



**Universidad  
Andrés Bello**

UNIVERSIDAD ANDRES BELLO

Facultad de Medicina

Escuela de Tecnología Médica

**Estudio de Portación de  
*Streptococcusagalactiae*, Serotipificación y Detección de  
Fenotipos de Resistencia MLSb, M y L, en una Población  
Femenina Sana en Edad Fértil de Estudiantes de Tecnología  
Médica, Sede República de la Universidad Andrés Bello.**

Tesis de pregrado para optar al título de Tecnólogo Médico en especialidad  
Bioanálisis Clínico, Inmunohematología y Banco de Sangre.

Autores:

Valentina Paz Alfaro Saavedra, Katherine Yesenia Naranjo Borquez, Camila  
Alejandra Amthauer Pizarro y Darinka Nicole TraipeAlvarez.

Profesor tutor: Patricia Isabel Rojo Lira

Santiago de Chile, Diciembre 2015

## ÍNDICE

1. RESUMEN DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN.....	6 y 7.
2. INTRODUCCIÓN.....	8, 9, 10, 11 y 12.
2.1. Hipótesis.....	12.
2.2. Objetivo general.....	12.
2.3. Objetivos específicos.....	12.
3. MARCO TEORICO.....	13, 14, 15, 16, 17 y 18.
3.1. Características del género <i>Streptococcus</i> spp.....	13 y 14.
3.2. Clasificación serológica de <i>Streptococcus</i> B- Hemolíticos.....	14 y 15.
3.3. Identificación de <i>Streptococcusagalactiae</i> .....	15 y 16.
3.3.1. Agar sangre de cordero (5%).....	15.
3.3.2. Test de CAMP.....	16.
3.4. Serotipificación antigénica de <i>Streptococcusagalactiae</i> .....	17.
3.5. Susceptibilidad de <i>Streptococcusagalactiae</i> .....	18.
4. CARACTERISTICAS DEL ESTUDIO.....	20, 21 y 22.
4.1. Tipo de estudio.....	20.
4.2. Población y muestra.....	20, 21 y 22.
4.3. Variables principales.....	22.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23, 24, 25. 26. 27, 28, 29, 30 y 31.
5.1. Obtención de la muestra.....	23.
5.2. Identificación de <i>Streptococcusagalactiae</i> .....	23 y 24.
5.3. Test de CAMP.....	24 y 25.
5.4. Serotipificación de <i>Streptococcusagalactiae</i> .....	26 y 27.
5.4.1 Preparación del antígeno de prueba.....	26.
5.4.2 Aglutinación en portaobjeto.....	27.
5.5. Susceptibilidad de <i>Streptococcusagalactiae</i> ...	28, 29, 30 y 31.
6. RESULTADOS.....	32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 y 43.
6.1. Resultados de identificación de <i>Streptococcusagalactiae</i> .....	32.
6.2. Resultados de porcentaje de <i>Streptococcusagalactiae</i> .....	33.
6.2.1. Relación entre las edades de las participantes y porcentaje de portación de SGB.....	34.
6.3. Resultados de serotipificación de <i>Streptococcusagalactiae</i> ...	35 y 36.
6.3.1. Porcentaje de serotipos para <i>Streptococcusagalactiae</i> ...	37.
6.4. Resultados de susceptibilidad de <i>Streptococcusagalactiae</i> ...	37 y 38.
6.4.1. Resultados de medición de los halos de inhibición e interpretación.....	38, 39 y 40.
6.4.2. Resultados de cepas con TEST- D positivo.....	41.
6.4.3. Resultados del control de calidad para el estudio de susceptibilidad.....	42.

6.5. Relación entre serotipos de <i>Streptococcusagalactiae</i> y susceptibilidad ante los agentes antimicrobiano.....	43.
7. DISCUSIÓN.....	44, 45 y 46.
8. CONCLUSIÓN.....	47 y 48.
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49, 50, 51, 52 y 53.

## Índice Tablas

Tabla 1: Resultados de Identificación de <i>Streptococcusagalactiae</i> .....	32.
Tabla 2: Edad relacionada con el porcentaje de portación de SGB.....	34.
Tabla 3: Resultados de serotipificación SGB.....	35 y 36.
Tabla 4: Tabla 2h-1 Zona de diámetro de <i>Streptococcusagalactiae</i> .....	38.
Tabla 5: Resultado de medición de los halos de inhibición e interpretación.....	39 y 40.
Tabla 6: Cepas Test D positivo.....	41.
Tabla 7: Halo de inhibición de <i>Streptococcuspneumoniae</i> ATCC 49619.....	42.
Tabla 8: Puntos de corte cepa <i>Streptococcuspneumoniae</i> ATCC 49619 para los sensidiscosclindamicina (2ug), eritromicina (15ug) y penicilina (10IU).....	42.

## Índice Gráfico

Grafico 1: Porcentaje de colonización por SGB.....	33.
Grafico 2: Porcentaje de serotipos de <i>Streptococcusagalactiae</i> .....	37.
Grafico 3: Relación entre serotipo y susceptibilidad de SGB.....	43.

## Índice Anexos

Anexo 1: Consentimiento informado para participantes.....	54, 55 y 56.
Anexo 2: Instructivo de toma de muestra flujo vaginal.....	57 y 58.

## 1. RESUMEN

*Streptococcusagalactiae* es una bacteria perteneciente al género *Streptococcus*  $\beta$ - hemolíticos. Presenta un polisacárido común que la clasifica como *Streptococcus* grupo B (SGB). Además se ha subdividido en diez serotipos (Ia, Ib, II a IX) basados en los antígenos de polisacáridos capsulares y antígenos proteicos. (1)

SGB forma parte de la microbiota intestinal, desde donde puede colonizar la vagina, el tracto genitourinario y el tracto respiratorio. (2)

La colonización del tracto genital puede ser intermitente y es un hecho significativo en mujeres embarazadas, por la posibilidad de transmisión de este microorganismo al recién nacido provocando la enfermedad neonatal de comienzo precoz y la enfermedad neonatal de comienzo tardío. Este hecho es un importante problema de salud pública a nivel mundial y nacional, ya que SGB es el principal agente causal de neumonía, meningitis, bacteriemia y sepsis neonatal. (3) Además también puede afectar a mujeres gestantes y pacientes con compromiso inmunológico. (4).

El objetivo de la presente unidad de investigación busca detectar el porcentaje de colonización de *Streptococcusagalactiae* en una población femenina sana en edad fértil de estudiantes de Tecnología Médica de la Universidad Andrés Bello (sede República).

Además de identificar los serotipos más frecuentes de este microorganismo, a través el Kit Serotipde*S.agalactiae* grupo B (Denka- Seiken) y se determinaran losfenotipos de resistencia MLSb (Macrólidos, Lincosamidas, Estreptograminas del grupo b), M (Macrólidos) y L (Lincosamidas), cuantificando su frecuencia

respectiva. Adicionalmente se evaluará la sensibilidad a penicilina a través de la técnica Kirby – Bauer (difusión en agar).

Se realizó un cultivo vaginal a 234 mujeres estudiantes de Tecnología Médica de la Universidad Andrés Bello entre las edades de 18 a 31 años, de las cuales 32 resultaron ser portadoras de SGB (13,6%). Se identificó al serotipo III como el más frecuente, seguido del serotipo Ia.

Con respecto a la susceptibilidad antimicrobiana, de las 32 cepas de SGB, 19 cepas resultaron ser sensibles a eritromicina y clindamicina, mientras que las 13 cepas restantes presentaron resistencia a eritromicina y clindamicina con un fenotipo de resistencia iMLSb, siendo el 100% de estas cepas pertenecientes al serotipo III.

Conocer el porcentaje de portación de SGB en mujeres no embarazadas en Chile, junto con la caracterización fenotípica y los serotipos más frecuentes, aporta importantes datos epidemiológicos, permitiendo conocer la distribución y frecuencia de los serotipos, para la fabricación de futuras vacunas contra este microorganismo y así disminuir el abuso de la profilaxis antibiótica intraparto, lo cual a través del tiempo ha generado resistencia en otros microorganismos.

## 2. INTRODUCCIÓN

*Streptococcusagalactiae* es una bacteria cocácea Gram positiva y morfológicamente se presenta formando cadenas, es un microorganismo anaerobio facultativo, en agar sangre de cordero al 5% es  $\beta$ -hemolítica, catalasa y oxidasa negativo. Estas bacterias pueden ser clasificadas de forma antigénica a través de los hidratos de carbono presentes en su pared celular, llamado carbohidrato de Lancefield, el cual agrupa a los *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos en los grupos: A, B, C, G y F, donde *Streptococcusagalactiae* es el único representante del grupo B. Por otro lado, se han observado polisacáridos específicos para SGB los cuales son Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX (5).

SGB forma parte de la microbiota normal del tracto intestinal, donde coloniza la vagina, tracto genitourinario y tracto respiratorio lo que es un hecho importante en las mujeres gestantes, por la posibilidad de transmisión del SGB al recién nacido.

Aproximadamente el 50% de las madres colonizadas transmiten la bacteria al feto durante el embarazo y también puede ser transmitida al recién nacido cuando pasa por el canal de parto. Otros factores de riesgo de colonización neonatal son el parto prematuro menor a 37 semanas de embarazo, la rotura prematura de membranas y la fiebre intraparto (6). Sin embargo, no todos se verán afectados por el microorganismo, las estadísticas muestran que entre el 0,5 a 1% de los recién nacidos de una madre colonizada, desarrollará la infección (7).

La infección provocada por este microorganismo en los neonatos se puede manifestar de dos maneras, una denominada enfermedad neonatal de comienzo precoz que se desarrolla durante la primera semana de vida donde los lactantes infectados desarrollan signos y síntomas de neumonía, meningitis y/o septicemia. En los Estados Unidos, de los recién nacidos colonizados por SGB, entre 1 y 2% de ellos desarrolla una infección precoz (8). Alrededor del

15% y el 30% de los niños que sobreviven a la meningitis provocada por SGB presentan secuelas neurológicas, como ceguera, sordera y retraso mental grave (9).

