

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Caracterización de factores de virulencia y de resistencia a partir de borradores de genoma completo de aislados vagino-rectales de *S. agalactiae* de mujeres embarazadas provenientes de una unidad médica de 3er nivel del noreste de México**

Por

L.B.G. Juan Manuel Quiroga Garza

Como requisito parcial para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

2022

**Caracterización de factores de virulencia y de resistencia a partir de borradores de genoma completo de aislados vagino-rectales de *S. agalactiae* de mujeres embarazadas provenientes de una unidad médica de 3er nivel del noreste de México**

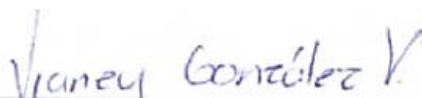
Comité de Tesis



---

Dr. José Manuel Vázquez Guillén

Director de Tesis



---

Dra. Vianey González Villasana

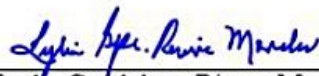
Secretario



---

Dra. Cristina Rodríguez Padilla

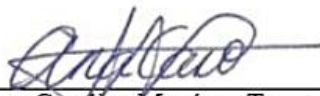
Vocal



---

Dr. Lydia Guadalupe Rivera Morales

Vocal



---

Dr. Ana Carolina Martínez Torres

Vocal



---

Dra. Katiushka Arévalo Niño

Subdirectora de posgrado



SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO

**Caracterización de factores de virulencia y de resistencia a partir de borradores de  
genoma completo de aislados vagino-rectales de *S. agalactiae* de mujeres  
embarazadas provenientes de una unidad médica de 3er nivel del noreste de  
México**

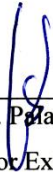
**Dirección de tesis**



---

Dr. José Manuel Vázquez Guillén

Director



---

Dr. Gerardo C. Palacios Saucedo

Director Externo

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

El presente trabajo se realizó gracias a las facilidades prestadas por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.



## **LUGAR DE TRABAJO**

El presente trabajo fue desarrollado en:

- La Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Especialidades No. 25 y la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 23, Hospital de Ginecología y Obstetricia “Dr. Ignacio Morones Prieto”, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con el Dr. Gerardo C. Palacios Saucedo como Director Externo del proyecto de tesis.
- El Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. con el Dr. José Manuel Vázquez Guillén como Director del proyecto de tesis.
- El Laboratorio de Secuenciación Genómica Tec BASE del Centro de Biotecnología FEMSA del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM) con la asesoría de la Dra. Rocío Alejandra Chávez Santoscoy, el Dr. Jesús Hernández Pérez y la Dra. Silvia Alejandra Hinojosa Álvarez.
- El Laboratorio de Genómica y Bioinformática del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR); CONACYT. La Paz, Baja California Sur con la asesoría del Dr. Ricardo Vázquez Juárez.

## **FINANCIAMIENTO**

El presente trabajo contó con el financiamiento por parte de:

- El Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL y el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) de la Dirección de Investigación, Secretaría de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico de la U.A.N.L.
- El Fondo de Investigación en Salud No. FIS/IMSS/PROT/PRIO/15/047 del “Concurso de Apoyo Financiero para el Desarrollo de Protocolos de Investigación y Desarrollo Tecnológico sobre Temas Prioritarios de Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social” y el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (FOSISS) CONACYT No. 290608 Convocatoria 2017-01. El Dr. Gerardo C. Palacios Saucedo fue apoyado por una Beca de Excelencia en Investigación de la Fundación IMSS A.C.
- El Laboratorio de Secuenciación Genómica Tec BASE del Centro de Biotecnología FEMSA del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM).

## **ASESORES EXTERNOS**

Para la realización del presente trabajo se contó con la asesoría externa especializada de:

Dra. Rocío Alejandra Chávez Santoscoy<sup>1</sup>

Dr. Jesús Hernández Pérez<sup>1</sup>

Dra. Silvia Alejandra Hinojosa Álvarez<sup>1</sup>

M.C. Julio A. Hernández González<sup>2</sup>

Dr. Ricardo Vázquez Juárez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Secuenciación Genómica Tec BASE del Centro de Biotecnología FEMSA del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM).

<sup>2</sup>Laboratorio de Genómica y Bioinformática del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR); CONACYT.



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar al Dr. José Manuel Vázquez Guillén, quien ha fungido como mi director y guía en mi formación los últimos 3 años. Un gran amigo que me ha apoyado durante todo el proceso que culmina en la realización de este proyecto y que me ha mostrado la pasión por la ciencia como ninguna otra persona.

A mi compañero y amigo, el M.C. Aldo Flores, por enseñarme el camino a seguir durante todo el proyecto y apoyarme en cada momento que lo necesité. Una gran persona dentro y fuera del laboratorio que sé, tendrá un futuro brillante.

Por su orientación y atención a mis consultas, mi agradecimiento a las Dras. Ana Carolina Martínez y Vianey González Villasana. A la Dra. Lydia Guadalupe Rivera, por apoyarme siempre que lo he necesitado. A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, por facilitarme el espacio y el material necesario para la realización de este proyecto. Al Dr. Gerardo del Carmen Palacios Saucedo, por la revisión cuidadosa que ha realizado a este texto y sus valiosas sugerencias en las presentaciones parciales del proyecto.

A los equipos de trabajo de los centros de investigación TecBASE y CIBNOR, encabezados por la Dra. Rocío Alejandra Chávez Santoscoy y el Dr. Ricardo Vázquez Juárez, respectivamente, por su enorme contribución con el material y activos necesarios para la realización de este proyecto.

A mis compañeros y amigos del L7; Alondra, Alonso, Andrea y Lety, por hacer siempre ameno nuestro lugar del trabajo y poder compartir sus risas y lindos momentos con un servidor.

A mi familia, papás y hermanos, que han estado de manera incondicional en cada etapa de mi vida, a quienes amo con todo mi ser.

A Fer, mi novia, por ser la persona que más me apoyó en la realización de este trabajo.

Sin el apoyo de todos ellos, este trabajo jamás habría sido realizado, y por eso, este trabajo también es suyo.

Gracias a todos

## DEDICATORIA

A toda mi familia,

A mis padres, quienes han sido el pilar fundamental en mi vida y a quienes les debo todo lo que soy ahora. Por su paciencia, comprensión, apoyo y amor incondicional durante cada momento de mi vida y quienes me han motivado a ser cada día mejor y no tener miedo a los retos que se me presenten en la vida.

A mis hermanos, por compartir conmigo cada momento de felicidad a lo largo de nuestra vida.

A mis tíos Rocío y Paco, por el amor y apoyo que me han brindado siempre que los he necesitado. Por darme palabras de aliento en todo momento y no dejarme caer nunca.

A Kika, mi prima amada, que me ha acompañado en incontables noches de desvelo.

A Fer, mi novia, para ella especialmente va dedicada esta tesis. Por su amor, su fuerza, su carácter, su comprensión. Por ser tan única en su forma de ser, por apoyarme en mis decisiones, por crecer conmigo, por creer en mí. Es ella quien me da el equilibrio que necesito en mis días. Es ella quien saca lo mejor de mí. Es con ella con quien quiero compartir, no menos que toda mi vida.

# ÍNDICE

<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes.....</b>	<b>2</b>
2.1. Agente Causal .....	2
2.2. Factores de riesgo .....	2
2.3. Colonización e infección en infantes neonatos por <i>S. agalactiae</i> .....	2
2.3.1. Patogénesis .....	3
2.3.2. Consecuencias post-infección.....	4
2.4. Políticas de detección y prevención .....	4
2.5. Mortalidad.....	5
2.6. Serotipos .....	5
2.7. Distribución en México .....	6
2.8. Factores de virulencia .....	6
2.8.1. Polisacárido Capsular .....	7
2.8.2. C5a peptidasa (ScpB) .....	8
2.8.3. CspA .....	9
2.8.4. LMB.....	9
2.8.5. Proteína C .....	10
2.8.6. Adhesina Hipervirulenta (HvgA) .....	11
2.8.7. Pili.....	12
2.8.8. Proteínas de Unión a Fibrinógeno .....	13
2.8.8.1. FbsA .....	13
2.8.8.2. FbsB.....	14
2.8.9. Superóxido dismutasa.....	14

2.8.10. Proteínas de repetición ricas en serina (Srr) .....	15
2.8.11. Toxinas formadoras de poros .....	15
2.8.11.1. $\beta$ -hemolisina/citolisina ( $\beta$ -H/C) .....	15
2.8.11.2. Factor CAMP.....	16
2.9. Genes de resistencia.....	16
2.9.1. Resistencia a macrólidos .....	17
<b>3. Justificación .....</b>	<b>19</b>
<b>4. Hipótesis.....</b>	<b>20</b>
<b>5. Objetivos .....</b>	<b>21</b>
5.1. Objetivo general.....	21
5.2. Objetivos específicos .....	21
<b>6. Materiales y métodos .....</b>	<b>22</b>
6.1. Aislamiento de <i>S. Agalactiae</i> .....	22
6.2. Obtención del ADNg .....	22
6.3. Preparación de las librerías para secuenciación de genoma completo .....	23
6.4. Procesamiento bioinformático de los datos generados. ....	25
<b>7. Resultados .....</b>	<b>26</b>
7.1. Aislamiento de EGB.....	26
7.2. Calidad del ADNg obtenido .....	27
7.3. Análisis bioinformático de las lecturas y generación de ensamblés .....	28
7.4. Identificación y mapeo de genes del polisacárido capsular y factores de virulencia.....	30
7.5. Identificación de genes de resistencia a antibióticos .....	38

<b>8. Discusión .....</b>	<b>40</b>
<b>9. Conclusiones .....</b>	<b>52</b>
<b>10. Bibliografía .....</b>	<b>53</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tablas	Página
1. Características clínicas de 51 mujeres embarazadas colonizadas por <i>S. agalactiae</i> .....	26
2. Concentración en ng por $\mu$ L del ADNg obtenido de 51 aislados vagino-rectales de <i>S. agalactiae</i> .....	27
3. Características de calidad de los ensambles obtenidos a partir de las 51 librerías de ADNg de los aislados vagino- rectales de <i>S. agalactiae</i> .....	29
4. Comparación de la serotipificación de 51 aislados de EGB mediante aglutinación con látex y secuenciación.....	30
5. Comparación de la serotipificación de cada aislado entre aglutinación en látex y secuenciación.....	31
6. Factores de virulencia identificados en 26 aislados vagino-rectales de <i>S. agalactiae</i> (Aislados 1 al 26).....	34
7. Factores de virulencia identificados en 26 aislados vagino-rectales de <i>S. agalactiae</i> (aislados 27 al 51) .....	34
8. Genes de resistencia a antibióticos identificados en 51 aislados vagino-rectales de <i>S. agalactiae</i> .....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Comparación de los loci de CPS de los 10 serotipos (Ia, Ib, II-IX). Los genes dentro de la región variable se destacan en coloración naranja .....	7
2. C5a peptidasa. Dominio de actividad de la proteasa (Protease), dominio asociado a la proteasa (PA) y dominios de tipo III de fibronectina; Fn1, Fn2, Fn3.....	8
3. Organización genómica de la región intergénica scpB-lmb.....	10
4. Representación esquemática de las proteínas de superficie estreptocócica del grupo B..	11
5. Estructura del locus bibA/hvgA.....	12
6. Familia de proteínas repetidas ricas en serina. Dominio N1, N2, y N3 y dominio de glicosilación de repetición rico en serina SRR1 y SRR2 .....	15
7. Electroforesis para evaluación de la integridad del ADNg obtenido de 51 aislados de <i>S. agalactiae</i> .....	27
8. Mapeo de los genes que codifican para el polisacárido capsular de ácido siálico en 26 aislados (1 al 26) de <i>S. agalactiae</i> mediante alineamiento de secuencias con el programa BRIG.....	31
9. Mapeo de los genes que codifican para el polisacárido capsular de ácido siálico en 25 aislados (27 al 51) de <i>S. agalactiae</i> mediante alineamiento de secuencias con el programa BRIG.....	32
10. Mapeo de los genes que codifican para los factores de virulencia ScpB, sodA, cspA, lmb, FbsA, FbsB, bca, HvgA, srr-1, srr-2, bibA, PI-1, PI-2a, PI-2b, dltA-D, ponA, CylE y cfb en 26 aislados (1 al 26) de <i>S. agalactiae</i> mediante alineamiento de secuencias con el programa BRIG.....	35
11. Mapeo de los genes que codifican para los factores de virulencia ScpB, sodA, cspA, lmb, FbsA, FbsB, bca, HvgA, srr-1, srr-2, bibA, PI-1, PI-2a, PI-2b, dltA-D, ponA, CylE y cfb en 25 aislados (27 al 51) de <i>S. agalactiae</i> mediante alineamiento de secuencias con el programa BRIG.....	36

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

EGB	Estreptococo del Grupo B
CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention)
EOD	Enfermedad de inicio temprano (Early onset disease)
LOD	Enfermedad de inicio tardío (Late onset disease)
Cps	Biosíntesis del polisacárido capsular (Capsular Polysaccharide Biosynthesis)
$\beta$ -H / C	$\beta$ -hemolisina / citolisina
HvgA	Adhesina Hipervirulenta (hypervirulent GBS adhesin)
Lmb	Adhesina de unión a laminina (laminin-binding adhesin)
FbsA	Proteína A de unión a fibrinógeno (fibrinogen-binding protein A)
FbsB	Proteína B de unión a fibrinógeno (fibrinogen-binding protein B)
Bca	Proteína alfa C (Alpha C protein)
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
Ng	Nanogramos
$\mu$ L	Microlitros
BLT	Bead-Linked Transposomes
TB1	Tagmentation Buffer 1
TBS	Tagmentat Stop Buffer
TWB	Tagment Wash Buffer
EPM	Enhanced PCR Mix
min	Minutos
seg	Segundos
SPB	Sample Purification Beads
RSB	Resuspension Buffer
SRA	Sequence Read Archive
RN	Recién Nacido
FPTP	Falta de progresión de trabajo de parto
IVU	Infección en vías urinarias
CDS	Secuencias codificantes (Coding sequences)
pb	Pares de bases
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
BRIG	BLAST Ring Image Generator



## RESUMEN

*Streptococcus agalactiae* o Estreptococo del grupo B (EGB) es un microorganismo que se ha asociado con septicemia y meningitis infecciosas en el ser humano y es particularmente importante debido a la infección que causa en neonatos, principalmente por transmisión directa desde el tracto genital de la madre, a pesar de que forma parte de la flora habitual del tracto digestivo y respiratorio. Diversos estudios han determinado tasas de colonización que oscilan entre 5 y 35% en gestantes, con una variación importante dependiendo de la población en estudio y según la región geográfica en que se encuentre. En el presente trabajo se realizó un estudio genómico comparativo para la genotipificación del Polisacárido Capsular, y posterior determinación molecular de los serotipos de EGB, así como la identificación de los factores de virulencia y genes de resistencia a partir de 51 aislados vaginales de mujeres embarazadas. A partir de borradores de genoma completo ensamblados *de novo*, se mapearon por homología los genes que codifican para el Polisacárido capsular y los factores de virulencia: ScpB, sodA, cspA, lmb, FbsA, FbsB, bca, HvgA, srr-1, srr-2, bibA, PI-1, PI-2a, PI-2b, dltA-D, ponA, CylE y cfb que se han visto implicados en sistemas de evasión inmune como adhesión celular, formación de poros, resistencia a AMPs, entre otros. De igual manera se llevó a cabo una identificación de los genes de resistencia a antibióticos mreA, AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia, IsaE, APH(3')-IIIa, mprF, tetM, Tet (W/N/W), mefA, tet(45), qacJ, SAT-4 y ErmB. Los aislados con locus CPS identificados, corresponden a los serotipos Ia, Ib, II, III, IV y V, siendo predominante el serotipo II con una prevalencia del 27.45%. Los locus sodA, cspA, lmb, dltA-D, ponA, CylE y cfb fueron encontrados en la totalidad de los aislados, mientras que, el locus ScpB, fue identificado en el 98.04% de los aislados. El orden de frecuencia total encontrada para el resto de los factores fue de; FbsA 90.19%; PI-1 76.47%; bca 72.54%; srr-1 70.58%; PI-2a 68.62%; FbsB 54.90%; HvgA 39.21%; srr-2 37.25%; bibA y PI-2b con un 35.29%. Con respecto a la resistencia a antibióticos, todos los aislados fueron positivos a la presencia del gen mreA, mientras que el gen mprF fue identificado en el 98.04 % de los aislados. Los factores tetM y AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia, fueron identificados en 60.78% y 15.68% de los aislados, respectivamente. Por último, los factores Tet (W/N/M), mefA y tet (45) fueron identificados en solo el 3.92%, y solo en un aislado se presentaron los factores APH(3')-IIIa, IsaE, qacJ, SAT-4 y ErmB.

