella C, Gomez F, Kreiker G, Prats H, Zarate A, Vilaro M, Hernandez D, Ruiz G. (2005). Colonización por estreptococo beta hemolítico del grupo B durante el embarazo y prevención de enfermedad neonatal. *Medicina*. 65:201-6.
- Le Doare K & Heath PT. (2013). An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine*.28;31 Suppl 4:D7-12.
- Lin SM, Zhi Y, Ahn KB, Lim S & Seo HS. (2018). Status of group B streptococcal vaccine development. *Clin Exp Vaccine Res.*; 7 (1):76-81.
- Madrid L, Seale AC, Kohli-Lynch M, Edmond KM, Lawn JE, Heath PT, Madhi SA, Baker CJ, Bartlett L, Cutland C, Gravett MG, Ip M, Le Doare K, Rubens CE, Saha SK, Sobanjo-Ter Meulen A, Vekemans J, Schrag S; Infant GBS Disease Investigator Group. (2017). Infant Group B Streptococcal Disease Incidence and Serotypes Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Infect Dis*. 6; 65(suppl\_2):S160-S172.
- Medina MC. (2011). Generalidades de las pruebas diagnósticas, y su utilidad en la toma de decisiones médicas. 40(4): 787-797. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcp/v40n4/v40n4a15.pdf>
- Money D. & Allen V. (2013). The prevention of early onset neonatal group B Streptococcal disease. *J Obstet Gynaecol*;35(10):939-948.
- Montibello SE, Guelfand L, Machaín MG, Carrión NA, Ferreira MD, Pidone JC, Ceregido ME, Kaufman SC, Soloaga RN. (2011). Optimización de metodologías de cribaje para

la búsqueda de *Streptococcus agalactiae* en embarazadas. *Revista Argentina de Microbiología* 43, 4-8. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v43n1/v43n1a02.pdf>

Morgan JA, Cooper DB. [Updated 2018 Feb 11]. Pregnancy, Group B Streptococcus. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 Jan-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482443/>

Murray P & Pfaller M. (2006) *Microbiología Médica*. 5 ed. España: Elsevier, 976p. (p. 237-258)

Nan C, Dangor Z, Cutland CL, Edwards MS, Madhi SA & Cunnington MC. (2015) Maternal group B Streptococcus-related stillbirth: a systematic review. *BJOG*;122(11):1437-45.

Nizet V. (2002). Streptococcal beta-hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. *Trends Microbiol*; 10:575-80. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Streptococcal+β-hemolysins>

Ochoa SC & Orejas G. (1999). Epidemiología y metodología científica aplicada a la pediatría (IV): Pruebas diagnósticas. *An Esp Pediatr*;50:301-314. Disponible en: <https://www.aeped.es/sites/default/files/anales/50-3-19.pdf>

Ohlsson A, Shah VS & Stade BC. (2014). Vaginal chlorhexidine during labour to prevent early-onset neonatal group B streptococcal infection. *Cochrane Database Syst Rev*. 14;(12).

- Ohlsson A & Shah VS. (2014). Intrapartum antibiotics for known maternal Group B streptococcal colonization. *Cochrane Database Syst Rev.* 10;(6)
- Ortiz M, Fariña N, Sanabria R, Caballero E, Dacak R, Haramoto N, Acuña V. (2013). Frecuencia de colonización por Estreptococo grupo B en embarazadas de 35 a 37 semanas en el Hospital Materno-Infantil San Pablo. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud, 11* (2), 32-40. Disponible en: <http://scielo.iics.una.py/pdf/iics/v11n2/v11n2a05.pdf>
- Palacios GC, Hernández TI, Rivera LG, Briones E, Caballero A, Vázquez JM, Amador DI, García R, Solórzano F & Rodríguez C. (2017). Infección perinatal por estreptococo del grupo B: una descripción global, latinoamericana y mexicana. *Gac Med Mex.*, 153 (3): 361-370. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28763075>
- Pannaraj PS & Baker CJ. (2014). Group B streptococcal infections. En: Cherry JD, Steinbach WJ, Harrison GJ, et al., editors. *Feigin and Cherry's Textbook of pediatric infectious diseases*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. p. 1153-69.
- Patras KA & Nizet V. (2018). Group B Streptococcal Maternal Colonization and Neonatal Disease: Molecular Mechanisms and Preventative Approaches. *Front Pediatr*;6:27.
- Phares CR, Lynfield R, Farley MM, et al. (2008). Epidemiology of invasive group B Streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA.*;299:2056-65.
- Poisson, D.-M., Chandemerle, M., Guinard, J., Evrard, M.-L., Naydenova, D., & Mesnard, L. (2010). Evaluation of CHROMagar™ StrepB: A new chromogenic agar medium for