La segunda manifestación llamada enfermedad neonatal de comienzo tardío, se desarrolla luego de más de una semana del nacimiento, los bebés presentan signos y síntomas de bacteriemia con meningitis.

La sepsis neonatal es considerada un importante problema de salud pública mundial, donde SGB es considerado el principal agente causal, atribuyéndose una mortalidad entre 5 y 20% en países desarrollados (10).

Según el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), la tasa de letalidad de la infección de inicio precoz en Estados Unidos ha disminuido del 50% en la década de 1970 hasta un 4% a 6% en los últimos años, principalmente debido a los avances en la atención neonatal y las recomendaciones propuestas por el mismo CDC (11).

El principal factor de riesgo de la infección neonatal precoz por SGB es la colonización vaginal provocada por este microorganismo. Esta colonización se presenta de manera asintomática y puede ser transitoria, intermitente o persistente (12).

Las cifras de colonización en mujeres embarazadas varían según la región geográfica. En ciertos países desarrollados se encuentra entre 5% y 35%, mientras que para naciones en desarrollo oscila entre 4% y 20%. En Latinoamérica, Argentina, Brasil, México y Venezuela se han descrito prevalencias de 10%, 18.4%, 10.3% y 32.7% respectivamente. En otros países en desarrollo se han visto valores menores, por ejemplo India (5.8%), Libia (5%) y Arabia Saudita (13.9%) en tanto que regiones como Nigeria (19.5%), Costa de Marfil (19.3%) y Gambia (22%) (13 y 14).

En el año 2004 en Chile la revista chilena de obstetricia y ginecología (v.69 n.2) publicó un estudio en el cual se determinó una prevalencia de colonización

vagino-rectal de un 14% en una población de embarazadas controladas en la maternidad del Hospital Clínico de la Universidad de Chile utilizando un método de cultivo selectivo. Además El Instituto de Salud Pública de Chile publicó un boletín de vigilancia de *Streptococcusagalactiae* en el año 2012, en el cual señala que existe un 14% de portación de SGB en mujeres embarazadas. (15).

En una investigación realizada en Estados Unidos se detectó la prevalencia y serotipos de SGB en mujeres en edad reproductiva en el tercer nivel de atención del Centro Médico Militar y se comparó con la distribución mundial de serotipos de SGB, de donde se obtuvo, que de los 1129 pacientes examinados durante el período de estudio (Julio a Diciembre 2009), 207 resultaron ser SGB positivo (18,3 %). Los SGB aislados de éstos pacientes se obtuvieron de muestras vagino-rectales rutinariamente realizadas en mujeres entre las edades de 18-40 años (16).

Actualmente todas las cepas de SGB en Chile son 100 % sensibles a penicilina y según el CLSI, se puede utilizar un disco de penicilina de 10 UI para predecir la susceptibilidad de los *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos. Por esta razón este antibiótico continúa siendo el tratamiento de elección para tratar las infecciones causadas por *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos y como profilaxis antibiótica intraparto para SGB. Cuando los pacientes son alérgicos a penicilina, se utiliza otro tipo de antibióticos (eritromicina y clindamicina), pero en el último tiempo han emergido cepas resistentes a estos fármacos (17).

Dentro del marco de esta investigación añadiremos el disco de penicilina de 10 UI para confirmar que todos los aislados de SGB siguen siendo 100% sensibles a penicilina.

El tema a tratar en esta investigación es considerado de alta importancia, ya que en Chile no existen estudios publicados que evalúen el porcentaje de mujeres no embarazadas que estén colonizadas por *Streptococcusagalactiae*, al no existir dicho estudio se desconocen los fenotipos de resistencia más frecuentes, MLSb (Macrólidos, Lincosamidas, Estreptograminas grupo b),

fenotipo M (Macrólidos) y fenotipo L (Lincosamidas). Además, tampoco existe un reporte que identifique los serotipos más predominantes de SGB en mujeres sanas en edad fértil. Este estudio resultará de gran utilidad para fines epidemiológicos y para complementar estudios de resistencia bacteriana de *Streptococcusagalactiae*. Con los datos obtenidos en la investigación se puede considerar, además, el desarrollo de vacunas contra SGB con el fin de reducir la colonización materna, la prevención de la transmisión a neonatos y la disminución de resistencias bacterianas a ampicilina en otros microorganismos como bacilos gram negativos.

Durante la unidad de investigación, se estudió el porcentaje de portación de SGB, la Serotipificación y detección de fenotipos de resistencia MLSb, M y L en una población femenina sana en edad fértil en estudiantes de Tecnología Médica, Sede República, de la Universidad Andrés Bello.

En el estudio se identificó al SGB mediante la observación macroscópica característica de las colonias y posteriormente se procederá a realizar el test de CAMP (test de screening para la identificación de *Streptococcusagalactiae*).

El estudio de serotipificación se realizará según fabricante, Kit Serotip. *S.agalactiae* grupo B (Denka-Seiken). La susceptibilidad, se efectuó mediante el método de Kirby-Bauer donde se añadirá el disco de penicilina 10UI para confirmar que todas las cepas son 100% sensibles a penicilina y los fenotipos de resistencia serán detectados mediante el test de difusión de doble disco (D-test).

Los procedimientos anteriormente mencionados se realizaron en los Laboratorios CATEM II y III de la Universidad Andrés Bello (sede República) durante el transcurso del segundo semestre del año 2015.

## 2.1. Hipótesis

La prevalencia de *Streptococcusagalactiae* en estudiantes de Tecnología Médica de la Universidad Andrés Bello, sede República es similar al porcentaje de portación en mujeres embarazadas en Chile. Además el 100% de *Streptococcusagalactiae* son sensibles a penicilina.

## 2.2 Objetivo General

Determinar el porcentaje de colonización de *Streptococcusagalactiae*, en una población femenina sana en edad fértil de estudiantes de Tecnología Médica, Sede República, de la Universidad Andrés Bello.

## 2.3. Objetivos Específicos

- Evaluar la presencia de *Streptococcusagalactiae* en muestras de flujo vaginal y los serotipos más frecuentes en una población femenina sana en edad fértil de estudiantes de Tecnología Médica, Sede República de la Universidad Andrés Bello.
- Identificar los fenotipos de resistencia MLSb, M y L, determinando su frecuencia respectiva.

- Determinar la susceptibilidad a penicilina.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Características del Género *Streptococcus*spp

Las especies del género *Streptococcus*spp. Son cocáceas gram positivas, anaerobias facultativas, esféricas u ovals que miden aproximadamente 2  $\mu$ m de diámetro. Son sensibles a las variaciones de pH y su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C.

Algunas especies pueden ser patógenas, otras son comensales avirulentas, que forman parte de la microbiota normal del tracto respiratorio y genital, colonizando, además, piel y membranas mucosas (18).

Una forma de clasificar a los *Streptococcus*spp. En el laboratorio clínico, es basándose en los patrones de hemólisis que presentan las cepas en el medio de cultivo agar sangre de cordero al 5%, siendo esta la característica más útil para la identificación de los *Streptococcus*spp.

La acción hemolítica de los *Streptococcus*spp. En agar sangre de cordero, fue descrita y definida por Brown en 1919, lo que permitió caracterizar a las colonias que crecen en la superficie estriada de las placas de agar sangre en  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ - hemolíticas. (19)

- $\alpha$ -hemólisis: lisis parcial de los eritrocitos en agar sangre de cordero, observándose un halo verdoso alrededor de la colonia.
- $\beta$ -hemólisis: lisis completa de los eritrocitos en agar sangre de cordero, observándose un halo transparente alrededor de la colonia.
- $\gamma$ -hemólisis: las especies no producen hemólisis en las placas de agar sangre, por lo tanto no se observa halo alrededor de la colonia.



**FIGURA 3.1.** En esta imagen se muestra los tres patrones de hemólisis en la placa de agar sangre de cordero producido por el género *Streptococcus*spp.

### **3.2. Clasificación serológica de los *Streptococcus*β-hemolíticos**

Rebeca Lancefield en 1933, desarrolló un esquema de clasificación serológica de los *Streptococcus* β- hemolíticos patógenos que producen enfermedad en los seres humanos, basado en la detección de antígenos de hidratos de carbono específicos de la pared celular de estos microorganismos, denominado carbohidrato de Lancefield, el cual agrupa a los *Streptococcus*β- hemolíticos en los grupos: A, B, C, G y F. Con este esquema sólo se pueden clasificar los *Streptococcus*β- hemolítico (20).

Grupo de Lancefield	Tamaño de la colonia	Especies
A	Grande	<i>Streptococcus pyogenes</i>
A	Pequeña	<i>Streptococcus grupo anginosus</i>
B	Grande	<i>Streptococcus agalactiae</i>
C	Grande	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
C, F	Pequeña	<i>Streptococcus grupo anginosus</i>
G	Grande	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
G	Pequeña	<i>Streptococcus grupo anginosus</i>

**FIGURA 3.2.** En esta imagen se muestra la clasificación serológica de los *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos. Las cepas de *Streptococcus* con antígenos de los grupos A, C o G, son subdivididas de acuerdo al tamaño de la colonia. Las cepas que forman una colonia grande y que presentan el antígeno A, C o G son consideradas *Streptococcus pyogenes*. Las cepas  $\beta$ -Hemolíticas que también tienen los antígenos A, C o G pero que forman una colonia pequeña son considerados cepas del grupo *anginosus* (21).

### 3.3. Identificación de *Streptococcus agalactiae*

#### 3.3.1 Agar sangre de cordero (5%)

El agar sangre es un medio enriquecido utilizado para la siembra de la mayoría de las muestras clínicas, permite el crecimiento de bacterias poco exigentes como exigentes. Este medio, además, detecta la producción de hemolisinas, enzimas bacterianas que provocan la lisis de los eritrocitos ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  hemólisis).