## ABSTRACT

*Streptococcus Agalactiae* or Group B *Streptococcus* (GBS) is a microorganism that has been associated with infectious septicemia and meningitis in humans and is particularly important due to the infection it causes in neonatal infants, mainly by direct transmission from the genital tract of the mother, even though it is part of the normal flora of the digestive and respiratory tract. Various studies have determined colonization rates that range between 5 and 35% in pregnant women, with a significant variation depending on the population under study and according to the geographical region in which it is found. In the present work, a comparative genomic study for the genotyping of Capsular Polysaccharide, and subsequent molecular determination of GBS serotypes, as well as the identification of virulence factors and resistance genes from 51 vaginal isolates from women. pregnant from de novo assembled whole genome drafts, the genes encoding the capsular polysaccharide and virulence factors will be mapped by homology: ScpB, soda, cspA, lmb, FbsA, FbsB, bca, HvgA, srr-1, srr-2, bibA, PI-1, PI-2a, PI-2b, dltA-D, ponA, CylE y cfb that have been implicated in immune evasion systems such as cell adhesion, pore formation, resistance to AMPs, among others. Similarly, an identification of the antibiotic resistance genes mreA, AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia, IsaE, APH(3')-IIIa, mprF, tetM, Tet (W/N/W), mefA, tet(45), qacJ, SAT-4 y ErmB was carried out. Isolates with identified CPS locus correspond to serotypes Ia, Ib, II, III, IV and V, with serotype II being predominant with a prevalence of 27.45%. The soda, cspA, lmb, dltA-D, ponA, CylE and cfb loci were found in all the isolates, while the ScpB locus was identified in 98.04% of the isolates. The total frequency order found for the rest of the factors was; FbsA 90.19%; PI-1 76.47%; bca 72.54%; srr-1 70.58%; PI-2a 68.62%; FbsB 54.90%; HvgA 39.21%; srr-2 37.25%; bibA and PI-2b with 35.29%. Regarding antibiotic resistance, all the isolates were positive for the presence of the mreA gene, while the mprF gene was identified in 98.04% of the isolates. The tetM and AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia factors were identified in 60.78% and 15.68% of the isolates, respectively. Finally, the factors Tet (W/N/M), mefA and tet (45) were identified in only 3.92%, and only one isolate presented the factors APH(3')-IIIa, IsaE, qacJ, SAT -4 and ErmB.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Streptococcus agalactiae* o Estreptococo del Grupo B (EGB), es una bacteria grampositiva  $\beta$ -hemolítica que coloniza asintóticamente el tracto gastrointestinal y genitourinario inferior de aproximadamente el 10-30% de los adultos humanos (Saad et al., 2018). Es la principal causa de infecciones bacterianas invasivas en recién nacidos (sepsis neonatal y meningitis), siendo reconocido recientemente como patógeno en poblaciones adultas, incluyendo mujeres embarazadas, ancianos y adultos con enfermedades subyacentes como diabetes y cáncer (M. M. Farley, 2001; Kothari et al., 2009). En mujeres embarazadas, coloniza directamente el tracto genital, aspecto muy importante por la posibilidad latente de transmisión directa al recién nacido durante el parto (De Cueto et al., 1998). Debido al impacto que esto presenta en mujeres embarazadas e infantes neonatos, EGB ha sido objeto de estudio durante un largo tiempo, con una gran cantidad de trabajos publicados relacionados a epidemiología y prevalencia de EGB, sin embargo, existe muy poca información acerca de sus características moleculares. Uno de los factores mayormente relacionados a la virulencia es el polisacárido capsular (CPS), relacionado directamente con la progresión de la enfermedad, que se utiliza para clasificarlo en 10 serotipos diferentes (Ia, Ib, II-IX), todos encontrados colonizando a pacientes (Slotved et al., 2007) con una distribución hospedero y geográficamente específica. Los serotipos Ia, III y V han sido reportados como los más prevalentes en EUA y Europa (Ekelund et al., 2003), los serotipos III y IV y serotipo VI, los más comunes en países como Brasil y Malasia, respectivamente (Eskandarian et al., 2015), mientras que en México el serotipo predominante es el I (G. Palacios et al., 2017). De igual manera existen otros factores de virulencia relacionados a resistencia, invasión y evasión de la respuesta inmune que deben ser estudiados con mayor profundidad para así, lograr desarrollar estrategias de prevención de contagio en neonatos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Agente Causal

*Streptococcus agalactiae* o Estreptococo del grupo B de Lancefield (EGB), es una bacteria coco Gram positivo, que se encuentra típicamente dispuesta en cadenas o pares, anaerobio facultativo, catalasa y oxidasa negativo, con presencia del grupo B de antígenos del sistema de Lancefield (Hardie & Whiley, 1995). Este microorganismo se ha asociado con septicemia y meningitis infecciosas en el ser humano y es particularmente importante debido a la infección que causa en neonatos, principalmente por transmisión directa desde el tracto genital de la madre (transmisión vertical madre-hijo) a pesar de formar parte de la flora del tracto genitourinario, digestivo y tracto respiratorio alto (Ross & PW, 1978). *S. agalactiae* es el principal causante de septicemia, meningitis y neumonía en neonatos, responsable de 2 a 3 casos por cada 1000 nacimientos, siendo también, causa seria de mortalidad o morbilidad en adultos, particularmente en personas con enfermedades subyacentes y/o de edad avanzada (M. M. Farley, 2001).

### 2.2. Factores de riesgo

Algunos de los factores más importantes que aumentan de manera sustancial el riesgo a desarrollar la enfermedad son: La rotura de membranas antes del inicio del trabajo de parto y el aumento del intervalo entre la rotura de la membrana y el parto. Existen otros factores importantes como el parto prematuro, bajo peso al nacer, colonización vagino-rectal densa y fiebre intraparto que son importantes factores de riesgo a considerar (Edwards & Baker., 2001). Uno de los primeros reportes de factores de riesgo asociados a la infección por *S. agalactiae* determinó que niveles bajos de anticuerpos maternos contra el polisacárido capsular puede aumentar la susceptibilidad del lactante a la infección (Baker & Kasper, 1976).

### 2.3. Colonización e infección en infantes neonatos por *S. agalactiae*

La colonización materna por *S. agalactiae* es el factor principal de riesgo que propicia el desarrollo de la enfermedad invasiva neonatal, ya que la transmisión vertical *de S. agalactiae* antes o durante el parto se encuentra en la mayor parte de los casos (Hickman et al., 1999). Las tasas de colonización por EGB determinadas por varios estudios, oscilan entre 5 y 35% en neonatos, sin embargo, se observa una variación bastante amplia, debido a que depende de la población en estudio, las técnicas de cultivos, así como, los medios

utilizados (De Cueto et al., 1998). Las cifras de colonización varían de igual manera, según la región geográfica y factores socioeconómicos de la población de estudio. De hecho, en algunos países desarrollados, la cifra se oscila entre 5% y 35% y, por otro lado, para naciones en desarrollo, se encuentra entre 4% y 20%. Hablando específicamente de Latinoamérica; en Venezuela, Brasil, México y Argentina, se han descrito prevalencias de 32.7%, 18.4%, 10.3% y 10% respectivamente. En otros países en desarrollo se han observado valores menores, por ejemplo, Libia e India, con un 5% y 5.8%, respectivamente. En tanto que, regiones como Gabón (19%), Benín (19.92%) y Egipto (26.5%) han tenido prevalencias más altas (Belard et al., 2015; T. Edmond et al., 2017; Mohamed et al., 2018). Aunque se estima que entre 20 y 30% de mujeres embarazadas se encuentran colonizadas, aproximadamente el 50% de bebés nacidos de estas mujeres será colonizado, pero, solamente el 1% de ellos desarrollan la enfermedad invasiva. Debido a la inmadurez del sistema inmune, el recién nacido es susceptible a este tipo de infecciones, que en algunos casos puede generar cuadros clínicos graves. Unas de las principales razones por las cuales puede ocurrir la infección, es el nacimiento prematuro, la ruptura prematura de membrana y/o el bajo peso en recién nacidos (G. Palacios et al., 2017).

### **2.3.1. Patogénesis**

Se observan tres cuadros clínicos distintos de la enfermedad invasiva por EGB. Enfermedad de inicio temprano con una presentación típica de sepsis y neumonía desde el día 0 al 7, enfermedad de inicio tardío que se presenta con mayor frecuencia con meningitis desde el día 7 hasta los 3 meses de edad y la enfermedad de inicio tardío-tardío que se presenta solamente pasados los 90 días de vida. A pesar de la terapia antibiótica adecuada, la enfermedad invasiva a menudo resulta en una alta mortalidad incluso en los últimos años (Schrag et al., 2002).

La enfermedad de inicio temprano (EOD), tipo más común de infección, ocurre durante la primer semana de vida, donde el neonato se infecta por exposición a *S. agalactiae* antes o durante el nacimiento. Sin embargo, la mayoría de estas infecciones probablemente son causadas por la propagación ascendente del organismo desde el tracto genital materno a través de la rotura de membranas hacia el líquido amniótico en donde las bacterias se multiplican, lo que les permite colonizar el tracto respiratorio del feto (Lindahl et al., 2005). Después de la entrada de bacterias en el tracto respiratorio, se puede desarrollar

neumonía y las bacterias pueden causar septicemia al extenderse hacia al torrente sanguíneo. Esta diseminación permite que las bacterias lleguen a múltiples sitios del cuerpo, donde la penetración subsecuente del tejido puede resultar en manifestaciones como meningitis y osteomielitis (Nizet & Rubens, 2000). Por tanto, *S. agalactiae* probablemente tiene que adherirse, invadir y transitar varias barreras de células epiteliales/endoteliales para causar la enfermedad.

La enfermedad de inicio tardío, se presenta en una cantidad mucho menor que la de inicio temprano, sin embargo, ha sido de interés creciente en la última década, debido a que su incidencia no ha disminuido con las medidas profilácticas que han provocado una disminución en la aparición de la enfermedad de inicio temprana. Interesantemente, en algunas casos, se presenta como infecciones nosocomiales afectando principalmente a recién nacidos prematuros, quienes probablemente adquieren la bacteria por transferencia horizontal del personal de enfermería (Lindahl et al., 2005). Las tasas de mortalidad de la enfermedad de aparición tardía son generalmente más bajas que las de las infecciones de aparición temprana, oscilando entre el 2 y el 6% (Schrag et al., 2000).

La enfermedad de inicio tardío-tardío es muy poco frecuente, pues solo se presenta en infantes que presentan estancia hospitalaria larga, inmunodeficiencias, o fueron prematuros con menos de 32 semanas de gestación. Presenta aspectos clínicos similares a la enfermedad de inicio tardío, como, meningitis, con una letalidad menor al 5% (Williams & Wilkins, 1990).

### **2.3.2 Consecuencias post-infección**

Un gran porcentaje de recién nacidos que sobreviven a la infección por *S. agalactiae* sufren secuelas graves que afectan directamente a su óptimo desarrollo. Después de los casos de meningitis neonatal, hasta un 50% de los supervivientes, presentan secuelas neurológicas, dentro de las que se encuentran, retraso mental, ceguera, sordera, convulsiones incontroladas, hidrocefalia, pérdida de audición y retraso del habla y el lenguaje (Lindahl et al., 2005). Este hecho, refleja la gravedad del panorama real de la situación y ratifica la importancia del estudio relacionado a mecanismos de infección de este organismo patógeno.

### **2.4. Políticas de detección y prevención**

En la década de 1960, EGB fue reconocido como el agente etiológico de la enfermedad

invasiva en infantes recién nacidos. A principios de la década de 1990, la incidencia por enfermedad invasiva temprana era de 1.7 casos por cada 1000 nacidos vivos y entre 2003 y 2008 descendió a 0.3 casos de cada 1000 gracias a las políticas establecidas de detección y profilaxis antibiótica (Eberly & Rajnik, 2015). De igual manera, en España se presentó un decremento importante en las tasas de infección; entre 1979 y 1996 se presentaba en 1.3 casos de cada 1000 nacidos vivos, descendiendo, en el año 2010, a 0.36 casos por cada 1000 (Alos et al., 2013). Debido a la falta de una vacuna eficaz contra *S. agalactiae*, la CDC recomienda dos estrategias de prevención durante la primera semana de vida del neonato. La primera, es hacer pruebas de detección de la bacteria en la madre y la segunda, administrar antibióticos por vía intravenosa, durante el parto, a mujeres con mayor riesgo. Se ha demostrado que en el caso de dos mujeres portadoras de *S. agalactiae* al momento del parto, la mujer que no recibe tratamiento con antibiótico tiene 20 veces más probabilidades de transmitir el patógeno al recién nacido (Di Renzo et al., 2015). Desafortunadamente, no se ha identificado una forma efectiva de prevención en personas mayores a una semana de edad.

## **2.5. Mortalidad**

En los años de 1970, en Estados Unidos, las tasas de mortalidad alcanzaban el 50%, sin embargo, actualmente se encuentran entre el 3 y 4% (Phares et al., 2008). En un meta-análisis realizado en el año 2012 a partir de 74 estudios, se obtuvo información de cinco países subdesarrollados, donde se encontró una tasa de mortalidad del 12.1% por enfermedad invasiva temprana, hecho contrastante en comparación con estadísticas de países desarrollados (K. M. Edmond et al., 2012).

## **2.6. Serotipos**

Actualmente, se han descrito 10 serotipos de EGB: Ia, Ib, y del II al IX, basados en los antígenos del polisacárido capsular específico (CPS) distribuidos en la mayoría de los países (Graux et al., 2020). La recopilación de 901 aislados a nivel global de infantes con enfermedad invasiva, muestra que el 98% de los casos corresponden a seis serotipos dominantes, Ia, Ib, II, III, IV y V, donde, aproximadamente el 75% de estos, pertenecen predominantemente a los serotipos III, Ia y V, respectivamente (Buurman et al., 2019). Un año después, un estudio publicado en Estados Unidos por Watkins y colaboradores con respecto a casos nacionales, muestra un incremento en el número de casos del serotipo

IV, aumentando de un 4.7% en 2008 a un 11.3% en 2016, agente causal principalmente en infección por EGB en adultos con alguna condición subyacente (Watkins et al., 2020). El método de identificación serotípica más utilizado consiste en el uso de pruebas de inmunodifusión y métodos de aglutinación comerciales, sin embargo, estos métodos pueden fallar en la asignación del serotipo correcto en un 10-25% de los casos debido a una baja expresión capsular, mutaciones en el operón capsular o por la precisión limitada que presenta el método (Kong et al., 2008). Por ello, el uso de técnicas moleculares para identificación, ha mostrado un incremento considerable en los últimos años.

### **2.7. Distribución en México**

Un estudio realizado en la década de 1980 por el Instituto Nacional de Perinatología reportó una predominancia del serotipo I (33%) con respecto al serotipo III (3%), con un alto número de aislados tipificables (18.2%) de un total de 35 mujeres embarazadas colonizadas por *Streptococcus agalactiae* (Solorzano et al., 1989). A partir del año 2000, diversos estudios han confirmado al serotipo I (48.6-61.3%) como principal en el occidente y centro de México, con un incremento constante del serotipo III (5.9-32.9) y un menor registro de serotipos no tipificables (Figuroa et al., 2007; G. C. Palacios et al., 2005; Villaseñor-Sierra et al., 2004). Si bien, la información disponible es limitada, los estudios realizados confirman que, en México, el serotipo predominante es el tipo I, con un incremento considerable del serotipo III en la colonización de la mujer mexicana y en la infección del recién nacido en México (G. Palacios et al., 1997).