- aerobic detection of Group B Streptococci in perinatal samples. *Journal of Microbiological Methods*, 82(3), 238–242. doi:10.1016/j.mimet.2010.06.008
- Poisson DM, Evrard ML, Freneaux C, Vives MI & Mesnard L. (2011). Evaluation of CHROMagar StrepB agar, an anaerobic chromogenic medium for prepartum vaginal/rectal Group B *Streptococcus* screening. *Journal of microbiological methods*. 84, 490-491.
- Poisson DM & Evrard ML. (2012). Prepartum vaginal/anorectal Group B *Streptococcus* screening: improvement of the enrichment step by the broth additive RambaQUICK StrepB. *Journal of microbiological methods*. 89, 107-109.
- Reyna J, Ortiz F, Esteves A. (2007) Colonización materna por Streptococcus del grupo B en México: estimación de la prevalencia basada en la revisión bibliográfica. *Ginecol Obstet Mex*;75:399-403.
- Reyna J, Ortiz FJ, Pérez B. (2008) Quimioprofilaxis para evitar la colonización materna por estreptococo grupo B. Consecuencias de no adoptar la recomendación internacional. *Salud Publica Mex.*;50:155-61.
- Rosa-Fraile M & Spellerberg B. (2017). Reliable Detection of Group B Streptococcus in the Clinical Laboratory. *J Clin Microbiol*. Sep;55(9):2590-2598. doi: 10.1128/JCM.00582-17.



- Rosini R, Margarit I. (2015). Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. *Front Cell Infect Microbiol.* 4;5:6.
- Russell NJ, Seale AC, O'Driscoll M, O'Sullivan C, Bianchi-Jassir F, Gonzalez-Guarin J, Lawn JE, Baker CJ, Bartlett L, Cutland C, Gravett MG, Heath PT, Le Doare K, Madhi SA, Rubens CE, Schrag S, Sobanjo-Ter Meulen A, Vekemans J, Saha SK, Ip M; GBS Maternal Colonization Investigator Group. (2017). Maternal Colonization With Group B *Streptococcus* and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Infect Dis.* 6; 65(suppl\_2):S100-S111.
- Russell NJ, Seale AC, O'Sullivan C, Le Doare K, Heath PT, Lawn JE, Bartlett L, Cutland C, Gravett M, Ip M, Madhi SA, Rubens CE, Saha SK, Schrag S, Sobanjo-Ter Meulen A, Vekemans J & Baker CJ. (2017). Risk of Early-Onset Neonatal Group B *Streptococcal* Disease With Maternal Colonization Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Infect Dis.* 6; 65(suppl\_2):S152-S159.
- Salem, N., & Anderson, J. J. (2015). Evaluation of four chromogenic media for the isolation of Group B *Streptococcus* from vaginal specimens in pregnant women. *Pathology*, 47(6), 580–582. doi:10.1097/pat.0000000000000299
- Savini V, Gherardi G, Marrollo R, Franco A, Pimentel De Araujo F, Dottarelli S, Fazii P, Battisti A, Carretto E. (2015). Could  $\beta$ -hemolytic, group B *Enterococcus faecalis* be mistaken for *Streptococcus agalactiae*? *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 82(1), 32-3. doi: 10.1016.