*Streptococcus agalactiae* presenta características propias de la colonia una vez sembrado en placas de agar sangre de cordero al 5%. Se observan colonias medianas de 2 mm de diámetro aproximadamente, de color grisáceo, con  $\beta$ -hemólisis acotada a la colonia.



FIGURA 3.3. Colonias de *Streptococcusagalactiae* en placa de agar sangre de cordero al 5%.

### 3.3.2. Test de CAMP

La identificación presuntiva de los *Streptococcus* grupo B puede realizarse a partir de esta prueba. El fenómeno hemolítico fue descrito por primera vez en el año 1944 por Christie, Atkins y Munch-Petersen, cuyos nombres proporcionan el acrónimo CAMP de la prueba (22).

La actividad hemolítica de la  $\beta$ -hemolisina causada por la mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* es intensificada por una proteína extracelular denominada factor de monofosfato de adenina cíclica (factor CAMP) producida por los *Streptococcus* del grupo B. La interacción de la  $\beta$ -hemolisina con este factor produce “hemólisis sinérgica”, observándose en la placa de agar sangre de cordero una zona hemolítica de punta de flecha en el área de intersección, donde han difundido el factor CAMP y la  $\beta$ -hemolisina (23).

### 3.4. Serotipificación antigénica de *Streptococcusagalactiae*

Una manera de pesquisar a este microorganismo, además de la  $\beta$ - hemólisis y el grupo B de Lancefield, es la Serotipificación antigénica.

Rebeca Lancefield definió dos tipos de antígenos de hidratos de carbono en la pared de los *Streptococcus* del grupo B; uno es el propio antígeno del grupo B, y otro, un antígeno capsular específico del que se le han identificado diez serotipos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX). Los serotipos prevalentes varían según el área geográfica. El antígeno capsular es un factor clave de virulencia de *Streptococcusagalactiae*. Los anticuerpos frente a él protegen de la infección por cepas de ese tipo, y el desarrollo de vacunas frente a este antígeno resulta un enfoque prometedor para la prevención de la infección (24).

Se han desarrollado técnicas de aglutinación en portaobjetos para la pesquisa de los serotipos de *Streptococcusagalactiae*, una de ellas es la proporcionada por el Kit Serotip. S. agalactiae grupo B (DenkaSeiken).

El kit proporciona el reactivo para la tipificación de *Streptococcus* grupo B el cual contiene 6 viales de 2 ml de antisueros (Ia, Ib, II, III, IV, V).

Los antisueros se mezclan con las cepas de *Streptococcus* grupo B previamente tratadas según las indicaciones del fabricante, para exponer el antígeno correspondiente al reactivo, produciendo una reacción antígeno-anticuerpo, que se evidenciará mediante una aglutinación observable microscópicamente. De esta manera es posible determinar cada serotipo (25).

### 3.5. Susceptibilidad de *Streptococcus agalactiae*

El tratamiento y profilaxis antibiótica habitual en las mujeres portadoras de SGB en el último trimestre de embarazo es la penicilina y sus derivados, en las pacientes que presentan alergia a este antibiótico se utiliza eritromicina o clindamicina como uso alternativo en la quimioprofilaxis intraparto.

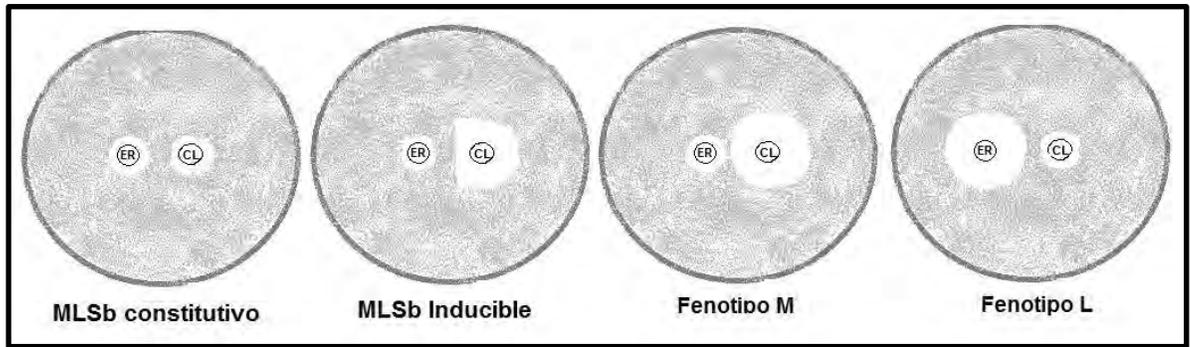
La presencia del gen *erm* es el principal mecanismo de resistencia antimicrobiano confiriendo un fenotipo de resistencia denominado MLSB (resistencia a los macrólidos, las lincosamidas y las estreptograminas del grupo B). Este gen codifica una metilasa de ARNr 23S que altera la unión del antibiótico a la célula diana, expresando la resistencia anteriormente mencionada.

Este fenotipo puede ser de expresión constitutiva (MLSBc), produciéndose resistencia a eritromicina y clindamicina o inducible (MLSBi), resistencia a eritromicina y sensibilidad a clindamicina con un achatamiento del halo de la clindamicina en la proximidad de la eritromicina (test D positivo) (26).

El gen *mefA* codifica un mecanismo de eflujo activo que confiere resistencia a macrólidos (eritromicina) y sensibilidad a lincosamidas (clindamicina) y estreptogramina del grupo B, denominado fenotipo M.

Otro fenotipo de resistencia menos frecuente, es el fenotipo L, en el cual debido a la presencia de la enzima lincosamid nucleotidil-transferasa existe resistencia bacteriana solo a las Lincosamidas (resistencia a clindamicina y sensibilidad a eritromicina) (27).

Los fenotipos MLSBc, MLSBi, M y L se pueden identificar mediante una técnica de laboratorio denominada test-D.



**FIGURA 3.4.** Representación gráfica de los distintos fenotipos de resistencia bacteriana que presenta *Streptococcusagalactiae*.

## **4. CARACTERISTICAS DEL ESTUDIO**

### **4.1. Tipo de estudio**

La siguiente Unidad de Investigación ha sido calificada como un estudio descriptivo, ya que tiene como finalidad describir la ocurrencia de un evento de interés en relación a la determinación porcentual de portación de *Streptococcusagalactiae*, en una población femenina sana en edad fértil de estudiantes de Tecnología Médica, Sede República de la Universidad Andrés Bello.

Además, buscará especificar las propiedades, características y rasgos importantes del evento analizado (28).

La presente Unidad de Investigación se realizará en las dependencias de la Universidad Andrés Bello, en los laboratorios CATEM I y CATEM II.

### **4.2. Población y muestra**

Los tipos de muestra se clasifican en dos grandes grupos: las muestras no probabilísticas y las muestras probabilísticas. Las muestras probabilísticas señalan que todos los elementos de la población tienen la misma posibilidad de ser escogidos. Esto se logrará definiendo las características de la población, el tamaño de la muestra y seleccionando de manera aleatoria y/o mecánica las unidades de análisis.

Se ha definido que el tipo de muestra que se utilizará en esta Unidad de Investigación es Probabilístico por racimos, ya que este estudio utilizará una población determinada (29), donde, la unidad de análisis será: estudiantes de género femenino sanas en edad fértil y los racimos serán: que pertenezcan a la carrera de Tecnología Médica y a la Universidad Andrés Bello, Sede República.

En el año 2014 se matricularon 668 estudiantes de primer año de género femenino en la carrera de Tecnología Médica de la Universidad Andrés Bello en la sede República (30). Este dato se denomina “La población en estudio” de la Unidad de Investigación.

Para determinar la cantidad de muestra a analizar se utilizará una plataforma cooperativa llamada “WinEpi 2.0”, esta ha sido diseñada para proporcionar herramientas epidemiológicas a la sociedad científica y académica (28).

Los datos requeridos para calcular el tamaño de la muestra son: El nivel de confianza, tamaño de la población, proporción esperada y error absoluto aceptado. Según la bibliografía “Metodología de la Investigación” los valores recomendados del nivel de confianza es de un 95%, la proporción esperada es de un 50% y el error máximo aceptable es de 1% a 5% (30).

Por lo que los valores de cada parámetro para calcular el tamaño de la muestra serán:

- Nivel de confianza: 95%
- Tamaño de la población: 668
- Proporción esperada: 18.3% (13).
- Error absoluto aceptado: 5%

Por lo tanto, en una población de 668 estudiantes de género femenino de Tecnología Médica de la Universidad Andrés Bello se debe seleccionar una muestra con al menos 171 individuos para calcular una proporción estimada de

18.3% con un error aceptado (o precisión) de 5% y un nivel de confianza del 95%.

De este modo, se estudiarán un total de 171 estudiantes del género femenino en edad fértil, (según el Instituto Nacional de Estadísticas el rango etario de edad fértil es de 15 a 49 años) pertenecientes a la carrera de Tecnología Médica, de la Universidad Nacional Andrés Bello, Sede República, Región Metropolitana.

La población en estudio tendrá la misma posibilidad de ser escogidos para participar en la Unidad de Investigación, donde cada una de ellas deberá cumplir con los criterios de inclusión descritos: participantes de género femenino que se encuentren en edad fértil, ser miembros de la Universidad Andrés Bello y pertenecer a la carrera de Tecnología Médica Sede República. Además, se contemplarán los siguientes criterios de exclusión: las participantes no deberán presentar algún tipo de infección en el tracto genitourinario, las participantes no deberán estar cursando con su periodo menstrual, no deberán estar sometidas a ningún tratamiento antibiótico y no deberán estar embarazadas.

Posteriormente, se solicitará la autorización de las participantes mediante el consentimiento informado (anexo 1) respectivo.