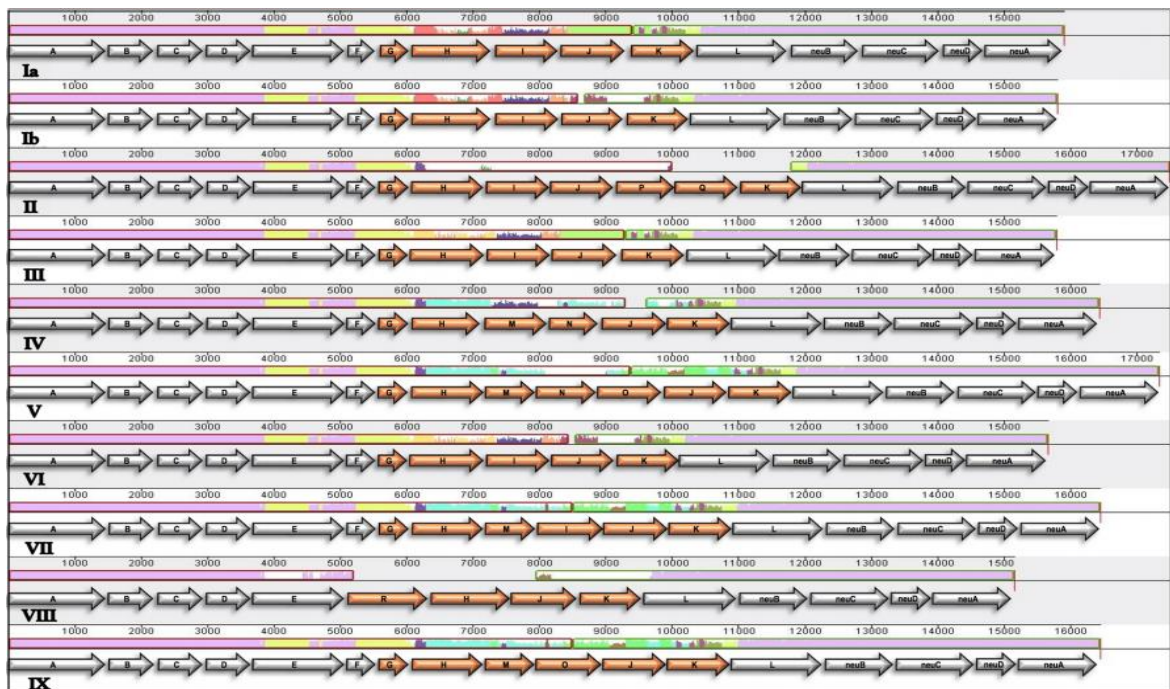
### **2.8. Factores de virulencia**

EGB cuenta con una variedad de factores de virulencia que le proporcionan ventajas infectivas y facilitan el inicio de la enfermedad. Algunos de estos factores han sido identificados y caracterizados, incluyendo el Polisacárido Capsular (CPS), factor que permite clasificar a los diferentes serotipos en 10 grupos (Ia, Ib, y del II al IX) distribuidos dependiendo de la ubicación geográfica, proteínas reguladoras, proteínas localizadas en superficie y toxinas (Herbert et al., 2004). Una de las principales características de *Streptococcus agalactiae*, es que, la gran mayoría de las proteínas codificadas por genes asociados a la virulencia, son necesarias para la interacción bacteria-huésped-célula en el proceso de infección (Laczeski et al., 2014).



### 2.8.1. Polisacárido Capsular

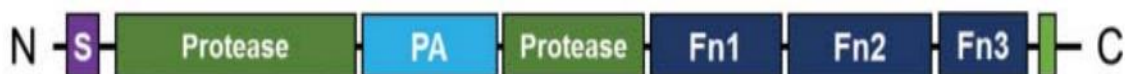
El Polisacárido Capsular (CPS) es reconocido como factor de virulencia clave que le facilita al microorganismo evadir los mecanismos de defensa del huésped y ha sido utilizado para subdividir a la especie en 10 serotipos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX), con 5 serotipos predominantes (Ia, Ib, II, III y IV) que se distribuyen de manera similar en África, Europa, América y regiones este del mediterráneo (Beigverdi et al., 2014). CPS, es de igual manera un blanco importante para el desarrollo de vacunas conjugadas que incluyen algunos o todos los serotipos, mostrando un panorama prometedor para combatir esta importante enfermedad (Doare & Heath, 2013). El CPS, es codificado por el locus CPS, conformado por 16-18 genes dependiendo del serotipo (Cieslewicz et al., 2005). Con ayuda de herramientas bioinformáticas de alineamientos de secuencias, se observó que los genes *cpsA* a *cpsF*, ubicados en uno de los extremos, y los genes *cpsL*, *neuB*, *neuC*, *neuD* y *neuA*, ubicados en el otro extremo, se encuentran altamente conservados en los diez serotipos, mientras que, los genes que se encuentran en la región central, del *cpsG* al *cpsK* para los serotipos Ia-VII y IX, y del *cpsR* al *cpsK* en el serotipo VIII, varían entre los serotipos como se muestra en la figura 1 (Kapatai et al., 2017).



**Figura 1.** Comparación de los loci de CPS de los 10 serotipos (Ia, Ib, II-IX). Los genes dentro de la región variable se destacan de en coloración naranja (Kapatai et al., 2017).

### 2.8.2. C5a peptidasa (ScpB)

La C5a peptidasa (ScpB) es una serín proteasa codificada por el gen *scpB* que facilita la evasión inmune mediante la adherencia e inactivación del componente del complemento humano C5a. El anclaje de ScpB a C5a impide el reclutamiento de neutrófilos en el sitio de la infección (Takahashi et al., 1995). ScpB puede también promover la unión de EGB a la matriz extracelular (ECM) de las fibronectinas y a las células epiteliales humanas (Q. Cheng, Stafslie, et al., 2002). La importancia de ScpB en la prevención de la infección por *Streptococcus agalactiae* se ha observado claramente mediante el uso de vacunas conjugadas de ScpB o ScpB-CPS, donde se observó que la administración, disminuye los niveles de EGB en pulmones de ratón, brindando protección al animal contra este agente infeccioso (Q. Cheng, Debol, et al., 2002). La regulación de ScpB, se da por dos TCS independientes en EGB. En primera instancia, durante la fase exponencial de crecimiento, se observó una creciente en la transcripción de *scpB*, en una mutante de *rgfC* (Spellerberg et al., 2002). RgfC es un sensor HK y RgfA es un Regulador de Respuesta de unión al ADN. A la fecha, no se sabe con exactitud si RgfA se une directamente al promotor de *scpB* para reprimir la transcripción. Si bien, estas observaciones sugieren una represión de ScpB por RgfC/A y posiblemente RgfB durante la fase de crecimiento, son necesarias más investigaciones para completar el panorama de la regulación de ScpB (Rajagopal, 2010). La segunda vía de regulación de la expresión de ScpB, se da por CoV/S. Mediante el uso de un *covR* mutante, se observó que en los serotipos Ia y V, mostró un incremento en los niveles de transcripción, lo que sugiere que CovR es un represor de ScpB (S. M. Jiang et al., 2005), sin embargo, no se ha demostrado regulación de ScpB en algunas cepas como EGB A909, lo que sugiere que la regulación de ScpB por CovR/S es cepa-específica. C5a peptidasa contiene un dominio de proteasa similar a subtilisin N-terminal, dos motivos RGD dirigidos a la integrina y tres dominios de fibronectina C-terminal tipo III (Fn), como se observa en la figura 2.



**Figura 2.** C5a peptidasa. Dominio de actividad de la proteasa (Protease), dominio asociado a la proteasa (PA) y dominios de tipo III de fibronectina; Fn1, Fn2, Fn3 (Song et al., 2018).

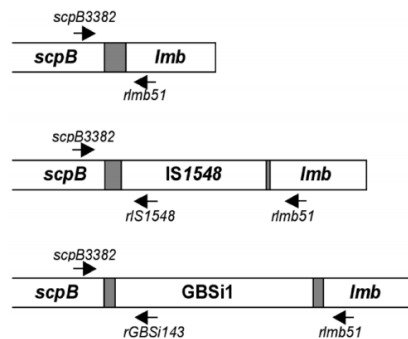
### **2.8.3. CspA**

EGB puede escindir o dividir a los componentes de la Matriz Extracelular (ME) para facilitar la evasión de la respuesta inmune presentada por el huésped. Una serín proteasa asociada a la superficie celular, conocida como CspA, tiene la capacidad de escindir o dividir al fibrinógeno presente en la ME. Esta división del fibrinógeno frustra el sistema inmunológico del huésped, ya que evita el reconocimiento y la captación fagocítica de EGB. Consecuentemente, aquellas cepas de EGB deficientes en la expresión de CspA, incrementan la susceptibilidad a neutrófilos y decrecen la virulencia en modelos de infección de sepsis neonatal (Harris et al., 2003). Estudios recientes demostraron que CpsA también escindía fácilmente quimiocinas como el oncogén  $\gamma$  relacionado con el crecimiento, el péptido 2 activador de neutrófilos y la proteína 2 quimiotáctica de granulocitos, aboliendo su capacidad para atraer y activar neutrófilos (Bryan & Shelver, 2009). A pesar de la importancia de este factor en la virulencia de EGB, son necesarias más investigaciones futuras para tener una imagen más clara sobre la regulación de la expresión de CspA. Las dos serín proteasas de EGB (ScpB y CspA) tiene un motivo LPXTG de anclaje a la pared celular. Estos motivos son esenciales para que la principal enzima sortasa, SrtA, se dirija a la pared celular de estas proteínas (Nobbs et al., 2008). Por tanto, se anticipó que en ausencia de SrtA, la mala localización de las proteínas ancladas a la pared celular conduciría a una disminución espectacular de la virulencia del GBS. Aunque los mutantes de *srtA* de EGB mostraron una localización de ScpB alterada, menos pili y una menor adherencia a las proteínas ECM y las células huésped, no se atenuaron para la infección sistémica (Lalioui et al., 2005). Dado que los mutantes *srtA* demostraron una menor colonización en modelos animales, estos resultados enfatizan la importancia de las proteínas de la superficie celular en la colonización del GBS. Sin embargo, los mecanismos relacionados a la expresión de *srtA* y *cspA* todavía no están completamente aclarados.

### **2.8.4. LMB**

Lmb, es una lipoproteína de 34 kDa expuesta en la superficie de *S. agalactiae*, que media su adherencia a la laminina de la célula huésped, siendo un evento importante en la patogénesis. La laminina se ha identificado recientemente como un factor huésped crucial para la invasión bacteriana (Wijk et al., 2017). De hecho, los estudios estructurales y la

caracterización funcional muestran que Lmb juega un papel doble: en la unión del zinc y en la adhesión a las moléculas de la matriz extracelular (Ragunathan et al., 2013). Mediante estudios con Lmb mutada, se ha demostrado que cuando Lmb no se encuentra presente en EGB, se observa una disminución en la adherencia a las células endoteliales microvasculares del cerebro y a la laminina humana. Los genes que codifican las proteínas de superficie ScpB y Lmb se encuentran en un transposón compuesto (Franken et al., 2001). Donde se han descrito tres estructuras diferentes de la región intergénica *scpB*-*lmb* (Fig. 3), ya que esta región parece ser un punto caliente para la integración que puede contener los dos tipos de Elementos Genéticos Móviles (MGE), GBSi1 o IS1548 (Spellerberg et al., 2010). Siendo que, GBSi1 e IS1548 se encuentran 97 bp cadena arriba y 9 bp cadena arriba del promotor putativo del gen *lmb*, respectivamente (Granlund et al., 2001).

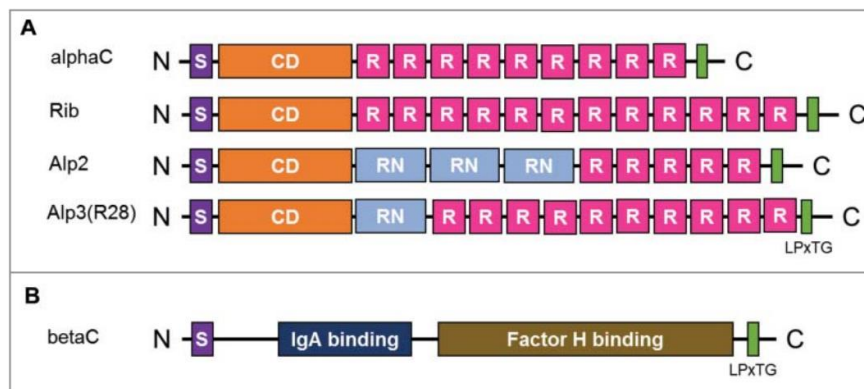


**Figura 3.** Organización genómica de la región intergénica *scpB*-*lmb* (Spellerberg et al., 2010).

### 2.8.5. Proteína C

Se ha informado que la proteína alfa C (ACP) en la superficie del GBS interactúa de manera directa con las células epiteliales. ACP es el prototipo de una familia de proteínas de superficie Gram positivas, las proteínas de tipo alfa (Alps), entre las que se encuentran  $\alpha$ -C,  $\beta$ -C, Alp1, Alp2, Alp3 (R28), Alp4 y Rib, han sido identificados hasta la fecha, siendo expresadas por muchas cepas de EGB de los serotipos Ia, Ib y II. Las Alps comparten una homología de secuencia considerable y elementos estructurales comunes, incluida una región N-terminal, una serie de repeticiones en tándem de 70-80 aminoácidos cada una y una región C-terminal que contiene un motivo LPXTG de anclaje a la pared celular (fig. 4) común a varias especies Gram-positivas (Baron et al., 2004; Song et al., 2018). Importante a destacar que estas proteínas pueden variar en tamaño debido al truncamiento de genes dentro de la región de repetición (Madoff et al., 1996). Las

proteínas  $\alpha$ -C y  $\beta$ -C, han sido ampliamente estudiadas en comparación con los otros miembros de la familia Alp. La importancia de la proteína  $\alpha$ -C en la patogénesis de la enfermedad se observó claramente en un modelo de enfermedad de ratón neonatal, donde la delección del gen *bca*, que codifica ACP, atenúa la virulencia del GBS, con diferencias de supervivencia significativas durante las primeras 24 h de la infección (Jing et al., 1997). In vitro, el mutante deficiente en ACP entra en las células epiteliales cervicales humanas ME180 y transita a través de las capas de estas células con menos eficacia que la cepa parental de tipo salvaje (Bolduc et al., 2002). En la proteína  $\beta$ -C el motivo de secuencia MLKKIE se une a la región Fc de la IgA humana y al factor humano H (FH) para proteger el EGB de la opsonofagocitosis (Jarva et al., 2004). No se han estudiado las posibles propiedades invasivas de otras proteínas Alp y el desarrollo de una vacuna universal usando proteínas Alp, ha sido limitado debido a la heterogeneidad de la secuencia De Alp. Sin embargo, MinervaX Inc. informó recientemente que la proteína de fusión de los dominios N-terminal altamente inmunogénicos de  $\alpha$ -C y Rib (EGB-NN) condujo a un aumento de más de 30 veces el anticuerpo específico de EGB-NN en su ensayo clínico de fase I con 240 mujeres adultas sanas (Lin et al., 2018).

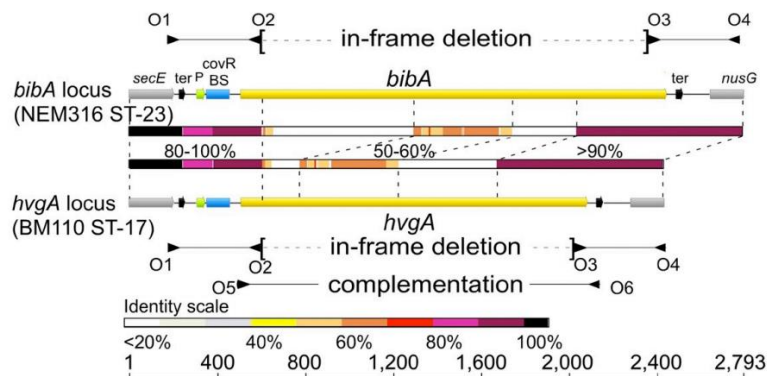


**Figura 4.** Representación esquemática de las proteínas de superficie estreptocócica del grupo B. (A) Familia de proteínas Alp. Péptido de señal (S), dominio conservado (CD), dominio repetido (R), dominio de anclaje de pared de celda LPxTG (verde). (B) Proteína  $\beta$ -C, que contiene dominio de unión IgA (azul) y dominio de unión al factor H (marrón) (Song et al., 2018).

### 2.8.6. Adhesina Hipervirulenta (HvgA)

La proteína adhesina hipervirulenta (HvgA) es una proteína que facilita la adhesión más eficiente a las células endoteliales microvasculares y células epiteliales intestinales que constituyen la barrera hematoencefálica (BBB).