- Seale AC, Blencowe H, Bianchi-Jassir F, Embleton N, Bassat Q, Ordi J, Menéndez C, Cutland C, Briner C, Berkley JA, Lawn JE, Baker CJ, Bartlett L, Gravett MG, Heath PT, Ip M, Le Doare K, Rubens CE, Saha SK, Schrag S, Meulen AS, Vekemans J, Madhi SA. (2017). Stillbirth With Group B Streptococcus Disease Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Infect Dis.* 6 ; 65(suppl\_2):S125-S132.
- Seedat F, Stinton C, Patterson J, Geppert J, Tan B, Robinson ER, McCarthy ND, Uthman OA, Freeman K, Johnson SA, Fraser H, Brown CS, Clarke A, Taylor-Phillips S. (2017). Adverse events in women and children who have received intrapartum antibiotic prophylaxis treatment: a systematic review. *BMC Pregnancy Childbirth.*; 26; 17 (1):247.
- Schuchat A, Oxtoby M, Cochi S, et al. (1990). Population-based risk factors for neonatal group B streptococcal disease: results of a cohort study in metropolitan Atlanta. *J Infect Dis.*;162:672-7.
- Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica. (2014). Opinión de expertos sobre Infecciones Congénitas y Perinatales (ICP) SLIPE. Disponible en: <http://www.slipe.org/informesAcademicos.asp>
- Sonnex C. (2013). Genital streptococcal infection in non-pregnant women: a case-note review. *Int J STD AIDS*;24(6):447-8.
- Talavera JO, Whacer RN & Rivas RR. (2011). Estudios de proceso (prueba diagnóstica). *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*; 49 (2): 163-170.

- Tamariz J, Obregon M, Jaraaguirre J, Diaz J, Jefferson L & Guerraallison H. (2004). Colonización vaginal y anorectal por *Streptococcus agalactiae* en gestantes de los Hospitales Nacionales Cayetano Heredia y Arzobispo Loayza. *Rev Med Hered*, 15:144-50. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v15n3/v15n3ao4.pdf>
- Taminato M, Fram D, Torloni MR, Belasco AGS, Saconato H, Barbosa DA.. (2011). Rastreo de *Streptococcus* del grupo B en gestantes: revisión sistemática y metanálisis. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, 19(6), [09 pantallas]. Disponible en: [http://www.scielo.br/pdf/rlae/v19n6/es\\_26.pdf](http://www.scielo.br/pdf/rlae/v19n6/es_26.pdf)
- Tann CJ, Martinello KA, Sadoo S, Lawn JE, Seale AC, Vega-Poblete M, Russell NJ, Baker CJ, Bartlett L, Cutland C, Gravett MG, Ip M, Le Doare K, Madhi SA, Rubens CE, Saha SK, Schrag S, Sobanjo-Ter Meulen A, Vekemans J, Heath PT; GBS Neonatal Encephalopathy Investigator Group. (2017). Neonatal Encephalopathy With Group B Streptococcal Disease Worldwide: Systematic Review, Investigator Group Datasets, and Meta-analysis. *Clin Infect Dis*.6;65(suppl\_2):S173-S189.
- Tapia I, Reichhard T, Saldías R, Abarzúa C, Pérez A, González M, Gederlini G. (2007). Sepsis neonatal en la era de profilaxis antimicrobiana prenatal. *Rev Chilena Infectol*, 24(2), pp. 111-6. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v24n2/art04.pdf>
- Verani JR, McGee L, Scharg SJ. (2010). Centers for Disease Control and Prevention: Prevention of perinatal group B streptococcal disease: revised guidelines from CDC. *MMWR Recomm Rep*. 2010;59:1-36

Vornhagen J, Armistead B, Santana-Ufret V, Gendrin C, Merillat S, Coleman M, Quach P, Boldenow E, Alishetti V, Leonhard-Melief C, Ngo LY, Whidbey C, Doran KS, Curtis C, Waldorf KMA, Nance E, Rajagopal L. (2018). Group B streptococcus exploits vaginal epithelial exfoliation for ascending infection. *J Clin Invest.* 1; 128(5):1985-1999.

Wessels MR, Rubens CE, Benedí VJ & Kasper DL. (1989) Definition of a bacterial virulence factor: Sialylation of the group B streptococcal capsule. *Proc Natl Acad Sci US A.*, 86 (22): 8983-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC298416/pdf/pnas00289-0398.pdf>

Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenber P y Woods G. (2013). Koneman. Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas en color. 6ta edición. Editorial médica panamericana. México.

# **ANEXOS**

## **Anexo 1: Hoja de Información**

### **“Validación del cultivo de *Streptococcus agalactiae* en medio cromogénico para la detección de colonización vagino-rectal en mujeres embarazadas”**

El presente estudio tiene por objeto validar un método de diagnóstico para detectar colonización vagino-rectal por *Streptococcus agalactiae* en embarazadas.