#### **4.3. Variables Principales**

- Presencia o ausencia de portación *Streptococcusagalactiae*.
- Serotipos de *Streptococcusagalactiae*.

- Tipo de fenotipo de resistencia encontrado en *Streptococcusagalactiae*.

## **5. MATERIALES Y METODOS**

### **5.1. Obtención de la muestra**

La muestra utilizada en este estudio fue de flujo vaginal, recolectada por cada participante en el medio de transporte Stuart (fabricante COPAN) entregado por las investigadoras, junto con un instructivo de toma de muestra vaginal (anexo 2) y dos copias del consentimiento informado (anexo 1), uno para la participante y el otro para la investigación.

Para la recolección y transporte de las muestras se seleccionó el medio de transporte Stuart ya que este permite recuperar y mantener la viabilidad de los microorganismos presentes en las distintas muestras sin que exista un crecimiento significativo. El cloruro de calcio que compone al medio proporciona iones esenciales para mantener el balance osmótico, el tioglicolato de sodio evita los cambios oxidativos y provee una atmósfera reducida, el glicerofosfato de sodio actúa como buffer y el azul de metileno es el colorante indicador del estado de óxido-reducción (31).

### **5.2 Identificación de *Streptococcusagalactiae***

Cada muestra recolectada en el medio de transporte Stuart fue sembrada con un Asa bacteriológica estéril en forma de argolla sobre una placa Agar Sangre (cordero) Base Soya-Trypticasa (Valtek) utilizando la técnica agotamiento en estría. Posteriormente, las placas fueron colocadas en jarras junto con el generador para cultivo en jarra de bacterias exigentes en CO<sub>2</sub> (BioMérieux) e incubadas a 35°C en la estufa de incubación (Farmalatina) por 18-24 horas. Todo este proceso fue realizado con las medidas de bioseguridad pertinentes, entre ellas tenemos: guantes desechables, delantal, cabello tomado, cajas de desechos corto punzante, contenedor de basura común y de desechos biológicos.

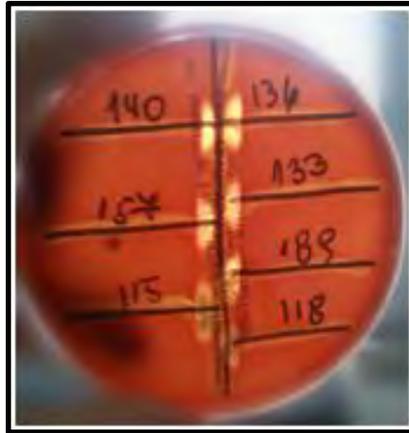
Al día siguiente, terminado el tiempo de incubación del microorganismo, se realizó la observación macroscópica de la colonias, seleccionando las que presentaron un tamaño de pequeño a mediano (1-2mm de diámetro), de color grisáceo y con  $\beta$ -hemólisis acotada a la colonia evidente en el agar.

Las colonias que presentaron las características antes mencionadas, propias de *Streptococcusagalactiae*, fueron sometidas a la prueba de CAMP.

### **5.3. Test de CAMP**

Sobre una placa de agar sangre de cordero (5%), se sembró una cepa de *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923 productora de  $\beta$ -hemolisina, realizando una estría de forma vertical en el centro de la placa. Los *Streptococcus* en estudio junto con una cepa de *Streptococcus* grupo B (control positivo), fueron sembrados en la misma placa trazando estrías perpendiculares a la estría del

*Staphylococcus aureus*, deteniéndose justo antes de alcanzarla. Posteriormente, se incubaron las placas a 35°C durante 18- 24 horas.



**FIGURA 5.5.** En esta imagen se observa el Test de CAMP positivo en punta de flecha para *Streptococcusagalactiae* en la placa de agar sangre de cordero (5%).

En algunos casos, en el Test de Camp no se observó de manera clara la punta de flecha, lo cual se optó por pruebas adicionales, como el KIT TEST PYR (Oxoidbiochemicalidentificationsystem), en el cual las cepas positivas para *Streptococcusagalactiae*, presentan una reacción PYR negativo y las cepas negativas para *Streptococcusagalactiae* presentan una reacción PYR positivo. Las cepas con PYR negativo se les realizó la técnica de aglutinación de látex, para la identificación de grupos de *Streptococcus* grupo A, B, C, D, F Y G, llamado KIT STREPTOCOCCAL GROUPING (OxoidMicrobiologyProducts). En el cual las cepas positivas para *Streptococcus* grupo B se observó una aglutinación evidente con el antisuero tipo B.

#### **5.4. Serotipificación de *Streptococcusagalactiae*.**

La Serotipificación se realizó a través del Kit Serotip. De *S.agalactiae* grupo B (Denka-Seiken).

##### **5.4.1 Preparación de antígeno de prueba**

Se comenzó el procedimiento inoculando las cepas de *Streptococcus* grupo B puro en un medio líquido llamado Caldo Todd-Hewittsin inhibidores (Valtek) y luego se incubaron las cepas en la estufa de incubación (Farmalatina) a una temperatura de 30°C por un tiempo de 16 a 20 horas. Este procedimiento tiene como finalidad enriquecer tanto microorganismos exigentes como de rápido crecimiento y es especialmente útil para el cultivo de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos.

Luego, del proceso de incubación, se colocó el medio de cultivo en un tubo Khan (Pyrex) y se centrifugó por 20 minutos, posteriormente se procedió a eliminar el sobrenadante, agregando 0,5 ml de caldo Todd-Hewitt, 200 $\mu$ l de extracto de páncreas de porcino y una gota de solución de rojo fenol usado como precipitante, todo esto se mezcló agitando vigorosamente en Vortex (Arquimed).

Al obtener la muestra homogeneizada se añadió la solución de corrección de pH para ajustar el líquido a un pH de 8 a 8,5 y se colocó en un baño

termorregulado a 37°C por una 1 hora. Terminado el tiempo de incubación se procedió a centrifugar la mezcla por 20 minutos, en la centrifuga (Arquimed), retirando el sobrenadante y agregando 0,5 ml de PBS (Solución salina taponada, Farmalatina)

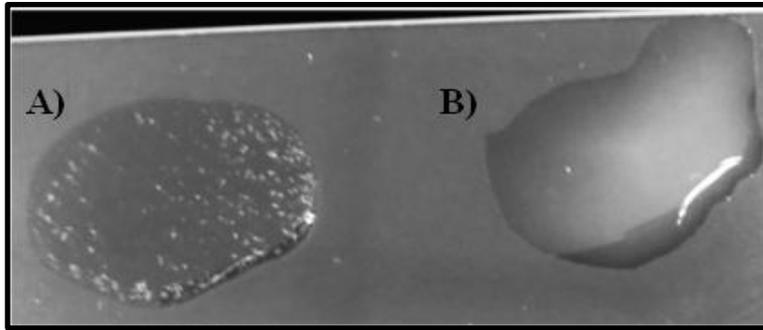
Se resuspendió el precipitado y se colocó en el autoclavevertical (Phoenix) a 121°C por 30 minutos. Al cabo de unos minutos de enfriada la mezcla se centrifugó durante 20 minutos eliminado el sobrenadante, añadiendo 0,5 ml de PBS y resuspendidas uniformemente.

Este procedimiento permitió exponer el antígeno de las cepas de *Streptococcusagalactiae* anteriormente seleccionadas.

#### **5.4.2 Aglutinación en Portaobjeto**

Se utilizaron 6 portaobjetos estériles (Global Roll), colocando en cada uno de ellos una gota de los antisueros proporcionados por el kit (Ia, Ib, II, III, IV, V). Con una micropipeta (Human) se sacaron 20µL de la suspensión final y se depositaron sobre la gota de cada antisuero, rápidamente se mezcló e inclinó el portaobjeto de un lado a otro para observar la aglutinación. Se consideró como positivo las fuertes reacciones de aglutinación dentro de un minuto. Una reacción posterior a un minuto o aglutinación débil se consideró como negativo.

Para confirmar que no exista aglutinación espontánea se procedió a mezclar 20µl de la suspensión final de cada muestra con 30 µL de suero fisiológico en un portaobjeto estéril.



**FIGURA 5.6.** A) *Prueba de aglutinación positiva: muestra más antisuero, dentro de 1 minuto.* B) *Prueba de aglutinación negativa: suero fisiológico más el antígeno de prueba.*

### **5.5. Susceptibilidad de *Streptococcusagalactiae*.**

El primer paso en la realización del test de difusión fue la preparación del inóculo. Se utilizó el patrón comercial de turbidez 0,5 de la escala de McFarland (Remel), cuando la turbidez del inóculo concuerda con la turbidez de la escala recomendada el inóculo posee aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml.



**FIGURA 5.7.** *Muestra el tubo comercial 0,5 McFarland.*

Para la preparación del inóculo se utilizó el método de suspensión a partir de una colonia, para esto se seleccionaron de 3 a 4 colonias de *Streptococcusagalactiae* aisladas directamente del agar sangre de cordero (5%) y se suspendieron en suero fisiológico (NaCl 0.9%). Luego el tubo khan que contenía la suspensión se colocó durante 1 a 2 minutos en el vortex para su completa homogeneización.

Para realizar la estandarización del inóculo se utilizó un tubo comercial estandarizado con la turbidez 0,5 McFarland y se comparó cada tubo con la suspensión con una tarjeta de comparación visual como se muestra en la siguiente imagen.



**FIGURA 5.8. Muestra la comparación entre el estándar comercial 0,5 McFarland y la suspensión de las cepas utilizando la tarjeta de comparación visual.**

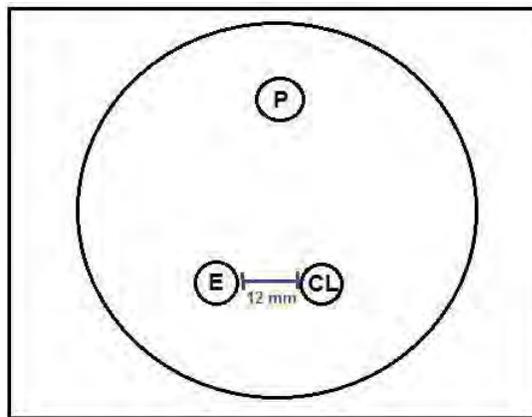
Al observar similar turbidez con el estándar 0,5 McFarland, la concentración de microorganismos en la suspensión se considerada satisfactoria.