El locus *hvgA*, presenta regiones reguladoras y codificantes conservadas en los extremos N y C terminal, que presenta una homología mayor al 90% con el locus *BibA*, que también codifica componentes de superficie específicos del clon ST-17, mientras que sus regiones internas muestran un nivel significativamente más bajo, entre 50-60%, como se observa en la figura 5. Debido al reciente descubrimiento de su importante participación en la hipervirulencia de EGB, el factor HvgA se presenta como un objetivo prometedor para desarrollar nuevas estrategias de diagnóstico (Tazi et al., 2010).



**Figura 5.** Estructura del locus *bibA/hvgA* (Tazi et al., 2010).

### 2.8.7. Pili

Recientes estudios demostraron que EGB codifica un pequeño organelo de superficie conocido como Pili. Este organelo, media la resistencia de EGB a AMPs (Péptidos Antimicrobianos catiónicos) y facilita la adherencia y unión del patógeno a las células huésped (Pezzicoli et al., 2008). Existen dos loci responsable de esta estructuras tipo Pili en EGB, conocidos como islas Pili 1 y 2 (PI-1 y PI-2, respectivamente) con dos variantes de la isla Pili 2, conocidas como PI-2a y PI-2b (Rosini et al., 2006a). De acuerdo a numerosas investigaciones, se ha encontrado que, en todas las cepas de EGB secuenciadas, al menos uno de estos loci es codificado (Dramsí et al., 2006). Estudios posteriores, observaron que la isla presente más común en EGB es PI-2a, seguido de PI-1 con una proporción similar ligeramente inferior y, por último, el menos común fue PI-2b. Es importante destacar que una misma cepa puede presentar una o dos islas, dependiendo del estadio de la enfermedad; PI-1 y PI-2a se presentaron en mayor proporción en casos de EOD, mientras que PI-1 y PI-2b en LOD (E. R. Martins et al., 2013). El principal componente estructural de pili de EGB es el homólogo de PilB. Se ha observado que las cepas sin PilB muestran un decremento en la virulencia e incremento en la susceptibilidad

a fagocitos y AMPs. Sin embargo, el mecanismo por el cual el pili impide la resistencia de EGB a AMPs, es aún desconocido (Maisey et al., 2008).

### **2.8.8. Proteínas de unión a Fibrinógeno**

La adherencia de EGB a las superficies de las células del huésped es importante para la colonización de la mucosa y la subsecuente invasión. Esta invasión, requiere de interacciones de EGB con las proteínas fibronectina, fibrinógeno y laminina, localizadas en la matriz extracelular, que facilita las subsecuentes interacciones con las integrinas que se encuentran en la superficie celular y la entrada a la célula. Algunos de los factores que permiten a EGB unirse a las proteínas localizadas en la matriz extracelular e invadir a las células, se describen a continuación. La unión de EGB a Fibrinógeno (que se encuentra en la Matriz Extracelular) es mediada por dos proteínas de unión a fibrinógeno conocidas como FbsA y FsbB. Ambas proteínas han sido purificadas y mostraron una unión al fibrinógeno, tanto de manera soluble como inmovilizado (Jacobsson, 2003) y estudios posteriores con FbsA y FbsB mutadas, sugieren que FbsA media la adherencia a la célula, mientras que FbsB promueve la entrada de EGB a la célula huésped.

#### **2.8.8.1. Proteína de unión a fibrinógeno A (FbsA)**

FbsA es una proteína asociada a superficie codificada solo por algunas cepas de EGB, como la cepa A909 del serotipo Ia y la cepa NEM316 del serotipo III que es regulada por al menos tres diferentes STS en el serotipo III, RogB, RovS y CovR/S. RogB, es un regulador transcripcional que regula de manera positiva a *fbSA* de manera dependiente de la fase de crecimiento (Gutekunst et al., 2003). Curiosamente, las propiedades de virulencia de un RogB mutante no han sido examinadas en varios modelos animales, por lo cual, es necesario realizar más estudios para determinar el rol de RogB en la infección por EGB. RovS ha se une directamente al promotor de *fbSA* regulándolo de manera negativa. Consistentemente, *rovS* mutantes muestra un incremento moderado en la unión al fibrinógeno y en la adherencia a células epiteliales de pulmón (U. M. Samen et al., 2006). FbsA es también regulado de manera negativa por el sistema CovR/S, sin embargo, no se conoce completamente si CovR se une directamente a *fbSA* para regular la expresión. Estudios posteriores, muestran una presencia del gen FbsA cercana al 32% de un total de 111 muestras, comprobando así, que la presencia de este factor de virulencia, es dependiente del serotipo y cepa (Rosenau et al., 2007).

### **2.8.8.2. Proteína de unión a fibrinógeno B (FbsB)**

FbsB es una proteína codificada por el gen *FbsB* que se ha encontrado en todas las cepas de EGB secuenciadas (Tettelin et al., 2005) y carece de un motivo de anclaje de la pared celular y de regiones de membrana, por lo que se sugiere que es una proteína secretada expuesta a la superficie. FbsB tiene un péptido señal N-terminal conservado y una región C-terminal de 223 residuos. La región N-terminal entre el péptido señal y la región C-terminal varía en tamaño de una cepa a otra y se une al Fg humano (Gutekunst et al., 2004). Estudios posteriores, encontraron que la región C-terminal conservada se unía a Fg bovino, pero no a Fg humano. Estos resultados plantearon algunas preguntas cruciales como por qué un dominio de proteína está altamente conservado tanto en cepas humanas como bovinas de *S. agalactiae* y, en segundo lugar, por qué esa región conservada de una proteína (FbsB) de una cepa humana se une solo a Fg bovino (Devi & Ponnuraj, 2010).

### **2.8.9. Superóxido dismutasa**

Una de las principales vías de evasión inmune por parte del patógeno, es la resistencia a Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) codificadas por el huésped. Para ello, EGB codifica la superóxido dismutasa asociada al cofactor  $Mn^{2+}$ , SodA, que le permite convertir las moléculas de oxígeno monoatómico o aniones superóxido ( $O_2^-$ ) a moléculas de Oxígeno diatómico ( $O_2$ ) y  $H_2O_2$ , que son, subsecuentemente metabolizados por catalasas o peroxidasas. Mediante el uso de un *sodA* mutante, EGB demostró ser significativamente más sensible a macrófagos y tener una supervivencia disminuida en sangre y cerebro en ratón (Doran et al., 2002), comparado con cepas sin *sodA* mutada. Sin embargo, la supervivencia de *sodA* mutada en hígado o bazo, no se mostró afectada de manera significativa, lo que sugiere que SodA confiere beneficios de supervivencia en nichos del huésped específico. La regulación de la transcripción de *sodA* en EGB, se da por RovS. Se sabe que este regulador transcripcional se une directamente a la región del promotor de *sodA*, donde lo regula de manera positiva (U. M. Samen et al., 2006), sin embargo, la regulación por RovS de *sodA* durante la infección de EGB no se ha entendido por completo y requiere de más estudios.

### **2.8.10. Proteínas de repetición ricas en serina (Srr)**

Las glicoproteínas de repetición rica en serina (SRR) son una familia grande y diversa de adhesinas presentes en la mayoría de las bacterias grampositivas. EGB expresa una de las



dos proteínas SRR alélicas, Srr1 y Srr2, con una organización de dominio altamente conservada que incluye una secuencia de señal de secreción, dos dominios SRR que están glucosilados, un dominio de unión de fibrinógeno especializado entre dos dominios SRR y un motivo de anclaje de pared celular LPXTG (Fig. 3). Tanto Srr1 como Srr2 identificados en EGB se pueden unir a la cadena de fibrinógeno A, a través del mecanismo de "dock, lock y latch", y estas interacciones contribuyen a la patogénesis de la meningitis por EGB y la colonización del EGB de la superficie vaginal (Wang et al., 2014). Investigaciones posteriores demostraron que un dominio antigénico con 13 aminoácidos en el dominio "latch" de Srr1 y Srr2 es crucial para la patogénesis de las enfermedades del SGB, y se demostró que la vacunación con péptidos "latch" proporciona protección independiente del serotipo contra la infección por EGB en ratones (S. Lin et al., 2018).



**Figura 6.** Familia de proteínas repetidas ricas en serina. Dominio N1, N2, y N3 y dominio de glicosilación de repetición rico en serina SRR1 y SRR2 (Song et al., 2018).

### 2.8.11. Toxinas formadoras de poros

Las toxinas formadoras de poros, son un componente crítico para la patogénesis en muchas enfermedades causadas por bacterias. Estas toxinas promueven la entrada del patógeno en las células del huésped facilitando la supervivencia intracelular y la diseminación sistémica. EGB codifica para al menos dos toxinas formadoras de poros, conocidas como:  $\beta$ -hemolisina/citolisina ( $\beta$ -H/C) y el Factor CAMP (Del inglés, Christie Atkins Munch Peterson).

#### 2.8.11.1. $\beta$ -hemolisina/citolisina ( $\beta$ -H/C)

$\beta$ -H/C, también conocida como CylE, es una toxina pluripotente asociada a superficie que promueve la invasión de EGB a través de barreras celulares de células epiteliales y endoteliales de pulmón, así como Barreras Sangre-Cerebro (BBB, Blood-Brain Barrier). Además,  $\beta$ -H/C promueve un mal funcionamiento en la función cardíaca, fallas renales e induce respuestas inflamatorias en el huésped que contribuyen a secuelas neurológicas (Doran et al., 2002, 2003; Ring et al., 2002). El gen estructural que codifica para  $\beta$ -H/C ha sido identificado como *csIE* (Pritzlaff et al., 2001). De acuerdo a estudios recientes,

otros genes del operón *cyl*, como *cylA*, *cylB*, *cylJ* y *cylK* se han asociado con modificaciones post-traduccionales y secreción de  $\beta$ -H/C (Forquin et al., 2007). Existe amplia evidencia de que EGB regula la expresión de  $\beta$ -H/C usando Sistemas de Transducción de señales (STS), específicamente, el Sistema de Dos Componentes (TCS). Este TCS, que comprende el Regulador de Respuesta (RR) de unión al ADN, CovR y CovS, reprime la transcripción de los genes *cyl*, incluyendo *cylE* ( $\beta$ -H/C) y activa la expresión de otra toxina formadora de poros llamada CAMP (S. M. Jiang et al., 2005; Lamy et al., 2004). El descubrimiento de que el regulador transcripcional RovS puede, de igual manera, activar la expresión de *cylE* y otros genes del operón *cyl* (U. M. Samen et al., 2006), demuestra la complejidad de la regulación de  $\beta$ -H/C.

#### **2.8.11.2. Factor CAMP**

El factor CAMP es una proteína secretada con propiedades formadoras de poro que ha sido sugerida como un factor clave en la patogénesis de EGB (Lang & Palmer, 2003). La evidencia de que este Factor es importante en la virulencia, ha sido demostrada por estudios in vivo, donde el Factor CAMP parcialmente purificado fue letal para conejos, y la co-administración del factor CAMP con una dosis subletal de EGB puede inducir septicemia y muerte en ratones (Jurgens et al., 1987). Sorprendentemente, se ha observado que una deficiencia del factor CAMP no afecta de manera sistémica la virulencia de EGB (Hensler et al., 2008), lo que parece indicar que, este factor no es esencial para la patogénesis de EGB. Con base en estas observaciones, se ha pensado que es muy probable que el factor CAMP sea solo esencial para la patogénesis de EGB en nichos donde la actividad de  $\beta$ -H/C se vea disminuida, por ejemplo, en los pulmones de humano, donde Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) es un antagonista de  $\beta$ -H/C (G. Y. Liu et al., 2004).

#### **2.9. Genes de resistencia**

En muchos países, la detección de colonización por *Streptococcus agalactiae* en mujeres embarazadas que se encuentran entre las semanas 35 y 37 de gestación y la profilaxis antibiótica intraparto (PAI) para mujeres colonizadas han reducido sustancialmente la carga de EOD. En el caso de la profilaxis antibiótica intraparto, el antibiótico más recomendado es la penicilina. Antibióticos como clindamicina, vancomicina, y principalmente eritromicina, han sido utilizados en pacientes con alergias  $\beta$ -lactámicas que tienen algún riesgo de anafilaxis. No obstante, el uso de eritromicina y clindamicina,

ya no es recomendado a causa del incremento en el número de casos de EGB reportados resistentes a macrólidos. Las crecientes resistencias a los antibióticos macrólidos y lincosamidas en comparación con las de la misma población de hace 30 años, refleja la tendencia mundial de aumento de la resistencia a estos antibióticos.

### **2.9.1. Resistencia a macrólidos**

Recientemente se han informado en diversas zonas geográficas, aislados de EGB resistentes a gentamicina y vancomicina (Park et al., 2014; Sendi et al., 2016), mostrando un incremento considerable en comparación con las mismas poblaciones de hace algunos años. Un estudio realizado en Canadá, identificó resistencia a varios antimicrobianos de uso común en un número sustancial de cepas EGB colonizadoras. En este estudio se utilizaron 102 aislados de EGB, donde se observó sensibilidad a penicilina, ampicilina y vancomicina. Ninguna de las cepas mostró alto niveles de resistencia a gentamicina (HLGR). Por el otro lado, solo 11 cepas fueron sensibles a tetraciclina, eritromicina y clindamicina. Con la excepción del serotipo VI, se observó resistencia a tetraciclina en cada uno de los serotipos. Un total de 89% de los aislados, mostraron resistencia a tetraciclina. La resistencia a clindamicina y eritromicina fue observada en 25% y 36% de los aislados, respectivamente. Junto a estos aislados que fueron sensibles a clindamicina, nueve mostraron resistencia inducida a clindamicina, para un 33% de resistencia total a clindamicina. La tasa de resistencia a los macrólidos en los aislados de EGB colonizadores en el área metropolitana de Toronto se caracterizó en 1999, cuando el 8% y 18% de los aislados eran resistentes a la clindamicina y la eritromicina, respectivamente (McGavin et al., 2001). Quince años después, la resistencia a la clindamicina y a la eritromicina fue significativamente mayor al 25% y 36%, respectivamente. Por otro lado, no se observó una disminución de la susceptibilidad a la penicilina en ninguno de los aislados colonizadores metropolitanos de Toronto (Teatero et al., 2017).

La resistencia a macrólidos en EGB se encuentra codificada fundamentalmente por tres genes: *ermB*, *ermTR* y *mefA/E*. Los genes *ermB*, *ermTR*, confieren resistencia a macrólidos, estreptograminas B (MLS<sub>B</sub>) de manera inducible (MLS<sub>Bi</sub>) o constitutiva (MLS<sub>Bc</sub>) y lincosamidas mediante la codificación de una metilasa de ARNr 23S que altera la unión a la diana del antibiótico. Mientras que, los genes *mefA/E* confieren resistencia de bajo nivel a eritromicina y sensibilidad a lincosamidas (fenotipo M)

mediante la codificación de una bomba de expulsión. La transmisión de estos genes puede darse de manera vertical u horizontal debido a que, son transportados por plásmidos y/o transposones, por lo que, un estudio de la evolución de la resistencia de *S. agalactiae* a macrólidos es fundamental (Ardanuy et al., 2005).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Actualmente existen pocos trabajos de investigación publicados enfocados al estudio de los mecanismos moleculares que le proporcionan a *S. agalactiae* ventajas infecciosas frente al sistema inmune de infantes neonatos. Este trabajo permitirá aplicar los conocimientos generados sobre los mecanismos moleculares de infección a futuras estrategias de prevención o tratamiento contra nuevos blancos terapéuticos, que brinden una mayor esperanza de vida mejorando la salud de infantes neonatos y personas vulnerables a este patógeno.

#### **4. HIPÓTESIS**

La caracterización de borradores de genoma completo de *S. agalactiae*, permitirá identificar el genotipo del polisacárido capsular específico y se identificarán los genes que codifican factores de virulencia y de resistencia a diversos antibióticos presentes en cada uno de los aislados.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Caracterizar y comparar genes que codifican para el polisacárido capsular y factores de virulencia y de resistencia a antibióticos a partir de borradores de genoma completo de aislados vagino-rectales de *S. agalactiae* de mujeres embarazadas provenientes de una unidad médica de 3er nivel del noreste de México.

### 5.2. Objetivos específicos

5.2.1. Identificar y reactivar aislados de *S. agalactiae* de una colección de cepas provenientes de hisopados vagino-rectales de mujeres embarazadas.

5.2.2. Caracterizar molecularmente el locus CPS del polisacárido capsular de aislados vagino-rectales de *S. agalactiae* de mujeres embarazadas.