Esta bacteria puede ser transmitida al bebe en el momento del parto lo que puede conducir a la infección del recién nacido.

Si usted acepta participar en el estudio debe saber que requerimos de usted lo siguiente:

- Una firma del consentimiento informado que indica que usted me autoriza a tomarle las muestras para que formen parte del estudio.
- Que me indique su nombre, edad, semana de gestación y si tiene alergia a la penicilina.
- Una muestra de hisopado vaginal y una muestra de hisopado rectal que se tomará en el Hospital de la Mujer, para ello usted deberá sacarse la ropa de la cintura para abajo y echarse en una camilla en posición ginecológica. Una vez tomada las muestras habrá concluido su participación en el estudio.

**Beneficios y riesgos:** La participación en el presente estudio tiene carácter voluntario, no se cobrará los exámenes de laboratorio realizados en el estudio y el resultado de su cultivo será entregado a su médico con lo que se determinará si usted está colonizada o no por *Streptococcus agalactiae*.

Al finalizar el estudio se pretende contar con un mejor método de cultivo para la detección de colonización vagino-rectal por *Streptococcus agalactiae*.

La toma de muestra puede ser incomoda para usted pero no lleva mayor riesgo.

**Confidencialidad:** En el estudio se manejará toda la información y los resultados de los cultivos en forma confidencial, se manejarán en forma de datos y en ningún caso utilizaremos su nombre en la divulgación de los resultados del estudio.

**Anexo 2: Consentimiento informado**

Yo..... con CI.....

manifiesto que he sido informado sobre el objetivo del estudio: “**Validación del cultivo de *Streptococcus agalactiae* en medio cromogénico para la detección de colonización vaginal en mujeres embarazadas**” llevado a cabo en el laboratorio del Instituto SELADIS. He sido informado sobre los beneficios y riesgos de mi participación en el mismo, así mismo que los resultados de mis cultivos serán entregados a mi médico y que todos mis datos serán manejados de forma confidencial.

Se me ha informado que mi participación es voluntaria y que esta durará solo el momento en que me tomen la muestra.

Por lo tanto doy mi consentimiento a participar en el estudio.

Firma.....

---

**Datos del paciente**

Código del laboratorio:.....

Edad:.....

Semana de gestación:.....

Alergia a penicilina: Si

No

No sabe



**Anexo 3: Código interno del laboratorio para identificar las muestras.**

1/A	2/B	3/C	4/D	5/E	6/F	7/G	8/H	9/I	10/J
11/K	12/L	13/M	14/N	15/O	16/P	17/Q	18/R	19/S	20/T
21/U	22/V	23/W	24/X	25/Y	26/Z	27/A1	28/B1	29/C1	30/D1
31/E1	32/F1	33/G1	34/H1	35/I1	36/J1	37/K1	38/L1	39/M1	40/N1
41/O1	42/P1	43/Q1	44/R1	45/S1	46/T1	47/U1	48/V1	49/W1	50/X1
51/Y1	52/Z1	53/A2	54/B2	55/C2	56/D2	57/E2	58/F2	59/G2	60/H2
61/I2	62/J2	63/K2	64/L2	65/M2	66/N2	67/O2	68/P2	69/Q2	70/R2
71/S2	72/T2	73/U2	74/V2	75/W2	76/X2	77/Y2	78/Z2	79/A3	80/B3
81/C3	82/D3	83/E3	84/F3	85/G3	86/H3	<del>87/I3</del>	88/J3	<del>89/K3</del>	90/L3

**Anexo 4: Procedimiento de las pruebas utilizadas para la identificación de *Streptococcus agalactiae*.**

➤ **Catalasa**

Con el asa bacteriológica transferir parte de la colonia en estudio a un portaobjetos de vidrio, agregarle una gota de peróxido de hidrógeno al 3% y observar la formación de burbujas.

Control positivo: *Staphylococcus aureus*

Control negativo: *Streptococcus agalactiae*

La aparición rápida y sostenida de burbujas constituye una reacción positiva. Se debe tener cuidado de no tomar eritrocitos junto con la colonia cuando esta ha crecido en una placa de agar sangre ya que los eritrocitos tienen catalasa.