Una vez estandarizada la suspensión, se sembró en el agar Müller-Hintonsangre al 5%(Valtek) con la técnica de siembra en césped. Se utilizó una tórula de algodón estéril (ChannelMED) la cual se introdujo en la suspensión de cada tubo y luego se roto por las paredes del tubo para eliminar el exceso de líquido. Luego, se sembró con la tórula de algodón en toda la superficie del

agarcon un ángulo de  $65^\circ$ , girando la tórula. Esto se realizó 3 veces en distintas posiciones del agar.

El siguiente paso, fue la aplicación de los sensidiscos de antimicrobianos de penicilina 10UI (MastDiagnostic) en la parte superior del agar.

Luego, en la parte inferior del agar se aplicaron los sensidiscos de antimicrobianos de eritromicina  $15\mu\text{m}$  (MastDiagnostic) y clindamicina  $2\mu\text{m}$  (MastDiagnostic) separados por 12mm uno de otro, para la realización del test-D, como se muestra en la siguiente figura.



**FIGURA 5.9.** En la parte superior de la imagen se observa el disco de penicilina 10 IU (P), en la parte inferior se ubican los discos de eritromicina  $15\mu\text{g}$  (E) y clindamicina  $2\mu\text{g}$  (CL), separados a una distancia de 12mm.

Para la aplicación de los sensidiscos en la superficie de la placa del agar, se utilizó una pinza estéril para extraerlos del contenedor, los sensidiscos fueron colocados en la superficie del agar, de la forma antes descrita. Luego, con la misma pinza estéril se presionaron los sensidiscos sobre la superficie del agar para su mayor adhesión. Posteriormente, estas placas se incubaron durante 18 a 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ , con 5% de  $\text{CO}_2$ .

Terminado el proceso de incubación, se procedió de medir las zonas de inhibición (halos de inhibición), las cuales corresponden a las zonas donde no

hubo crecimiento bacteriano. Para esto se utilizó una regla milimetrada y se midió el diámetro de los halos de inhibición.

Además, se utilizó una cepa *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 para el control de calidad del estudio de susceptibilidad. Esta cepa fue sembrada en duplicado en el agar MuellerHinton Sangre (5%) y se sometió al mismo procedimiento que las cepas en estudio. Posteriormente, se midieron los halos de inhibición, los cuales fueron comparados con los puntos de corte estipulados por el CLSI para *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. Este procedimiento se realizó para corroborar la efectividad de los sensidiscos de penicilina (10IU), eritromicina (15ug) y clindamicina (2ug).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Resultados de identificación de *Streptococcusagalactiae*.

Para efectos de la presente Unidad de Investigación se analizaron 235 muestras de flujo vaginal. Las cuales fueron identificadas mediante la técnica de screening “Test de CAMP” mencionado anteriormente.

Las cepas positivas correspondientes a *Streptococcusagalactiae* se muestran en la siguiente tabla:

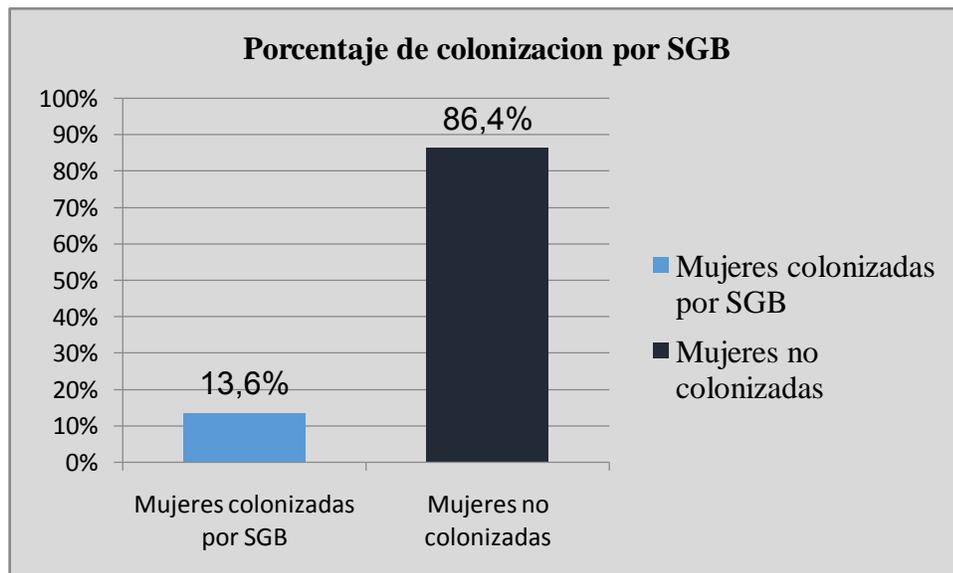
<b>TABLA 1. Resultados de identificación de <i>Streptococcusagalactiae</i>.</b>	
Cepas Positivas	32
Cepas Negativas	202
Total de cepas analizadas	234

## 6.2. Resultados del porcentaje de portación por *Streptococcusagalactiae*.

Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de portación de *Streptococcusagalactiae* en una población femenina sana en edad fértil de la carrera de Tecnología Médica de la Universidad Andrés Bello (sede república).

En el siguiente grafico se observa que un 13,6% de la población en estudio corresponde a mujeres colonizadas por SGB y un 86,4% de las mujeres no presentaron colonización.

El porcentaje de portación de *Streptococcusagalactiae* obtenido se muestra en el siguiente gráfico.



**GRAFICO 6.1. Muestra el porcentaje de portación de *Streptococcusagalactiae* en la población estudiada.**

### 6.2.1. Relación entre las edades de las participantes y porcentaje de portación de SGB.

Se realizó una relación entre el porcentaje de cepas positivas para SGB con las edades de las participantes, lo que se muestra en la siguiente tabla:

<b>Edad (años)</b>	<b>Porcentaje de Portación (%)</b>
18	3
19	18
20	18
21	3
22	6
23	28
24	3
25	9
26	6
28	3
31	3

### 6.3. Resultados de la Serotipificación de *Streptococcusagalactiae*.

Se realizó la serotipificación a todas las cepas identificadas como *Streptococcusagalactiae* con el KIT Group- B StreptococciTypingAntisera, marca DENKA SEIKEN. El procedimiento se desarrolló según las indicaciones del fabricante.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

<b>TABLA 3. Resultados de serotipificación para SGB.</b>	
<b>N° Muestra</b>	<b>Serotipo</b>
15	III
76	III
91	la
100	III
115	III
118	III
122	la
123	III
132	III
133	III
135	III
136	III
140	III

**CONTINUACIÓN DE TABLA 3. Resultados de Serotipificación para *Streptococcusagalactiae*.**

<b>N ° Muestra</b>	<b>Serotipo</b>
143	la
146	la
151	la
152	NT
155	III
157	III
159	NT
161	III
164	V
170	III
175	la
177	la
189	III
195	III
197	III
209	la
216	III
219	la
233	la

### 6.3.1. Porcentaje de serotipos para *Streptococcusagalactiae*.

Según los resultados de serotipificación se calculó el porcentaje para cada serotipo de *Streptococcusagalactiae*, lo que se muestra en el siguiente gráfico:

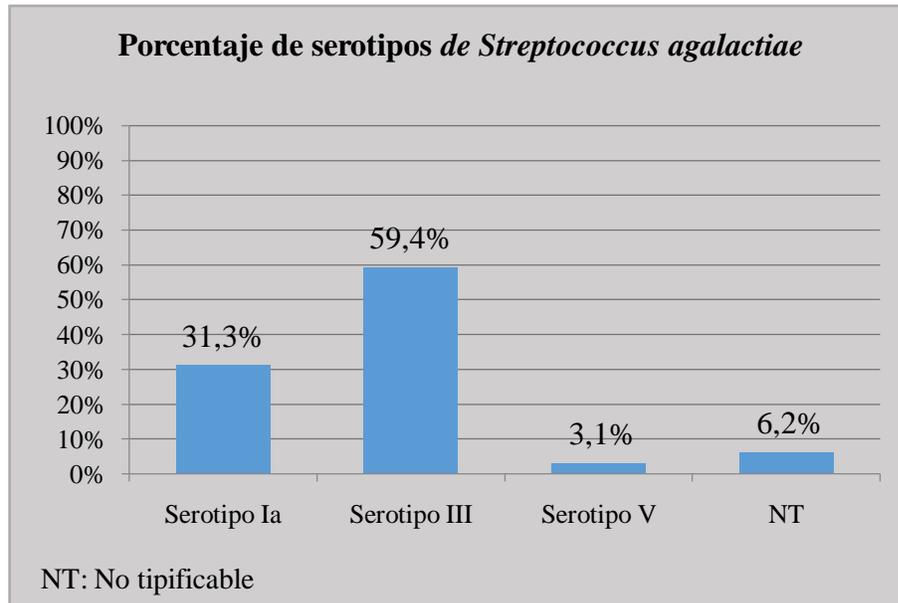


GRAFICO 2. Muestra los porcentajes según los serotipos para *Streptococcusagalactiae*.

### 6.4. Resultados de susceptibilidad de *Streptococcusagalactiae*.

Para realizar la susceptibilidad de las cepas positivas para *Streptococcusagalactiae* se utilizó la técnica Kirby- Bauer (método de difusión en agar) descrito anteriormente.

Los antimicrobianos utilizados fueron: penicilina (10 IU), eritromicina (15 ug) y clindamicina (2 ug).