5.2.3. Caracterizar los genes codificantes para los factores de virulencia ScpB, sodA, cspA, lmb, FbsA, FbsB, bca, HvgA, srr-1, srr-2, bibA, PI-1, PI-2a, PI-2b, dltA-D, ponA, CylE y cfb de aislados vagino-rectales de *S. agalactiae* de mujeres embarazadas.

5.2.4. Identificar los genes de resistencia a antibióticos en aislados vagino-rectales de *S. agalactiae* de mujeres embarazadas.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Aislados de *S. agalactiae*.

Se incluyeron 51 aislados puros de *S. agalactiae* de una colección de cepas colectadas previamente a partir de hisopados vaginales y perianales de mujeres embarazadas en control prenatal de la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 23, Hospital de Ginecología y Obstetricia “Dr. Ignacio Morones Prieto”, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Todos los aislados de *S. agalactiae* fueron previamente identificados por métodos microbiológicos y bioquímicos estándares que incluyen tinción de Gram, prueba de CAMP, hidrólisis de Hipurato y prueba de catalasa, crecimiento en el medio cromogénico Strep B Carrot Broth (Hardy Diagnostics, Santa María, CA, EUA). El serotipo capsular de cada aislamiento determinado por aglutinación en látex del antígeno de grupo B mediante el StrepPRO™ Streptococcal Grouping Kit. (Hardy Diagnostics®, Santa Maria, CA, EUA). El protocolo contó con aprobación del comité nacional de investigación científica del IMSS (2014-785-069), así como, los consentimientos informados debidamente firmados.

### 6.2. Obtención del ADNg.

Para la extracción de ADN genómico (ADNg) de los aislados bacterianos se utilizó el QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemania). Primero, se realizó una inoculación de cada aislado en 3 mL de caldo Todd-Hewitt a 37° C con un periodo de incubación de 24 horas. Después, se tomó 1.5 ml del cultivo celular y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se decantó el sobrenadante y se pasó el pellet obtenido a una resuspensión de las células en 180 µL lisozima (50 mg/mL), a 37° C durante 1 hora. Ulteriormente, se añadieron 20 µL de proteinasa K, se mezcló durante 15 segundos en vórtex antes de pasar a incubación con una temperatura de 56° C por un periodo de 30 minutos, seguido de un periodo de reposo a 70° C durante 10 minutos para inactivación de la proteinasa K. Al terminar esta etapa, 4 µL de RNasa A fueron añadidos y durante 2 minutos, se incubaron a temperatura ambiente. Siguiendo el protocolo de purificación, se añadieron 200 µL de buffer AL, para incubarse a 70° C durante 15 minutos, añadiendo 200 µL de etanol grado molecular. Ulteriormente, el contenido total del tubo fue transferido a una columna QIAamp Mini spin que se encontraba dentro de un tubo de recolección de 2 ml; para desechar el eluyente, se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto



y se posicionó la columna en un tubo nuevo de recolección de 2 ml. Acto seguido, se añadieron 500  $\mu$ l de buffer AW1, y se centrifugaron a 8,000 rpm por 60 segundos, después, se desechó el tubo de recolección utilizado. La columna, fue traspasada a un tubo nuevo de recolección de 2 ml, y se le añadió 500  $\mu$ L del buffer AW2 para centrifugarse a 14,000 rpm durante 60 segundos y desechar el eluyente. Por último, se colocó la columna en un tubo de 1.5 ml nuevo para añadirse 60  $\mu$ l de agua inyectable y eluir el ADNg obtenido por centrifugación a 8,000 rpm. Este último paso, se repitió hasta obtener un volumen final de 120  $\mu$ l. Para determinar la concentración y pureza del ADNg de cada aislado, se utilizó el NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, DE, EUA), obtenidas por lecturas espectrofotométricas a 260 y 280 nm con razones A260/A280 y A260/A230. Para continuar, se realizó un corrimiento de electroforesis en gel de agarosa al 1% con solución amortiguadora TBE 1x para evaluar la integridad. Antes de generar las librerías para secuenciación, todas las muestras de ADNg fueron preparadas empleando el Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) en un volumen de 30  $\mu$ l con una concentración de 500 ng, posteriormente, fueron depositadas en una placa de 96 pocillos. Por último, se tomaron 2  $\mu$ l de cada muestra de ADNg, para mezclarse con 100  $\mu$ l del Quant-iT PicoGreen dsDNA reagent y 98  $\mu$ l de Buffer TE 1x en tubos para ensayo Qubit. La fluorescencia fue medida en el equipo Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific).

### **6.3. Preparación de las librerías para secuenciación de genoma completo.**

La preparación de las librerías de ADNg para secuenciación de genoma completo de los 51 aislados de *S. agalactiae*, se llevó a cabo mediante el uso del Nextera DNA Flex Library Prep Kit (Illumina Inc. San Diego, CA. E.U.A.). El protocolo establecido, indica una primera etapa de fragmentación del ADNg y un posterior etiquetado de cada uno de los fragmentos obtenidos adicionando 10  $\mu$ l de Bead-Linked Transposomes (BLT) y 10  $\mu$ L del Tagmentation Buffer 1 (TB1) a cada muestra, con un tiempo de incubación de 15 minutos en un termociclador a una temperatura de 55° C. Posteriormente, se realizó una limpieza post-etiquetado de cada una de las muestras, añadiendo 10  $\mu$ l de Tagmentat Stop Buffer (TSB) e incubando a 37° C durante 15 minutos. Al finalizar el ciclo, se colocó la placa sobre un soporte magnético y se mantuvo inmóvil hasta que la muestra se tornó completamente transparente (aproximadamente 3 minutos), descartando el sobrenadante

con ayuda de una micropipeta multicanal. Acto seguido, se retiró la placa del soporte magnético y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de Tagment Wash Buffer (TWB), repitiendo el procedimiento de eliminación de sobrenadante. Este lavado se realizó por duplicado y se resuspendió cada muestra en 100  $\mu\text{L}$  del TWB. Una vez terminada la fase de lavado, se realizó una amplificación por PCR con ciclos limitados, añadiendo los índices-adaptadores 1 (i7) y 2 (i5) (Nextera DNA CD Indexes 24 indexes, 24 samples; Illumina Inc. San Diego, CA. E.U.A.). Como siguiente paso, se preparó una mezcla maestra de PCR con 5  $\mu\text{L}$  de cada uno de los índices-adaptadores más 22  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas y 22  $\mu\text{L}$  de Enhanced PCR Mix (EPM) por cada una de las muestras. Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo de, dos periodos de 3 min a 68° C y 98° C, respectivamente; 5 ciclos de, 45 seg, 30 seg y 2 min a 98° C, 60° C y 68° C, respectivamente; y una extensión final de 1 min a 68° C. Finalizada la PCR, se purificaron las librerías amplificadas mediante un lavado con perlas para eliminar todos aquellos índices no amplificados o contaminantes presentes en cada una de las muestras. Posteriormente, se colocó la placa con la librería durante 5 minutos sobre el soporte magnético. Se llevó a cabo un lavado, añadiendo 45  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a tubos eppendorf con 40  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas más 45  $\mu\text{L}$  del reactivo Sample Purification Beads (SPB); se homogeneizó repetidamente utilizando una pipeta, se centrifugó por 1 minuto a 1,600 rpm y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se colocaron de nuevo los tubos durante 5 minutos sobre el soporte magnético y se recolectaron 125  $\mu\text{L}$  del sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo con 15  $\mu\text{L}$  de SPB; se homogeneizó por pipeteo, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y de nuevo se colocaron durante 5 minutos en el soporte magnético. Se desechó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con etanol al 80%. Posteriormente, se desechó el etanol y se secaron las perlas a temperatura ambiente, para después, resuspender con 32  $\mu\text{L}$  de Buffer de Resuspension (RSB), se incubaron durante 2 minutos también a temperatura ambiente y se colocaron los tubos durante 2 minutos en el soporte magnético para tomar el sobrenadante y almacenarlo a -20° C. Se realizó una electroforesis con cartuchos Agilent DNA 12 000 Kit (Agilent Technologies, Santa Clara California, EUA) en el equipo 2100 Agilent Bioanalyzer, para determinar el tamaño, concentración y pureza de los fragmentos etiquetados en cada una de las muestras. Posteriormente, se evaluó de nuevo mediante

cartuchos Agilent DNA 12 000 Kit utilizando una mezcla maestra tomando 5  $\mu$ L de cada librería y se prepararon diluciones para llevar la mezcla a una concentración final de 8 pM; como control, se utilizó una librería del genoma del bacteriófago PhiX (PhiX Control v3, Illumina Inc.) al 15%. La mezcla del control y la librería fue depositada en el cartucho para secuenciación de acuerdo con las condiciones establecidas por el fabricante (MiSeq Reagen Kit V2, Micro Flow Cell 300 cycles; Illumina Inc.) que posteriormente, fue colocado dentro del equipo de secuenciación de nueva generación MiSeq (Illumina Inc.). Para llevar a cabo el análisis inicial, el monitoreo del estatus, la edición de los parámetros de corrida y la visualización de los datos crudos generados se empleó el programa Local Run Manager de Illumina Inc.

#### **6.4. Procesamiento bioinformático de los datos generados.**

La calidad de los datos fue evaluada con la versión 0.11.8 del programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) y los genomas fueron ensamblados de novo con el programa A5-miseq (Coil D, et al. Bioinformatics 2014). Los aspectos de calidad, cantidad y longitud de los ensamblajes generados, fueron evaluados mediante un análisis con el programa Quast (v 5.0.2; Gurevich A, et al. Bioinformatics 2013). Aquellos ensamblajes con parámetros de calidad bajos, se sometieron a un protocolo de limpieza previo utilizando QCFiltering. La anotación de los borradores de genoma de completo fue realizada con el programa Prokka (v1.12; Seemann T. Bioinformatics 2014). La identificación final y mapeo de los genes que codifican para el polisacárido capsular, genes de resistencia mreA, AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia, IsaE, APH(3')-IIIa, mprF, tetM, Tet (W/N/W), mefA, tet(45), qacJ, SAT-4 y ErmB y los factores de virulencia ScpB, sodA, cspA, lmb, FbsA, FbsB, bca, HvgA, srr-1, srr-2, bibA, PI-1, PI-2a, PI-2b, dltA-D, ponA, CylE y cfb fue realizada mediante análisis de Blast con el programa BRIG (v 0.95; Alikhan, et al. BMC Genomics 2011). La identificación de genes de resistencia a antibióticos fue realizada por comparación usando la base de datos CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database; <http://arpcard.mcmaster.ca>; Jia, et al. Nucleic Acids Res 2017).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Aislamiento de EGB.

El estudio fue realizado a partir de 51 aislados identificados previamente como *S. agalactiae* por pruebas microbiológicas y bioquímicas estándares. Cada aislado fue obtenido de hisopados vagino-rectales de mujeres cursando las semanas 38 a 40 de embarazo, y que constituyeron un grupo de gestantes colonizadas de entre 17-38 años de edad (Tabla 1). La distribución del serotipo capsular determinada en los 51 aislados por aglutinación con látex (StrepPRO™ Streptococcal Grouping Kit; Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA, EUA) fue de; ocho aislados del serotipo Ia, cinco del serotipo Ib, diez del serotipo II, nueve del serotipo III, nueve del serotipo IV, cinco del serotipo V, uno del serotipo VIII y cuatro No Tipificables (NT).

**Tabla 1.** Características clínicas de 51 mujeres embarazadas colonizadas por *S. agalactiae*.

Aislado EGB	Serotipo <sup>a</sup>	Edad de la paciente (años)	IVU	Semanas de gestación	Aislado EGB	Serotipo <sup>a</sup>	Edad de la paciente (años)	IVU	Semanas de gestación
1	IV	22	No	38	27	NT	36	No	35
2	V	21	No	40	28	IV	28	Yes	37
3	III	31	No	32	29	NT	29	No	34
4	III	24	Yes	29	30	Ib	37	Yes	34
5	V	37	No	39	31	II	31	Yes	35
6	Ia	27	No	37	32	NT	17	Yes	37
7	II	25	-	34	33	II	34	No	37
8	II	26	No	36	34	NT	24	Yes	37
9	II	N/D	Yes	36	35	Ia	32	Yes	37
10	IV	20	No	37	36	Ib	33	No	37
11	III	26	Yes	36	37	III	22	Yes	34
12	IV	30	No	35	38	III	26	Yes	36
13	II	19	No	36	39	Ib	30	No	37
14	II	21	No	36	40	III	28	Yes	34
15	IV	19	No	37	41	III	22	Yes	34
16	Ib	28	No	35	42	II	31	No	37
17	II	28	No	37	43	Ia	19	No	37
18	II	32	No	38	44	IV	21	No	36
19	IV	32	Yes	34	45	V	18	No	35
20	Ib	27	Yes	37	46	Ia	36	No	34
21	VIII	29	No	36	47	III	29	Yes	37
22	IV	30	Yes	36	48	III	32	N/A	35
23	Ia	23	Yes	35	49	Ia	20	No	37
24	V	38	Yes	37	50	Ia	22	No	35
25	IV	30	Yes	35	51	Ia	30	No	37
26	V	22	Yes	37					

<sup>a</sup>Serotificado por StrepPRO Streptococcal Grouping Kit (Hardy Diagnostics; Santa Maria, CA, E.U.A).

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

## 11.2. Calidad del ADNg obtenido.

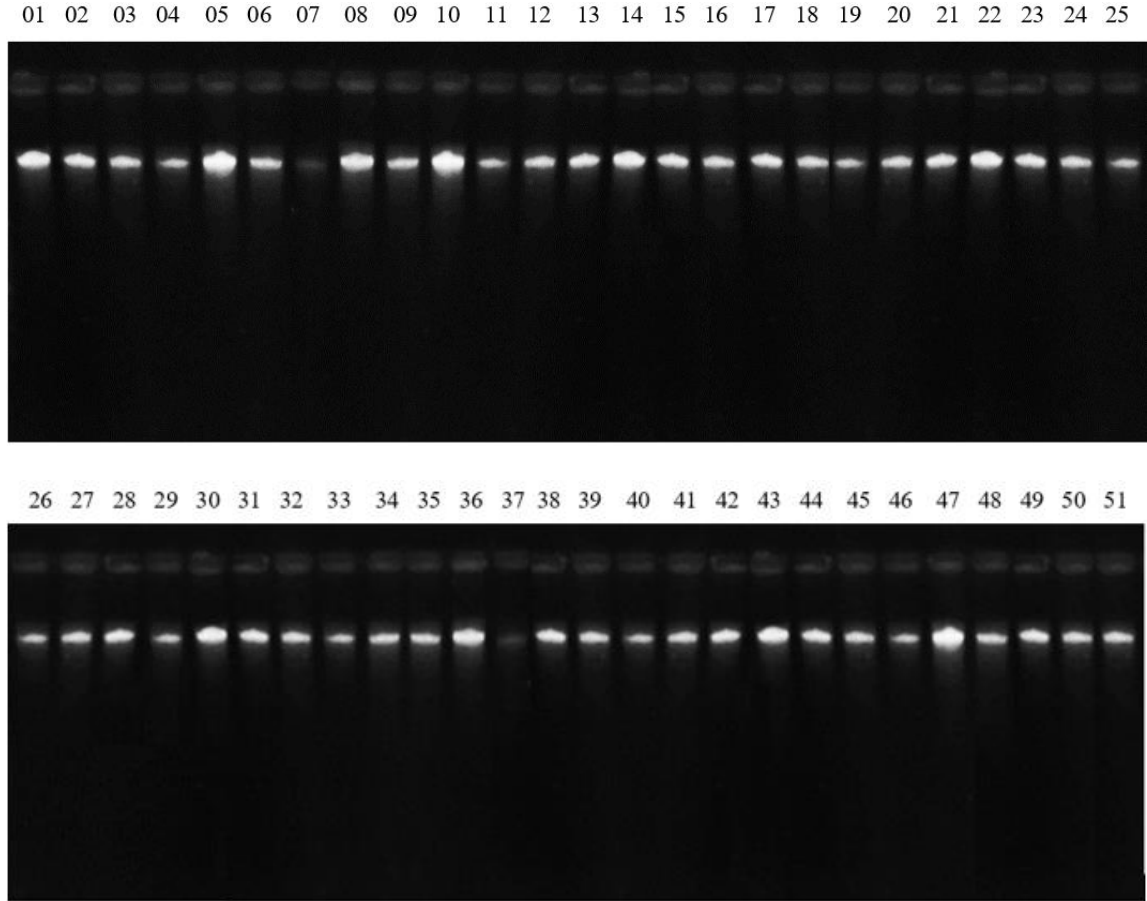
Las concentraciones de los ADNg obtenidos fueron evaluadas en el NanoDrop 2000 inmediatamente después de su extracción y oscilaron entre 13.3 y 148 ng por  $\mu\text{L}$  (Tabla 2). La segunda evaluación de las concentraciones del material genético fue realizada por ensayos de fluorescencia (Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit) arrojando concentraciones de ADNg entre 9.54 y 54 ng por  $\mu\text{L}$ . Estos valores fueron empleados para preparar las librerías de secuenciación.