➤ **Tinción gram**

Preparar un frotis de la colonia en estudio, dejarlo secar al aire y fijar con calor pasando rápidamente el portaobjetos cuatro o cinco veces por la llama del mechero. Colocar el portaobjetos en un soporte de tinción y cubrir el frotis con cristal violeta durante 1 minuto, lavar con agua corriente, cubrir con lugol durante 45 segundos, lavar con agua corriente, cubrir con alcohol-acetona unos 10 segundos y lavar, por último cubrir con fucsina básica por 1 minuto y lavar. Dejar secar. Observar con aceite de inmersión con el objetivo de 100x.

Control Gram positivo: *Staphylococcus aureus*

Control Gram negativo: *Escherichia coli*

Las bacterias gram positivas se tiñen violeta y las gram negativas aparecen color rosa.

➤ **Sensibilidad a Bacitracina y sulfametoxazol/trimetoprin**

Tomar 3 o 4 colonias del estreptococo beta hemolítico y sembrar el inóculo en el centro de una placa de agar sangre; con un hisopo estéril diseminar el inóculo formando una capa sobre la placa. Colocar en forma aséptica un disco de Bacitracina de 0,04 UI y un disco de SXT sobre la zona sembrada, asegurarse de que los discos estén igualmente separados. Incubar la placa en aire ambiente a 35 °C.

Control de calidad:

Bacitracina S, SXT R: estreptococo del grupo A

Bacitracina R, SXT R: estreptococo del grupo B

Se considera sensible cualquier tamaño de halo alrededor de cualquiera de los discos y resistente desarrollo hasta el borde del disco.

➤ **Test de CAMP**

En el centro de una placa de agar sangre de carnero hacer una estria en línea recta con *S. aureus* 25923. Teniendo cuidado de no tocar la estría del estafilococo, hacer una estría con los

estreptococos por identificar, en forma perpendicular a la estría del estafilococo. Realizar estas estrías de tal manera que, después de la incubación, el desarrollo de los microorganismos no se junten. La estría del estreptococo debe ser de 3 a 4 cm de longitud. En la misma placa deben sembrarse en forma similar controles positivos y negativos. Incubar la placa a 35°C en aire atmosférico durante 18 a 24 horas.

Control positivo: estreptococo del grupo B

Control negativo: estreptococo del grupo A

Se considera CAMP positivo cuando se observa un área en forma de punta de flecha de mayor hemólisis en el lugar donde las dos líneas de crecimiento están más próximas.

➤ **Bilis Esculina**

Con un ansa tomar 2 o 3 colonias morfológicamente similares de estreptococos, sembrar el medio con un movimiento de “S” e incubar a 35°C durante 24 horas.

Control positivo: especies de *Enterococcus*.

Control negativo: especies de estreptococos (en este estudio se empleó estreptococo del grupo B)

El ennegrecimiento de más de la mitad del medio dentro de las 24 horas indica hidrólisis de la esculina.

### **Anexo 5: Prueba de sensibilidad para *Streptococcus agalactiae*.**

A partir de un crecimiento de 18 a 24 horas del microorganismo, preparar una suspensión en solución fisiológica hasta igualar el estándar de turbidez 0,5 de Mac Farland.

Sumergir un hisopo de algodón estéril en la suspensión y descargar el exceso de líquido presionando con firmeza el hisopo en la pared del tubo por encima del nivel del líquido y con este hisopo inocular toda la superficie de una placa de agar sangre de carnero.

Con una pinza estéril depositar un disco de clindamicina de 2 ug y un disco de eritromicina de 15 ug en la placa a 12 mm de distancia de centro a centro. Incubar a 35 °C durante 20 a 24 horas, en 5% de CO<sub>2</sub>.

Medir el diámetro de la zona de inhibición.

Interpretación: Eritromicina: S mayor o igual a 21 mm, R menor o igual a 15mm.

Clindamicina: S mayor o igual a 19 mm, R menor o igual a 15mm.



Interpretación del test de detección de resistencia inducible a la clindamicina (D test):  
achatación en la zona de inhibición en el disco de clindamicina, adyacente al disco de  
eritromicina, indica resistencia inducible a la clindamicina: reportar clindamicina resistente.