Luego de su incubación durante 18- 24 horas a 37 °C con 5% de CO2 se procedió a medir los diámetros de los halos de inhibición correspondiente a cada agente microbiano. Para la interpretación de los halos de inhibición se utilizó los puntos de corte para *Streptococcusagalactiae* determinados por el CLSI (Clinical and LaboratoryStandardsInstitute).

Los puntos de corte para los halos de inhibición de *Streptococcusagalactiae* estipulados por el CLSI se muestran en la siguiente imagen.

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria (nearest whole mm)			MIC Interpretive Criteria (µg/ml)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
<b>MACROLIDES</b>									
(8) Susceptibility and resistance to azithromycin, clarithromycin, and dirithromycin can be predicted by testing erythromycin.									
(9) Not routinely reapiant an isolates from the urinary tract.									
A	Erythromycin	15 µg	≥21	16-20	≤15	≤0.25	0.5	≥1	(10) <i>Ra</i> : Recommendations for intrapartum prophylaxis for Group B streptococci are penicillin or ampicillin. Although cefazolin is recommended for penicillin-allergic women at low risk for anaphylaxis, those at high risk for anaphylaxis may receive clindamycin. Group B streptococci are susceptible to ampicillin, penicillin, and cefazolin, but may be resistant to erythromycin and clindamycin. When a Group B Streptococcus is isolated from a pregnant woman with severe penicillin allergy (high risk for anaphylaxis), erythromycin and clindamycin (including inducible clindamycin resistance) should be tested, and only clindamycin should be reported. See Table 3G.
<b>LINCOSAMIDES</b>									
A	Clindamycin	2 µg	≥19	16-18	≤15	≤0.25	0.5	≥1	See comments (9) and (10). (12) Inducible clindamycin resistance can be detected by disk diffusion using the D-zone test and broth microdilution. See Table 3G, Subchapter 3.10.1 in M02-A12, and Subchapter 3.14.1 in M07-A10.

TABLA4. Muestra la tabla 2h-1 Zona de diámetro de *Streptococcusagalactiae*.

#### 6.4.1. Resultados de medición de los halos de inhibición e interpretación.

De un total de 32 cepas de SGB, 13 cepas (40,6 %) resultaron ser Test D positivo y 19 cepas (59,4%) restantes fueron sensibles a eritromicina y clindamicina.

Los resultados de la medición de los halos de inhibición (y la interpretación de los halos de inhibición está basada en la tabla de puntos de corte para *Streptococcusagalactiae*, los cuales se muestran en la siguiente tabla:

<b>TABLA 5. Resultados de medición de los halos de inhibición e interpretación.</b>						
<b>N° de muestra</b>	<b>PEN</b>	<b>interpretación</b>	<b>ERI</b>	<b>interpretación</b>	<b>CLI</b>	<b>interpretación</b>
076	27mm	S	24mm	S	20mm	S
091	26mm	S	25mm	S	20mm	S
100	28mm	S	28mm	S	24mm	S
122	26mm	S	24mm	S	20mm	S
123	26mm	S	20mm	S	17mm	S
135	27mm	S	22mm	S	25mm	S
143	28mm	S	26mm	S	21mm	S
146	28mm	S	24mm	S	21mm	S

**CONTINUACIÓN DE TABLA 5. Resultados de medición de los halos de inhibición e interpretación.**

<b>N° de Muestra</b>	<b>PEN</b>	<b>interpretación</b>	<b>ERI</b>	<b>interpretación</b>	<b>CLI</b>	<b>interpretación</b>
151	25mm	S	25mm	S	20mm	S
152	29mm	S	26mm	S	20mm	S
159	26mm	S	25mm	S	21mm	S
164	27mm	S	24mm	S	21mm	S
175	29mm	S	25mm	S	19mm	S
177	30mm	S	24mm	S	20mm	S
197	28mm	S	25mm	S	23mm	S
209	30mm	S	20mm	S	19mm	S
216	26mm	S	25mm	S	20mm	S
219	27mm	S	25mm	S	21mm	S
233	28mm	S	27mm	S	22mm	S

#### 6.4.2. Resultados de cepas con TEST- D positivo:

<b>TABLA 6. Cepas TEST- D positivo</b>				
<b>Cantidad de Cepas</b>	<b>N° de muestra</b>	<b>Interpretación para agentes antimicrobianos: eritromicina y clindamicina</b>	<b>halo de inhibición para penicilina</b>	<b>Interpretación para el agente microbiano: penicilina</b>
1	015	R	25mm	S
2	115	R	27mm	S
3	118	R	28mm	S
4	132	R	25mm	S
5	133	R	26mm	S
6	136	R	27mm	S
7	140	R	28mm	S
8	155	R	25mm	S
9	157	R	27mm	S
10	161	R	29mm	S
11	170	R	28mm	S
12	189	R	28mm	S
13	195	R	25mm	S

### 6.4.3. Resultados del control de calidad para el estudio de susceptibilidad.

Como se mencionó anteriormente, se utilizó una cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 para el control de calidad de los sensibilizadores de penicilina (10IU), eritromicina (15ug) y clindamicina (2ug). Los resultados de la medición de los halos de inhibición se muestran en la siguiente tabla.

	Halo de penicilina (10IU).	Halo de eritromicina (15ug)	Halo de clindamicina (2ug)
<b>Control N°1</b>	30mm	27mm	22mm
<b>Control N°2</b>	30mm	28mm	23mm

Los halos de inhibición obtenidos se compararon con los puntos de cortes estipulados por el CLSI, lo que se muestra en la siguiente tabla:

<b>Antimicrobial Agent</b>	<b>Disk Content</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49247	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49766	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC® 49226	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619 <sup>a</sup>
Clindamycin	2 µg	–	–	–	19–25
Erythromycin	15 µg	–	–	–	25–30
Penicillin	10 units	–	–	26–34	24–30

**TABLA8. Muestra Los puntos de corte cepa *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 para los sensibilizadores clindamicina (2ug), eritromicina (15ug) y penicilina (10IU). (32)**

### 6.5. Relación entre serotipos de *Streptococcusagalactiae* y susceptibilidad ante los agentes antimicrobiano.

Se estableció una relación entre los serotipos encontrados y la susceptibilidad para *Streptococcusagalactiae* donde se observó que el 100% de los Test- D positivos pertenecen al serotipo III.

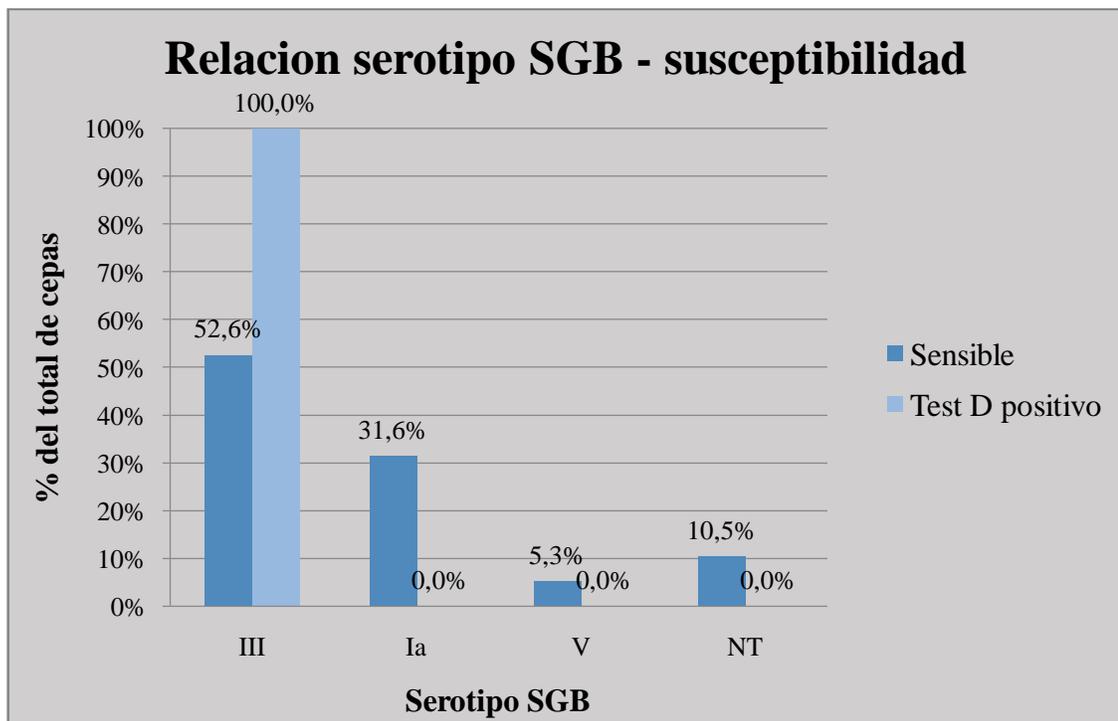


GRAFICO3. Muestra el porcentaje de serotipos presentes en el estudio de susceptibilidad.

## 7. DISCUSIÓN

En el estudio se recolectaron 234 muestras de flujo vaginal, en una población femenina sana en edad fértil de estudiantes de Tecnología Médica de la Universidad Andrés Bello (sede república), de las cuales 32 resultaron positivas para SGB, equivalente a 13,6% de portación de este microorganismo. Este resultado de colonización es menor al encontrado en un estudio similar realizado en el Centro Militar de Estados Unidos donde se obtuvo un valor de 18,3% de portación de SGB en mujeres no embarazadas, sin embargo concuerda con los datos entregados por el boletín de Instituto de Salud Pública de Chile (Vol. 2, No. 10, Junio 2012) donde se estipula que existe un 14% de portación de *Streptococcusagalactiae* en mujeres embarazadas en Chile.