**Tabla 2.** Concentración en ng por  $\mu\text{L}$  del ADNg de 51 aislados vagino-rectales de *S. agalactiae*.

No. de secuencia	Aislado	Nanodrop 2000	Qubit 2.0 Fluorometer	No. de secuencia	Aislado	Nanodrop 2000	Qubit 2.0 Fluorometer
1	73	23.3	20.32	27	1486	38.8	37.20
2	141	19.9	19.82	28	1495	28.9	28.50
3	204	17.1	16.80	29	1500	27.9	27.60
4	210	27.8	25.81	30	1503	48.3	44.30
5	414	21.2	19.89	31	1514	18.4	18.70
6	423	26.7	21.37	32	1546	37.5	32.00
7	480	24.6	24.69	33	1571	51.3	33.60
8	610	31.4	26.92	34	1574	105.2	40.60
9	685	36.3	32.40	35	1582	29.3	28.70
10	688	28.4	26.30	36	1600	56.6	54.00
11	725	19.0	37.88	37	1673	31.3	30.40
12	755	17.7	18.25	38	1718	33.2	30.30
13	833	22.2	23.76	39	1720	55.6	47.20
14	840	34.2	31.88	40	1754	46.5	49.20
15	865	22.8	24.33	41	1756	55.4	41.60
16	1038	17.8	19.43	42	1757	23.9	17.60
17	1184	23.7	22.40	43	1781	25.8	24.20
18	1186	39.7	25.20	44	1783	31.3	30.20
19	1205	40.0	36.80	45	1808	26.1	23.40
20	1207	13.3	9.54	46	1841	21.8	21.60
21	1239	104.0	34.70	47	1872	20.7	17.60
22	1249	42.0	36.70	48	1875	37.7	33.20
23	1327	148	47.70	49	1884	22.0	21.90
24	1356	37.1	34.40	50	1888	39.9	38.70
25	1367	29.7	27.40	51	1890	29.0	28.00
26	1430	57.5	40.90				

La integridad de cada ADNg obtenido de los 51 aislados de *S. agalactiae* fue determinada mediante una electroforesis (figura 7), donde se observan bandas definidas que permiten considerar una integridad óptima para la preparación de las librerías para secuenciación.

## Aislados *S. agalactiae*



Agarosa 1% en solución TBE 1x y revelado con colorante GelRed (Biotium).

**Figura 7.** Electroforesis para evaluación de la integridad del ADNg obtenido de 51 aislados de *S. agalactiae*.

### 7.3 Análisis bioinformático de las lecturas y generación de ensamblés.

En la Tabla 3 se muestran los resultados del análisis de calidad con Quast de los contigs (contigs) obtenidos, mostraron una gran variación entre genomas, presentando un mínimo de 9 y un máximo de 234 contigs por secuencia. Los porcentajes de GC fueron similares entre secuencias, oscilando entre 35.16 - 35.55%, así como, la cantidad de ARNt y de secuencias codificantes (CDS; coding sequences), que mantuvieron regularidad en la totalidad de las secuencias. Una de las características que presentó mayor variación, fue la longitud total del genoma, mostrando valores entre 1,992,505 - 2,442,122 pb, siendo los aislados 2, 3 y 15, los que mostraron valores más altos. Los metadatos generados fueron depositados en los repositorios BioProject (Insertar no. de proyecto) y BioSample

(Insertar no. asignados). Ambas bases de datos se encuentran disponibles en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject> y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample> respectivamente.

**Tabla 3.** Características de calidad de los ensamblajes obtenidos a partir de las 51 librerías de ADNg de los aislados vagino-rectales de *S. agalactiae*.

Aislado EGB	% GC	# contigs	Contig más largo (bp)	Longitud total (bp)	N50 (bp)	L50	ARNt	CDS <sup>a</sup>
1	35.33	29	397,867	2,072,788	122,277	4	50	2,103
2	35.33	36	324,265	2,071,209	111,611	6	47	2,107
3	35.36	219	97,078	2,442,122	47,310	18	51	2,759
4	35.47	234	205,859	2,404,356	46,663	11	54	2,714
5	35.43	46	193,382	2,071,163	83,577	8	48	2,089
6	35.31	9	925,276	2,065,689	576,167	2	66	2,079
7	35.22	19	371,587	2,031,498	219,275	4	52	2,057
8	35.26	16	347,725	2,107,085	216,600	4	50	2,104
9	35.42	28	621,675	2,129,320	198,914	4	46	2,175
10	35.42	48	340,748	2,153,865	106,301	7	49	2,210
11	35.46	33	283,896	2,049,130	112,974	7	49	2,063
12	35.35	23	767,097	2,082,758	166,360	3	48	2,082
13	35.34	20	375,581	2,135,908	338,512	3	50	2,162
14	35.22	18	375,220	2,031,002	284,400	3	50	2,052
15	35.29	141	161,991	2,349,574	58,894	13	64	2,531
16	35.29	18	371,932	2,099,219	225,579	4	50	2,114
17	35.30	15	658,331	2,084,635	289,032	3	46	2,107
18	35.39	23	395,673	2,171,294	220,245	4	50	2,191
19	35.33	26	442,957	2,088,008	107,033	6	45	2,094
20	35.24	31	568,217	2,028,984	122,412	4	49	2,052
21	35.38	13	831,450	2,027,737	274,129	2	53	2,025
22	35.36	38	225,082	2,089,668	120,326	6	54	2,109
23	35.32	19	682,101	2,056,572	190,969	3	52	2,075
24	35.47	32	252,835	2,102,464	125,431	7	51	2,133
25	35.44	21	468,585	2,163,849	169,745	4	45	2,203
26	35.38	9	1,115,861	2,093,642	1,115,861	1	85	2,019
27	35.38	16	656,197	2,082,960	221,072	3	47	2,019
28	35.27	17	428,768	2,098,457	208,548	4	48	2,152
29	35.54	12	728,626	2,156,797	370,974	2	47	2,184
30	35.31	24	342,363	2,093,431	154,138	5	50	2,118
31	35.31	22	373,140	2,082,890	188,409	4	47	2,017
32	35.52	11	1,019,099	2,158,927	392,680	2	56	2,177
33	35.27	20	444,003	2,062,841	284,240	3	47	2,094
34	35.55	17	664,759	2,158,319	296,424	3	51	2,195
35	35.17	11	756,442	2,035,797	471,663	2	53	2,055
36	35.35	23	285,401	2,071,288	205,628	5	56	2,099
37	35.29	27	284,102	1,992,505	134,518	5	50	2,002
38	35.17	33	235,893	2,071,830	95,729	7	49	2,120
39	35.21	15	497,722	2,030,931	370,555	3	45	2,046
40	35.24	26	263,696	2,013,414	133,458	6	54	2,009
41	35.24	27	412,651	2,012,945	131,705	5	52	2,013
42	35.29	21	328,334	2,067,817	195,778	4	48	2,084
43	35.17	25	388,762	2,031,466	139,432	4	51	2,036
44	35.33	23	326,325	2,088,143	166,359	4	46	2,100
45	35.52	21	324,671	2,185,400	221,617	4	50	2,214
46	35.31	7	1,114,779	2,056,233	1,114,779	1	47	2,067
47	35.16	32	284,191	2,071,560	96,000	7	49	2,116
48	35.48	36	236,846	2,175,588	114,146	7	47	2,233
49	35.30	9	806,310	2,055,310	556,039	2	50	2,063
50	35.33	16	577,408	2,160,930	270,704	3	47	2,172
51	35.25	12	843,957	2,038,346	391,271	2	46	2,051

\*CDS: secuencias codificantes. La calidad de los ensamblajes fue evaluada con el programa Quast (v 5.0.2; Gurevich A, et al. Bioinformatics 2013) y la anotación de los borradores de genomas fue realizada con Prokka (v1.12; Seemann T. Bioinformatics 2014).

## 7.4 Identificación y mapeo de genes del polisacárido capsular y factores de virulencia

Los aislados con locus CPS, que codifica para el polisacárido capsular de ácido siálico, corresponden a los serotipos Ia, Ib, II, III, IV y V. La distribución del Locus CPS fue de; nueve aislados del serotipo Ia (17.64%), dos del serotipo Ib (3.92%), catorce del serotipo II (27.45%), siete del serotipo III (13.72%), diez del serotipo IV (19.60%), cinco del serotipo V (9.80%), uno No Tipificable (1.96%) y 3 con Doble serotipo (5.88%), que se observan en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Comparación de la serotipificación de 51 aislados de EGB mediante aglutinación con látex y secuenciación.

Serotipo identificado por aglutinación en látex <sup>a</sup>	Serotipo identificado por secuenciación												
	Ia	Ib	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	NT	DS	
Ia	6				1							1	
Ib		2	2		1								
II			9		1								
III				7									2
IV			1		7								1
V						5							
VI							1						
VII								1					
VIII			1						1				
IX										1			
NT	3		1								1		
DS													1

En color verde se muestra la cantidad de aislados cuya serotipificación concuerda por ambas técnicas. En rojo se indican los aislados con serotipos no concordantes por ambas técnicas. NT, no tipificables; DS, doble serotipo. <sup>a</sup>Empleando StrepPRO™ Streptococcal Grouping Kit. (Hardy Diagnostics®, Santa Maria, CA, EUA).

La serotipificación por aglutinación en látex obtuvo un porcentaje de efectividad de aislados totales del 70.58% (36 de 51) y un 76.59% contando solo los aislados que fueron tipificables (36 de 47) en comparación con la determinación genómica (Tabla 5). El aislado que presentó mayor cantidad de errores en la serotipificación por aglutinación en látex, fue el serotipo II, con 6 de 15 casos presentados, seguido del serotipo IV y Ia con 5



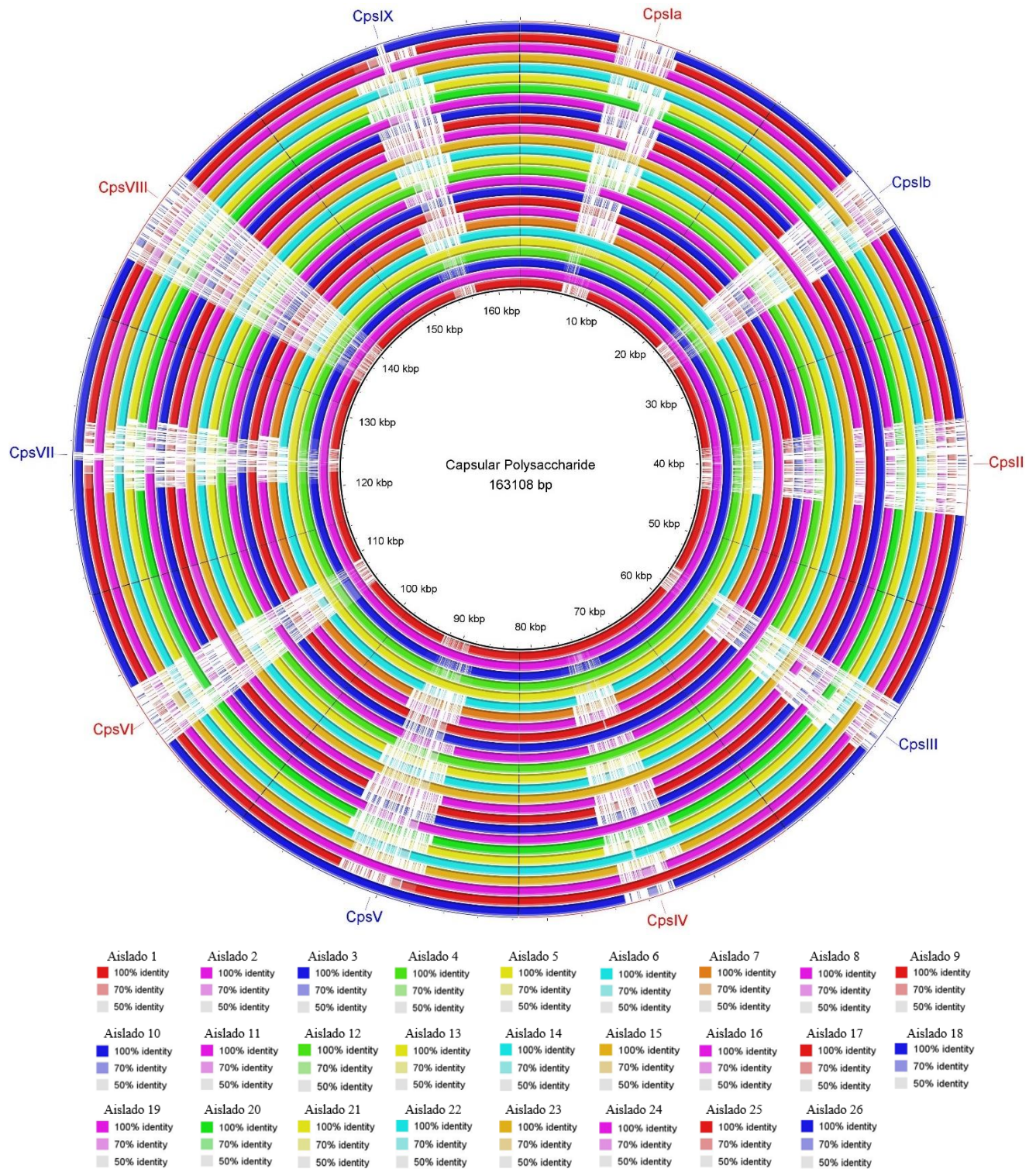
y 3 casos, respectivamente. Los serotipos III y V, presentaron una coincidencia del 100% mediante ambos métodos de serotipificación.