La concordancia entre los porcentajes de portación de SGB entre las mujeres embarazadas y las mujeres no embarazadas se debió a que la población estudiada está dentro de la misma ubicación geográfica y presenta los mismos factores ambientales y culturales que la población de mujeres embarazadas. Siendo los factores ambientales, geográficos y culturales importantes en los diferentes estudios realizados alrededor del mundo donde se encuentran diferentes porcentajes de portación en cada país y donde no existe un porcentaje de portación mundial estimado ya que varía entre 5-30% (33)

Con este resultado se puede ver que el porcentaje de portación de SGB en Chile no ha disminuido ni ha aumentado en el tiempo tomando en cuenta estudios realizados en 2004 donde hubo un porcentaje de portación de 14% al igual que la presente investigación. (34)

Otro punto importante es el rango etario de las mujeres que participaron en el estudio que va desde 18 a 31 años. Se obtuvo un mayor porcentaje de portación vaginal en las mujeres de 23 años con un 28%, seguido de las

mujeres de 18 y 20 años con un porcentaje de portación de un 18% respectivamente. En otros estudios se ha relacionado la edad de las mujeres portadoras de SGB con su actividad sexual.

Un estudio realizado en la fundación valle de Lili, en Colombia permitió afirmar que con el tiempo, la prevalencia de colonización de SGB ha aumentado progresivamente debido a factores de riesgo como la promiscuidad, ya que se ha encontrado a este microorganismo como colonizador en muestras de líquido prostático, semen y secreciones uretrales. (35)

Con respecto a la Serotipificación de las cepas positivas para SGB, se obtuvo como resultado que el 60% de las cepas pertenecían al serotipo III, el 31% al serotipo Ia, el 3% al serotipo V y un 6% a otros serotipos. En base a estos resultados y a los datos obtenidos en otros estudios internacionales como nacionales donde se indica que los serotipos más frecuentemente asociados a enfermedad neonatal son el tipo Ia (40%), tipo III (30%), y más recientemente, el tipo V (15%). El porcentaje restante corresponde principalmente a los serotipos Ib y II (estudio realizado en Estados Unidos) y los serotipos más prevalentes en Chile, el Ia, II y III, siendo el tipo III el más frecuentemente asociado a colonización vaginal en embarazadas y sepsis neonatal (36) podemos afirmar que los datos obtenidos en esta investigación concuerdan con los resultados mencionados anteriormente en los otros estudios y que el serotipo más frecuente es el III.

El CLSI ha estipulado que la penicilina y ampicilina son fármacos de elección para el tratamiento de infecciones por *Streptococcus* B-hemolíticos. Además menciona que la susceptibilidad a penicilina, aprobado por la FDA (Food and Drug Administration), no se realiza de forma rutinaria, ya que aislamientos no susceptibles a penicilina son extremadamente raros y no se han reportado casos de resistencia de penicilina para los *Streptococcus* B-hemolíticos. (37)

Los resultados obtenidos en el análisis de susceptibilidad de un total de 33 cepas identificadas como SGB, resultaron todas ser sensibles o susceptibles a penicilina, comprobando la hipótesis planteada en la investigación y coincidiendo con lo mencionado en el CLSI.

El CLSI recomienda realizar el test-D a todos los *Streptococcus*β- hemolíticos, debido a la resistencia inducible a clindamicina intratratamiento llamado fenotipo iMLSb.

Al realizar el Test -D a las 33 cepas positivas para SGB (100%), 19 resultaron ser sensibles a Eritromicina y Clindamicina (59,4%) y 13 cepas mostraron un fenotipo iMLSb o test-D positivo (40,6%). Además no se encontraron cepas de SGB con fenotipo M ni Fenotipo L de resistencia, demostrándose que estos presentan una menor frecuencia como se describe en la literatura. (26)

El estudio de susceptibilidad es de suma importancia ya que evitamos una profilaxis inadecuada intraparto en gestantes alérgicas a las penicilinas y se evita también crear un aumento en la resistencia a los antibióticos que muchas veces son usados sin estudios.

Con los datos obtenidos en la serotipificación y la susceptibilidad podemos indicar que del 40,6% de las cepas que se identificaron con fenotipo iMLSb, el 100% corresponden al serotipo III. Esto coincide con el estudio de genes de resistencia asociados a serotipos capsulares publicado por la revista Scielo, donde los serotipos III Y V, presentaban un mayor número de genes de resistencia. Sin embargo en el análisis de susceptibilidad de esta unidad de investigación el serotipo V encontrado no mostró ningún fenotipo de resistencia.

## 8. CONCLUSIÓN

Según el estudio se puede concluir que existe un 13,6% de portación de *Streptococcusagalactiae* en una población femenina sana en edad fértil de estudiantes de Tecnología Médica, Sede República de la Universidad Andrés Bello similar al porcentaje de portación en mujeres embarazadas en Chile.

Los métodos utilizados para la identificación de *Streptococcusagalactiae* en la investigación fueron empleados según lo recomendado por el CLSI y CDC por cual son válidos para ser realizados en estudios posteriores y que incluye un porcentaje de portación similar al de otros estudios realizados con otros métodos también recomendados.

También se puede concluir que los serotipos más frecuentes en Chile corresponden al serotipo III y Ia.

A través de la susceptibilidad se pudo corroborar que las 33 cepas identificadas como *Streptococcusagalactiae* el 100% son sensibles a penicilina independiente del serotipo identificado.

Además, se determinó que el fenotipo de resistencia más frecuente es el iMLSb, sin encontrarse fenotipo cMLSb, fenotipo M ni fenotipo L. y que todas las cepas iMLSb pertenecen al serotipo III.

Por lo tanto, conocer la caracterización fenotípica y los serotipos más frecuentes en mujeres sanas en edad fértil aporta importantes datos epidemiológicos, los cuales colaboran al ámbito de la salud pública, permitiendo conocer la distribución y frecuencia de los serotipos, para la posible fabricación de futuras vacunas contra este microorganismo y así disminuir el abuso de la

profilaxis antibiótica intraparto, lo cual a través del tiempo ha generado resistencia en otros microorganismos.

Al detectar la emergencia de nuevas cepas de *Streptococcusagalactiae*, se podrían adecuar las estrategia de prevención en la enfermedad neonatal en el recién nacido a través de tratamientos efectivos y oportunos.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) Rojo, P., Araya, P., Martínez, T., Angélica, M., Hormazábal, J. C., Maldonado, A., & Fernández, J. (2008). Caracterización molecular en aislados chilenos de *Streptococcusagalactiae*. Revista médica de Chile, 136(5), 606-612.
- 2) Manuel de la Rosa Fraile y Marina de Cueto López, *Streptococcusagalactiae*, Servicio de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 12 julio 2014.
- 3) Ellis., A. Infección por *Streptococcusagalactiae* en recién nacidos. ¿Qué logros alcanzamos y qué nos falta? [Internet]. Jornadas del Centenario de Jornadas de la Sociedad Argentina de Pediatría – Infectología Pediátrica; abril de2011; Buenos Aires, Argentina [14 julio 2014]. Disponible en: [http://www.sap.org.ar/docs/congresos/2011/infectologia/ellis\\_p](http://www.sap.org.ar/docs/congresos/2011/infectologia/ellis_p)
- 4) Murray, P., Rosenthal, K. S., &Pfaller, M. A. (2015). Microbiología médica. Elsevier Brasil.
- 5) Johri, A. K., Paoletti, L. C., Glaser, P., Dua, M., Sharma, P. K., Grandi, G., &Rappuoli, R. (2006). Group B Streptococcus: global incidence and vaccine development. Nature Reviews Microbiology, 4(12), 932-942.
- 6) Murray, P., Rosenthal, K. S., &Pfaller, M. A. (2015). Microbiología médica. Elsevier Brasil. Página 234
- 7) Doerr., S. Group B Strep Infection [Internet]. MedicineNet; 2014 [14 julio 2014]. Disponible en: [http://www.medicinenet.com/group\\_b\\_strep/article.htm](http://www.medicinenet.com/group_b_strep/article.htm).

- 8) CRUZ, M., DOREN, A., & ABARZÚA, F. (2008). Sepsis neonatal por *Streptococcus* grupo B. *Revista chilena de pediatría*, 79(5), 462-470.
- 9) Murray, P., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2015). *Microbiología médica*. Elsevier Brasil. Sección 22, página 235
- 10) Verani, J. R., McGee, L., & Schrag, S. J. (2010). Prevention of perinatal group B streptococcal disease: Revised guidelines from CDC, 2010. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention.
- 11) Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Epidemiology Program Office, 1996.
- 12) Bermúdez, P. M. M., Santos, M. P., Campoy, E. M., & de la Torre, F. M. (2013). Infección Neonatal por *Streptococcusagalactiae*. Revisión y actualización sobre la prevención. *Revista Médica Digital*, 1(2).
- 13) Ortiz, M. D. P. C., & Vélez, J. D. (1996). Importancia clínica del *Streptococcusagalactiae* como causante de infección. *Colombia Médica*, 27(2), 53-58.
- 14) Vandepitte, J., Engbaek, K., Piot, P., & Heuck, C. C. (1993). Métodos básicos de laboratorio en bacteriología clínica.
- 15) Boletín ISP Vol. 2, No. 10, Junio 2012, página 2
- 16) Ippolito, D. L., James, W. A., Tinnemore, D., Huang, R. R., Dehart, M. J., Williams, J., ...& Demons, S. T. (2010). Group B streptococcus serotype prevalence in reproductive-age women at a tertiary care military medical center relative to global serotype distribution. *BMC infectious diseases*, 10(1), 336.