**Tabla 5.** Comparación de la serotipificación de cada aislado entre aglutinación en látex y secuenciación.

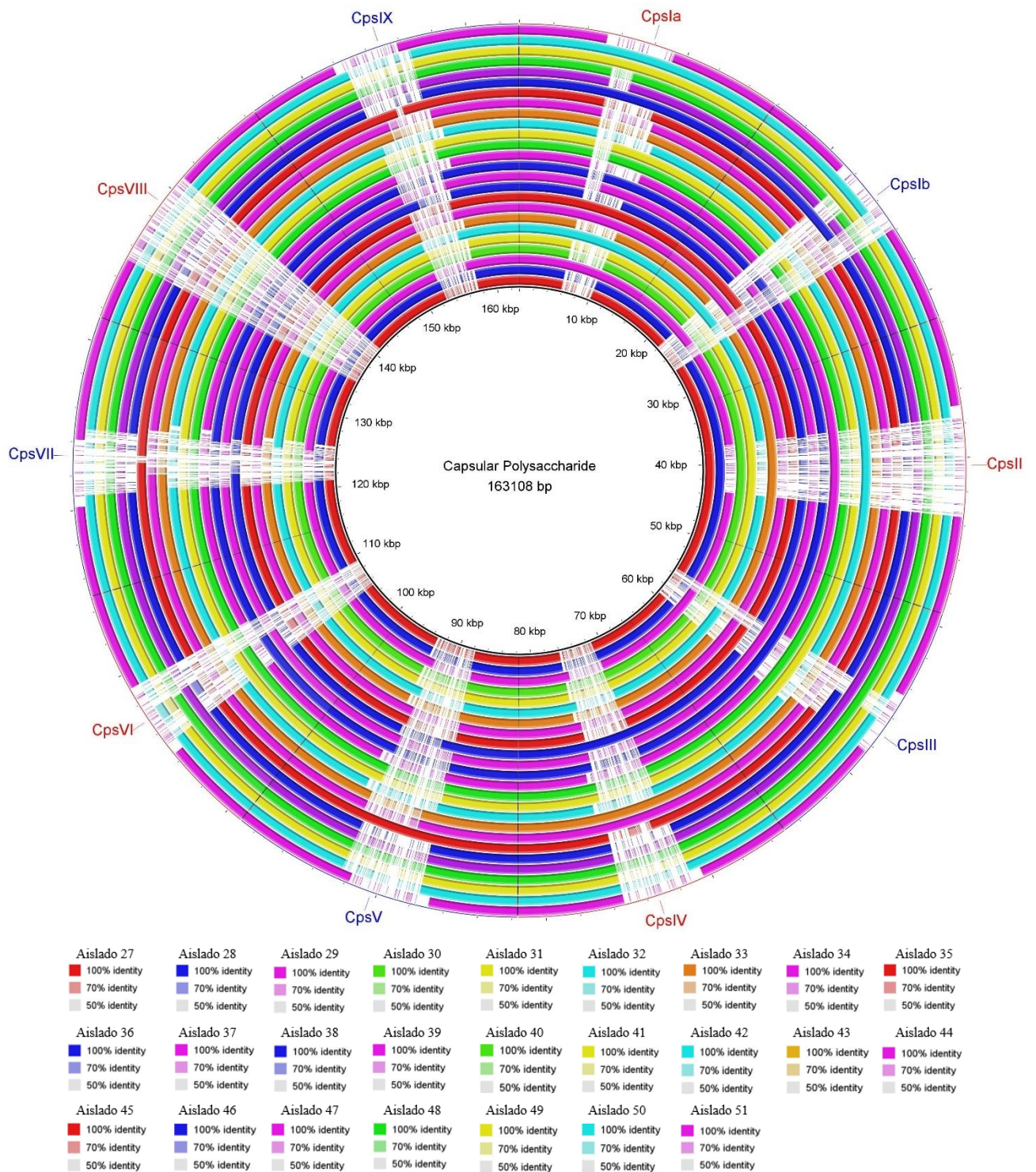
No. de secuencia	No. aislado	Serotipificación por técnicas microbiológicas	Serotipificación por secuenciación	✓/✗	No. de secuencia	No. aislado	Serotipificación por técnicas microbiológicas	Serotipificación por secuenciación	✓/✗
1	73	IV	IV	✓	27	1486	NT	II	✗
2	141	V	V	✓	28	1495	IV	II	✗
3	204	III	II/III	✗	29	1500	NT	Ia	✗
4	210	III	III/IV	✗	30	1503	Ib	II	✗
5	414	V	V	✓	31	1514	II	II	✓
6	423	Ia	Ia	✓	32	1546	NT	Ia	✗
7	480	II	II	✓	33	1571	II	II	✓
8	610	II	II	✓	34	1574	NT	Ia	✗
9	685	II	IV	✗	35	1582	Ia	Ia	✓
10	688	IV	IV	✓	36	1600	Ib	IV	✗
11	725	III	III	✓	37	1673	III	III	✓
12	755	IV	IV	✓	38	1718	III	III	✓
13	833	II	II	✓	39	1720	Ib	II	✗
14	840	II	II	✓	40	1754	III	III	✓
15	865	IV	II/IV	✗	41	1756	III	III	✓
16	1038	Ib	Ib	✓	42	1757	II	II	✓
17	1184	II	II	✓	43	1781	Ia	IV	✗
18	1186	II	II	✓	44	1783	IV	IV	✓
19	1205	IV	IV	✓	45	1808	V	V	✓
20	1207	Ib	Ib	✓	46	1841	Ia	Ia	✓
21	1239	VIII	II	✗	47	1872	III	III	✓
22	1249	IV	IV	✓	48	1875	III	III	✓
23	1327	Ia	Ia	✓	49	1884	Ia	Ia	✓
24	1356	V	V	✓	50	1888	Ia	Ia	✓
25	1367	IV	IV	✓	51	1890	Ia	NT	✗
26	1430	V	V	✓					

Se tomaron como negativos o incorrectos, aquellos aislados no coincidentes, así como, los que presentaron doble serotipo.

El mapeo de los genes que codifican para el polisacárido capsular de ácido siálico (figuras 8 y 9) y los factores de virulencia ScpB, sodA, cspA, lmb, FbsA, FbsB, bca, HvgA, srr-1, srr-2, bibA, PI-1, PI-2a, PI-2b, dltA-D, ponA, CylE y cfb (figuras 10 y 11) en los 51 aislados de *S. agalactiae* ha sido realizado mediante comparación de genomas por identidad con el generador de imágenes en anillos, BRIG. Cada anillo representa un aislado y se muestran segmentados en bloques que corresponden a cada uno de los factores evaluados, con el porcentaje de 22 identidad BLASTn señalado por medio de intensidad/continuidad de color (v 0.95; Alikhan, et al. BMC Genomics 2011).



**Figura 8.** Mapeo de los genes que codifican para el polisacárido capsular de ácido siálico en 26 aislados (1 al 26) de *S. agalactiae* mediante alineamiento de secuencias con el programa BRIG. Se muestran las identidades BLASTn del 70, 90 y 100%.



**Figura 9.** Mapeo de los genes que codifican para el polisacárido capsular de ácido siálico en 25 aislados (27 al 51) de *S. agalactiae* mediante alineamiento de secuencias con el programa BRIG.

Se muestran las identidades BLASTn del 70, 90 y 100%.

Los factores de virulencia ScpB, sodA, cspA, lmb, FbsA, FbsB, bca, HvgA, srr-1, srr-2, bibA, PI-1, PI-2a, PI-2b, dltA-D, ponA, CylE y cfb identificados en los 51 aislados, se presentan en las tablas 6 y 7, clasificados según el tipo de función a realizar durante el proceso de patogénesis; evasión inmune, adherencia celular e invasión, resistencia a AMPs y toxinas formadoras de poro.

**Tabla 6.** Factores de virulencia identificados en 26 aislados vagino-rectales de *S. agalactiae* (Aislados 1 al 26).

Factores de virulencia <sup>a</sup>	Aislado EGB																										Referencia <sup>b</sup>	
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26		
Evasión inmune																												
ScpB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	U56908.1
sodA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	KU598928.1
cspA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	FJ752115.1
Adherencia celular e invasión																												
lmb	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	AF062533.1
FbsA	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	AJ437620.1	
FbsB	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	HQ267707.1	
bca	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	M97256.1	
HvgA	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	CP020432.2	
srr-1	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	CP010867.1	
srr-2	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	AY669067.1	
bibA	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	FJ801035.1	
Resistencia a AMPs																												
Pili																												
PI-1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	EU929743.1	
PI-2a	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	EU929327.1	
PI-2b	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	EU929402.1	
dltA-D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	AJ291784.1
ponA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	AY069949.2
Toxinas formadoras de poros																												
CylE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	AF093787.2
cfb	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	EF694027.1

<sup>a</sup>Clasificación obtenida de Rajagopal, L. (2009). Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. Future Microbiology, 4(2), 201–221.

<sup>b</sup>GeneBank ID de las secuencias utilizadas como referencia para identificación de genes.

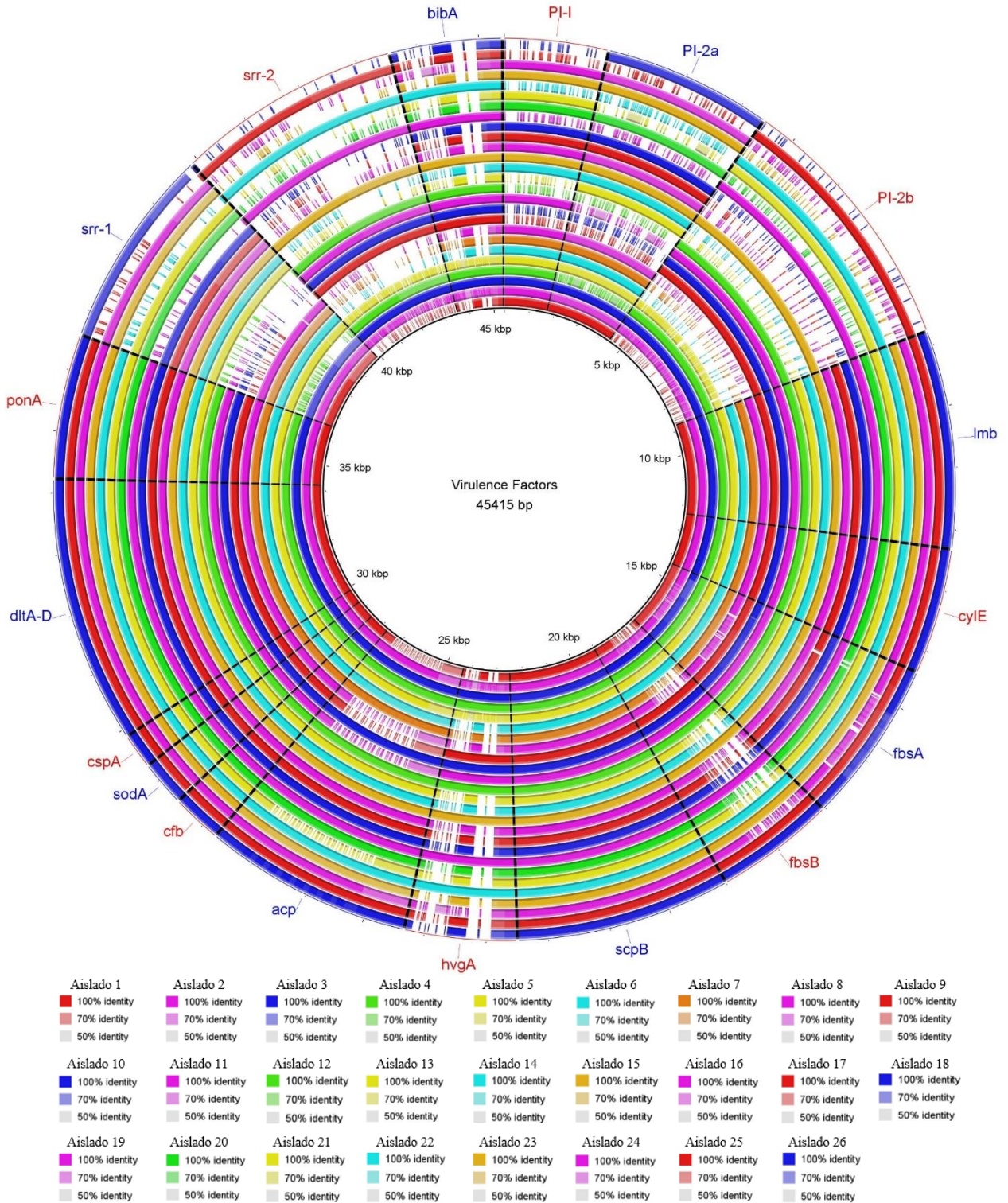
**Tabla 7.** Factores de virulencia identificados en 25 aislados vagino-rectales de *S. agalactiae* (Aislados del 27 al 51)

Factores de virulencia <sup>a</sup>	Aislado EGB																									Referencia <sup>b</sup>
	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	
Evasión inmune																										
ScpB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	U56908.1
sodA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	KU598928.1
cspA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	FJ752115.1
Adherencia celular e invasión																										
lmb	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	AF062533.1
FbsA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	AJ437620.1	
FbsB	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	HQ267707.1	
bca	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	M97256.1	
HvgA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	CP020432.2	
srr-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	CP010867.1	
srr-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	AY669067.1	
bibA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	FJ801035.1	
Resistencia a AMPs																										
Pili																										
PI-1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	EU929743.1	
PI-2a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	EU929327.1	
PI-2b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	EU929402.1	
dltA-D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	AJ291784.1	
ponA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	AY069949.2	
Toxinas formadoras de poros																										
CylE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	AF093787.2	
cfb	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	EF694027.1	

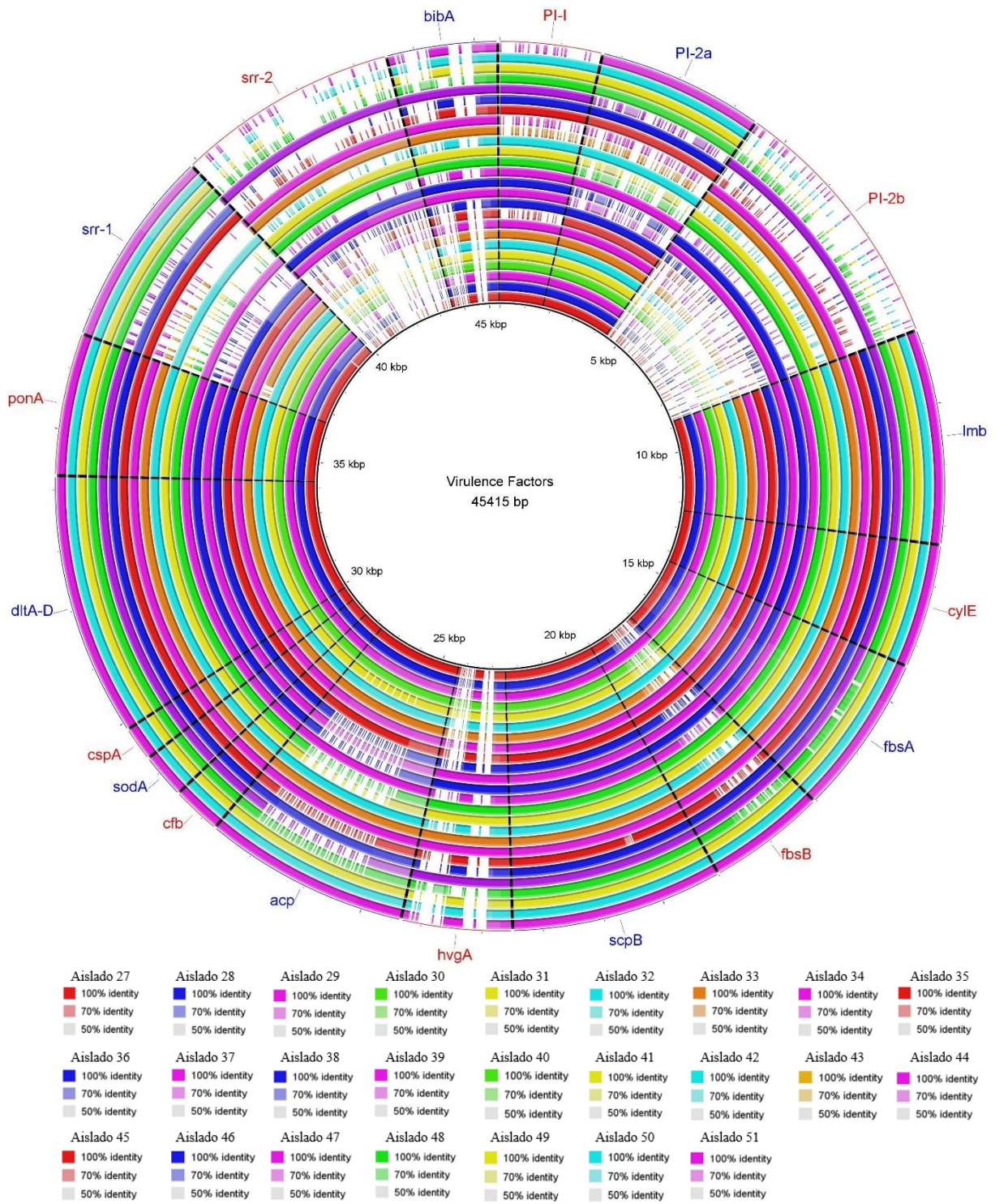
<sup>a</sup>Clasificación obtenida de Rajagopal, L. (2009). Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. *Future Microbiology*, 4(2), 201–221.

<sup>b</sup>GeneBank ID de las secuencias utilizadas como referencia para identificación de genes.

Los locus, *sodA* y *cspA*, *lmb*, *dltA-D* y *ponA*, *CylE* y *cfb* fueron encontrados en la totalidad de los aislados, mientras que, el locus *ScpB*, en el 98.03 % de los casos (50/51), siendo los locus más prevalentes entre secuencias. En orden de frecuencia total encontrada (mayor a menor), de los factores relacionados a la adherencia celular e invasión, fue de; *FbsA* 90.19% (46 de 51), *bca* 72.54% (37 de 51), *srr-1* 70.58% (36 de 51), *FbsB* 54.90% (28 de 51), *HvgA* 39.21% (20 de 51), *srr-2* 37.25% (19 de 51) y *bibA* con un 35.29% (18 de 51). Por otro lado, la aparición de los locus pertenecientes a la familia de islas Pili, fue de; *PI-1* 76.47% (39 de 51), *PI-2a* 68.62% (35 de 51), *PI-2b* 35.29% (18 de 51). Sin embargo, la mayoría de los aislados, 76.47% (39 de 51), presentaron al menos dos locus (*PI-1*, *PI-2a*, o *PI-2b*) simultáneamente en el genoma. Donde, las combinaciones presentaron las siguientes prevalencias; *PI-1* + *PI-2a*, 56.86% (29 de 51), *PI-1* + *PI-2b*, 15.68% (8 de 51) y la triple aparición, *PI-2a* + *PI-2a* + *PI-2b*, con un 3.92% (2 de 51).