- 17) Rojo, P., Araya, P., Martínez, T., Angélica, M., Hormazábal, J. C., Maldonado, A., & Fernández, J. (2008). Caracterización molecular en aislados chilenos de *Streptococcusagalactiae*. *Revista médica de Chile*, 136(5), 606-612.
- 18) Alarcón, P. (2011). Diagnóstico microbiológico del género *Streptococcus*. *Laboratorio de Referencias Cocáceas Gran Positivas. Instituto de Salud Pública. Chile*.
- 19) Del Valle, A. G., & Durán, M. D. L. M. Z. (1998). *Manual: microbiología médica: 9o semestre*. UNAM, Página 20.
- 20) Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). Koneman. Diagnóstico Microbiológico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas. 6ta. Ed. Médica Panamericana. 685.
- (21) Camponovo C., Rossanna. (2002). Problemas de resistencia en *Streptococcuspyogenes*. *Revista chilena de Infectología*, 19(Suppl. 2), 107-110., from [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182002019200008&lng=en&tng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182002019200008&lng=en&tng=es). 10.4067/S0716-10182002019200008.
- 22) Zorn, B. G. (2001). CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y PAPEL EN LA PATOGENESIS DE SmcL, UNA ESFINGOMIELINASA C DE *Listeria ivanovii*. Universidad Complutense de Madrid.
- 23) Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). Koneman. Diagnóstico Microbiológico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas. Ed. Médica Panamericana. 1408.
- 24) Ruiz, V. A., & Guillén, S. M. (2006). Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y Microbiología clínica. Ed. Médica Panamericana. 275.
- 25) Inserto del kit Group-B streptococcitypingantisera DENKA SEIKEN.
- 26) ArtilesCampelo, F., Cañas Pedrosa, A., Álamo Antúnez, I., & Lafarga Capuz, B. (2012). Fenotipos y mecanismos de resistencia a macrólidos y lincosamidas

en aislados de *Streptococcusagalactiae* con significación clínica en un período de ocho años (2002-2010). RevEspQuimioter, 42-46.

27) Organizador, C. (2005). Terceras Jornadas de la Facultad de Ciencias Veterinarias (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires).

28) Working in Epidemiology, WinEpi 2.0. Disponible en: <http://www.winepi.net>

29) Sampieri, R. H., Collado, C. F., Lucio, P. B., & Pérez, M. D. L. L. C. (1998). Metodología de la investigación. McGraw-Hill. 5ta. Edition. Editorial Mc. Craw Hill. 2010. Capítulo 8. 176-183

30) Universidad Andrés Bello, Guía de formularios para la recolección de antecedentes para procesos de acreditación de carreras, Sección C, Información cuantitativa, Tabla G: vacantes y alumnos matriculados según género.

31) Mera, J. E. C., & Rueda, X. E. V. En Laboratorio Clínico.

(32) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Approved Standards M2- A7, Eighteenth Informational Supplement. Wayne, PA: CLSI document M100 –S18; 2008. Página 150

(33) Ippolito, D. L., James, W. A., Tinnemore, D., Huang, R. R., Dehart, M. J., Williams, J. & Demons, S. T. (2010). Group B streptococcus serotype prevalence in reproductive-age women at a tertiary care military medical center relative to global serotype distribution. BMC infectious diseases, 10(1), página 5.

(34) Valdés R, Enrique, Pastene S, Carolina, Morales P, Alejandro, Gutiérrez R, Bárbara, Canales P, Ana, Martínez O, Pabla, Juárez D, Guido, & Caballero T, Rafael. (2004). PREVALENCIA DE COLONIZACIÓN POR STREPTOCOCCUS AGALACTIAE (GRUPO B) DURANTE EL EMBARAZO PESQUISADO EN

MEDIO DE CULTIVO SELECTIVO. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 69(2), 132-135. Recuperado en 04 de enero de 2016, de [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-75262004000200008&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75262004000200008&lng=es&tlng=es). 10.4067/S0717-75262004000200008.)

(35) Ortiz, M. D. P. C., & Vélez, J. D. (1996). Importancia clínica del *Streptococcusagalactiae* como causante de infección. *Colombia Médica*, 27(2), 53-58.

36) Campodónico, L., Doren, A., Cruz, M., &Abarzúa, F. (2008). Profilaxis de Sepsis Neonatal Precoz por *Streptococcusagalactiae* (grupo b) Basada en Vacunas: Revisión de la Literatura. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 73(6), 411-418.

37) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Approved Standards M2- A7, Eighteenth Informational Supplement. Wayne, PA: CLSI document M100 –S18; 2008. Página 90.

## **Anexo 1: Consentimiento informado**

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Usted está invitado a participar del proyecto de Unidad de Investigación titulado "Estudio de portación de *Streptococcusagalactiae*, Serotipificación y Detección de Fenotipos de Resistencia MLSb , M y L. en una Población Femenina Sana en Edad Fértil de Estudiantes de Tecnología Médica de La Universidad Andrés Bello". Este estudio será realizado por Valentina Alfaro, Camila Amtahuer, Katherine Naranjo y DarinkaTraipede la Carrera de Tecnología Médica de la Universidad Andrés Bello sede República será guiado por el Académico Patricia Rojo Lira, el cual será el Investigador Responsable de este estudio.

El objetivo principal de este estudio es:

Determinar la colonización de *Streptococcusagalactiae* en una población sana de estudiantes de Tecnología Médica de la Universidad Andres Bello, con la detección de los distintos serotipos y fenotipos de resistencia a macrólidos y lincosamidas.

Su participación en este estudio es voluntaria y si Ud. Está de acuerdo se le realizarán los siguientes procedimientos, ninguno de los cuales le implicará un gasto: Se tomará una muestra vaginal con torula y ésta se mantendrá en medio de transporte Stuart a temperatura ambiente, hasta su posterior análisis.

La participación en estas actividades no involucra pago o compensaciones.

Es importante que sepa que Ud. No sufrirá ningún riesgo, incomodidad o molestia con la realización de estos procedimientos y si algo ocurriese los autores de este estudio estarán totalmente disponibles para ayudarle o contestar cualquier inquietud. Además se le realizará una consejería a cada participante explicando que en la eventualidad de salir positivo o negativo en la

pesquisa de *Streptococcusagalactiae*, tendrá que realizarse nuevamente el examen en caso de estar embarazada, pero en el 3° trimestre de éste, según protocolo CDC.

Su participación es de gran importancia para el desarrollo de este estudio ya que estará contribuyendo A evidenciar la presencia de un microorganismo descrito como agente etiológico de la enfermedad invasora en el Recién Nacido, pero que en algunos casos se encuentra como portación a nivel vaginal en mujeres en edad fértil.

Se garantiza que sus datos personales se mantendrán en completa privacidad y anonimato. Todos los datos y documentos de este estudio los mantendrá archivados durante 5 años el investigador responsable, periodo después del cual serán eliminados. Los resultados de esta investigación pueden ser publicados, sin identificar a los participantes, en medios de difusión con objetivos académicos.

Usted tiene la libertad para decidir si quiere participar del estudio y puede retirar su autorización en cualquier momento, sin necesidad de justificarse.

Este Consentimiento Informado será firmado en 2 copias, quedando una en su poder, y otra en poder del Investigador Responsable. A continuación, se indican los datos de contacto del investigador responsable para aclarar sus dudas e inquietudes siempre que Ud. Lo encuentre necesario.

- Nombre del Investigador Responsable: Patricia Isabel Rojo Lira
- Teléfono: 26618264 – 92225295
- Correo electrónico: [patricia.rojo@unab.cl](mailto:patricia.rojo@unab.cl)

## Firma del Investigador Responsable

**Declaro que leí este documento, estoy de acuerdo con lo expuesto y acepto participar de este estudio.**

Nombre del participante:

\_\_\_\_\_

RUT: \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_  
Teléfono \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
**Firma del  
Participante  
del  
Estudio**

Ciudad y Fecha: \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_\_

## **Anexo 2: Instructivo de toma de muestra**

### **Instructivo de Toma de Muestra Vaginal**

**En este instructivo se le indicará como debe realizar la toma de muestra vaginal.**

**Además se le entregará un sobre el cual contiene en su interior una tórula estéril y un tubo. Este tubo es el medio de transporte para mantener la muestra y es en donde depositará la tórula.**

**Para obtener una adecuada muestra debe considerar los siguientes requisitos:**

- **No debe** estar en su periodo menstrual.
- Debe **tener un periodo de abstinencia sexual de 48 horas** como mínimo antes de la toma de muestra.
- Durante 48 horas previas a la toma de muestra **no utilizar talcos, cremas, colonias, óvulos vaginales ni jabones sépticos** al momento de realizar el aseo diario.
- **No debe** estar cursando ningún tipo de molestia urinaria (infección urinaria) o genital, ni tampoco estar en tratamiento con antibiótico.

#### **Indicaciones de Toma de Muestra:**

**Será de suma importancia que la muestra sea tomada antes de la ducha o del aseo diario.**

1. Primero debe lavar bien las manos con abundante agua y jabón. Terminado este proceso rompa el sobre por el lado que viene el mango de la tórula.
2. Descubrir la zona vaginal, retirar la tórula procurando tomar el mango de ésta, dejando en su interior el tubo que servirá como medio de transporte para la tórula.
3. Colocarse en una posición cómoda evitando tocar con la tórula la piel, entre piernas, ropa, etc. Para evitar cualquier contaminación de la tórula.
4. A continuación introducir en la vagina SOLO la parte de la tórula que posee algodón, girando la tórula unos segundos.
5. Terminado este proceso tomar el tubo que quedó en el interior del sobre, retirar la tapa del tubo y colocar la tórula en su interior. Debe preocuparse de que éste quede bien cerrado.
6. En el sobre que venía inicialmente la tórula y el tubo, colocar el tubo que ya tiene la tórula en su interior.
7. Si no entrega la muestra el mismo día, la debe depositar en un lugar limpio, libre de contaminación y a temperatura de ambiente.

En el caso de cualquier duda o consulta puede comunicarse con los investigadores llamando a los siguientes números:

Investigadores	Teléfono
Darinka Traipe Alvarez	79207586
Katherine Naranjo Borquez	93207572
Camila Amthauer Pizarro	88897505
Valentina Alfaro Saavedra	56653803