**Figura 10.** Mapeo de los genes que codifican para los factores de virulencia ScpB, sodA, cspA, lmb, FbsA, FbsB, bca, HvgA, srr-1, srr-2, bibA, PI-1, PI-2a, PI-2b, dltA-D, ponA, CyleE y cfb en 26 aislados (1 al 26) de *S. agalactiae* mediante alineamiento de secuencias con el programa BRIG. Se muestran las identidades BLASTn del 70, 90 y 100%.



**Figura 11.** Mapeo de los genes que codifican para los factores de virulencia ScpB, sodA, cspA, lmb, FbsA, FbsB, bca, HvgA, srr-1, srr-2, bibA, PI-1, PI-2a, PI-2b, dltA-D, ponA, Cyle y cfb en 25 aislados (27 al 51) de *S. agalactiae* mediante alineamiento de secuencias con el programa BRIG. Se muestran las identidades BLASTn del 70, 90 y 100%.

### 7.5. Identificación de genes de resistencia a antibióticos.

Se empleó la base de datos CARD (<http://arpcard.mcmaster.ca>; Jia, et al. Nucleic Acids Res 2017) para la búsqueda de los genes *mreA*, AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia, *IsaE*, APH(3')-IIIa, *mprF*, *tetM*, Tet (W/N/W), *mefA*, *tet(45)*, *qacJ*, SAT-4 y *ErmB* con identidad perfecta e identidad estricta a genes reportados para resistencia a antibióticos en los 51 aislados de *S. agalactiae* obtenidos.

**Tabla 7.** Genes de resistencia a antibióticos identificados en 51 aislados vagino-rectales de *S. agalactiae*.

Aislado EGB	Identidad perfecta <sup>a</sup>						Identidad estricta <sup>b</sup>				
	<i>mreA</i>	AAC(6')-Ie- APH(2'')-Ia	<i>IsaE</i>	APH(3')- IIIa	<i>mprF</i>	<i>tetM</i>	Tet (W/N/W)	<i>tet(45)</i>	<i>qacJ</i>	SAT-4	<i>ErmB</i>
1	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
4	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
5	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
6	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
8	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
9	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
10	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
11	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
12	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
13	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
14	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
15	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
16	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
17	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
18	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
19	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
20	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
21	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
22	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
23	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
24	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
25	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
26	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
27	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
28	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
29	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
30	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
31	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
32	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
33	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
34	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
35	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
36	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
37	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
38	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
39	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
40	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
41	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
42	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
43	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
44	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
45	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
46	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
47	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
48	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
49	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
50	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
51	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>Detección realizada como vigilancia clínica encontrando coincidencias del 100%.



<sup>b</sup>Detección de variantes previamente reportadas en las que puede existir mutaciones encontrando genes probablemente funcionales. (<http://arpcard.mcmaster.ca>; Jia, et al. Nucleic Acids Res 2017).

## 8. DISCUSIÓN

*Streptococcus agalactiae* o Estreptococo del Grupo B (EGB), es la principal bacteria causante de infecciones invasivas en recién nacidos (sepsis neonatal y meningitis), debido a la transmisión vertical proveniente de la madre. Es responsable de dos a tres casos de meningitis, neumonía y septicemia por cada 1000 nacimientos registrados y una causa de mortalidad importante en adultos, principalmente en personas de edad avanzada y/o con comorbilidades (M. Farley, 2001; Schuchat, 1998). Se ha reportado en diversos estudios que la presencia de determinados factores de virulencia en el genoma de EGB, contribuyen a una mayor eficiencia en el proceso infeccioso, facilitando la invasión, colonización y/o evasión de la respuesta inmune (Fischetti et al., 2000). El presente trabajo, es un estudio genómico comparativo en el que se llevó a cabo la identificación de los genes que codifican para el Polisacárido Capsular, y una posterior determinación molecular de los serotipos, así como la identificación de los factores de virulencia y de resistencia de 51 aislados vaginales de mujeres embarazadas. Una de las características que presentó mayor variación en el análisis, fue la longitud total del genoma, mostrando una variación de 22.56% entre las secuencias de menor y mayor tamaño, siendo 1,992,505 y 2,442,122 pb, respectivamente. En el año 2000, se realizó un estudio genómico comparativo donde se estimó que la variación intra-especies del tamaño de genoma bacteriano, puede ser incluso mayor al 20% (Lan & Reeves, 2000). Esta información nos permite confirmar que los resultados son coincidentes con algunos estudios previamente publicados. Los porcentajes de GC obtenidos fueron similares entre secuencias, oscilando entre 35.16 - 35.55%, así como, la cantidad de ARNt y de secuencias codificantes (CDS; coding sequences), que mantuvieron regularidad en la totalidad de las secuencias. Con respecto a los cóntigos encontrados, la variación fue mayor, pues obtuvimos valores en un rango de 9 a 234, sin embargo, solo 3 aislados mostraron una cantidad de cóntigos mayor al resto, siendo los aislados 3, 4 y 15 con 219, 234 y 141 cóntigos, respectivamente y el resto, un promedio de 22 cóntigos por secuencia, número dentro de los rangos establecidos como óptimos (Huptas et al., 2016). Estos resultados, indican que la totalidad de nuestros aislados, se secuenció de manera correcta.

La identificación de factores de virulencia y genes de resistencia, por medio de análisis bioinformáticas, han demostrado ser significativamente mejores en comparación con las técnicas microbiológicas estándares (Kong et al., 2002), debido a esto, utilizando la secuenciación, obtuvimos toda la información posible sobre el genoma de los 51 aislados de *Streptococcus agalactiae*.

El Polisacárido capsular es el principal factor de virulencia relacionado a la infección, permitiendo la invasión y facilitando la evasión del sistema inmune del hospedero. El método más común utilizado para la serotipificación es la aglutinación en látex basado con anticuerpos policlonales específicos para los 10 serotipos reconocidos actualmente. Sin embargo, este método serológico tiene una gran cantidad de limitaciones, principalmente, el no poder determinar un serotipo cuando se cuenta con una baja expresión del polisacárido capsular (Afshar et al., 2011). La serotipificación por aglutinación en látex obtuvo un porcentaje de efectividad del 70.58% (36 de 51 aislados totales) en comparación con la serotipificación por secuenciación, esto indica, que cerca del 30% de los aislados analizados, habían sido erróneamente determinados con un serotipo diferente. Esta determinación puede llegar a tener consecuencias graves, ya que, algunos serotipos (por ejemplo, serotipo III), cuentan con una virulencia mayor en comparación al resto, y un mal diagnóstico, puede costar la vida de la persona infectada. Un estudio publicado en 2013, utilizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para determinar el serotipo de 312 aislados de *Streptococcus agalactiae*, de los cuales, solo 237 habían sido tipificados con éxito mediante aglutinación en látex (75 habían sido catalogados como No Tipificables). Dentro de los aislados que pudieron ser tipificables, se obtuvo un 94% de coincidencia, mientras que en nuestro estudio el porcentaje de coincidencia de los aislados que fueron tipificables por aglutinación en látex, fue del 76.59% (Yao et al., 2013). Tomando en cuenta como tipificación errónea, también aquellos aislados que no pudieron ser tipificados por aglutinación en látex, en ambos estudios, los porcentajes de coincidencia bajan a 62% y 70.58%, respectivamente. En nuestro estudio, el aislado que presentó mayor cantidad de errores en la serotipificación por aglutinación en látex, fue el serotipo II, con 6 de los 15 casos presentados, seguido del serotipo IV y Ia con 5 y 3 casos, respectivamente, mientras que los serotipos III y V, presentaron una coincidencia del 100% mediante ambos métodos de serotipificación. Esto

puede ser por una diferencia en la expresión de los polisacáridos capsulares dependiendo del serotipo, siendo mayor en los serotipos III y V, que, según la literatura, son los serotipos más frecuentemente asociados a infecciones invasivas en adultos y neonatos, por sus factores de virulencia y su asociación a resistencia a macrólidos (Laczeski et al., 2014). Por otro lado, aquellos serotipos No tipificables por aglutinación en látex, aparentemente no expresan antígenos de polisacáridos capsulares que puedan ser reconocidos por antisueros. Estos aislados tenían mutaciones en uno o dos sitios, dentro de la región cps estudiada, que alteraron las secuencias de aminoácidos, afectando la producción de polisacáridos o la antigenicidad.

Durante las últimas ocho décadas, se han realizado estudios basados en los antígenos del CPS para determinar la distribución de los serotipos por región geográfica, obteniendo resultados contrastantes debido a diferentes factores, incluyendo la región geográfica, el perfil de la población y la diferencia en el nivel de desarrollo de cada país. En Estados Unidos y Europa (países desarrollados), los serotipos más frecuentes son el Ia, II, III y V, siendo el III y V los predominantes, mientras que los serotipos de VI al IX, son descritos en raras ocasiones (Dogan et al., 2005; Gherardi et al., 2007). Un meta-análisis que incluye 38 artículos publicados entre 1980 y 2011 (Fueron originalmente 2709 artículos, pero la mayoría fueron excluidos por falta de datos o cumplimiento de los criterios de inclusión), muestra una recopilación global de 8718 aislados, donde, más del 50% de todos los casos, pertenecen al serotipo III, seguido por los serotipos Ia, Ib, II y V, respectivamente. Del total de estudios utilizados, 33 correspondían a países desarrollados, mientras que, cinco a países medianamente-desarrollados (Sudáfrica, Nigeria, Marruecos, Rumania y Argentina), donde la distribución serotípica parecía ser similar al resto de las regiones apoyadas por la Organización Mundial de la Salud (K. M. Edmond et al., 2012). En el presente trabajo, los aislados con locus CPS identificados, corresponden a los serotipos Ia, Ib, II, III, IV y V, con la siguiente proporción (mayor a menor); 27.45% al serotipo II, 19.60% al serotipo IV, 17.64% al serotipo Ia, 13.72% al serotipo III, 9.80% al serotipo V, 3.92% al serotipo Ib, 5.88% con Doble serotipo y 1.96% No Tipificable.

En México se han realizado estudios donde se ha observado una prevalencia dominante del serotipo I y una creciente participación del serotipo III (G. Palacios et al., 2017), sin

embargo, no se especifica, si el serotipo I al que se hace referencia, pertenece al serotipo Ia o Ib, esto dificulta los análisis y puede alterar los resultados. Una de las principales razones, por las que puede existir esta diferencia, es por el gran margen de error que presentan las técnicas de serotipificación utilizadas. De igual manera, la baja cantidad de estudios publicados en el país, y en países con un desarrollo parecido al nuestro, dificulta la comparativa de las prevalencias serotípicas de *Streptococcus agalactiae*.

La prevalencia del serotipo IV, como segundo factor más presente en nuestro estudio, podría relacionarse con el cambio capsular del serotipo III al serotipo IV o V, debido, probablemente, a una presión inmunitaria selectiva (Florindo et al., 2014). Este hecho es relevante, debido a que, en la mayoría de los estudios se ha observado en regiones del mediterráneo y raramente ha sido reportado en América. No obstante, estudios publicados recientemente, muestran un incremento considerable en la aparición de casos relacionados a este serotipo, principalmente en Estados Unidos y Canadá, en el que se le menciona como un patógeno emergente de cuidado (Diedrick et al., 2010; Teatero et al., 2015).

Hasta el momento no existen reportes de aislados de *Streptococcus agalactiae* que presenten más de un serotipo, sin embargo, en nuestro estudio encontramos tres que comparten dos serotipos distintos; aislados 3, 4 y 15, presentando los locus, II/III, III/IV y II/IV, respectivamente. Coincidentemente, estas tres secuencias son las que cuentan con los genomas más grandes. La explicación más lógica, es que la paciente se encontraba con una doble colonización por dos distintos serotipos de EGB, y al momento de la purificación en placa, no se observó una diferencia en la morfología de las colonias por ser una bacteria de la misma especie. No obstante, la posibilidad de que el aislado presente un doble serotipo por la presencia de ambos Locus CPS, es real. Esta posibilidad, tendría problemas más complejos en comparación con la primera planteada, pues la serotipificación por aglutinación en látex perdería especificidad y deberá buscarse un método más eficaz y menos complejo para la serotificación.

La virulencia de *Streptococcus agalactiae* depende de la resistencia que presente frente a la inmunidad del huésped. Para ello, EGB posee el factor de virulencia ScpB, que codifica la C5a peptidasa y facilita la evasión inmune mediante la adherencia e inactivación del complemento humano C5a. Este factor, representado por el locus ScpB, fue encontrado

en el 98.03% de los casos (50/51), resultados coincidentes a estudio con un total de 41 aislados realizado en Irán, donde se encontró una prevalencia del 97.6% (Beigverdi et al., 2014). De igual manera, EGB cuenta con los factores de virulencia *sodA*, una superóxido dismutasa cofactorizada con  $Mn^{+}$ , y *cspA*, una serín proteasa asociada a la superficie celular, que desempeñan un papel determinante en la patogenia. Estos factores mostraron una prevalencia en la totalidad de los aislados, coincidente con los presentados en varios estudios, siendo el más reciente, uno publicado con un total de 68 aislados, obteniendo una presencia del 100% (Zastempowska et al., 2022). Debido a la prevalencia encontrada en la totalidad de los aislados por diversos estudios, han sido utilizados como referencia para identificación de *S. agalactiae*, por técnicas moleculares como PCR y secuenciación, al igual que en nuestro estudio.

Los factores de virulencia relacionados a la adherencia celular e invasión, juegan un papel determinante en la patogénesis, sin embargo, a diferencia de los que se encuentran relacionados a la evasión inmune, estos factores muestran porcentajes de prevalencia variables dependiendo el tipo de serotipo. Los factores *lmb*, *FbsA* y *bca* mostraron prevalencias del 100, 90.19 y 72.54%, respectivamente. Estos resultados coinciden con los presentados por un estudio realizado en Argentina, donde se observó una presencia del 87.94, 100 y 88.60%, respectivamente, en la totalidad de los 316 aislados analizados con una variación de entre 10 y 16%. La coincidencia en la prevalencia del gen *lmb*, en más del 85% de los aislados analizados en estos y otros estudios, coincide con la afirmación de que se encuentra en la mayoría de los aislados humanos (Spellerberg et al., 2010).

Por otro lado, el factor *FbsB*, mostró una variación de más del 45%, entre nuestro estudio y el publicado por Bobadilla y colaboradores, presentando porcentajes de prevalencia del 54.90% y 100%, respectivamente. Al realizar una comparativa entre serotipos, pudimos observar que el porcentaje de prevalencia disminuye notablemente debido al serotipo II, ya que, no presenta el locus *FbsB* en ninguno de los aislados (0 de 14), no obstante, en el estudio de Bobadilla y colaboradores, se encuentra presente en el 100% de los aislados de este serotipo (Bobadilla et al., 2021). Estas variaciones en la presencia del locus *FbsB* dentro del serotipo II, indican una diferencia del 100% entre ambos estudios, algo poco observado, pues la presencia de ciertos factores de virulencia generalmente se encuentra

directamente relacionada al serotipo del aislado. Se sugiere realizar más estudios sobre este factor y la presencia en este serotipo.

El factor HvgA, codificante para la proteína adhesina hipervirulenta que media la colonización intestinal neonatal por EGB y el cruce de las barreras intestinal y hematoencefálica (Tazi et al., 2010), fue encontrado en el 39.21% de los aislados, con una prevalencia específica del 41.17% en los serotipos III y IV (7 de 17 en cada caso). De acuerdo a la literatura consultada, estos resultados difieren con los reportados por varios grupos de investigación alrededor del mundo. Un estudio realizado en Canadá, muestra una prevalencia del 25.6% en un total de 1683 aislados y una seroprevalencia específica del 74.4 y 11.6% para los serotipos III y IV, respectivamente (Areej Alhhazmi, 2018). En contraste, un estudio realizado en Serbia, reportó una prevalencia del 7.2% en un total de 432 aislados y una seroprevalencia específica del 93.5 y 6.5% para los serotipos III y IV, respectivamente, en un total de 31 aislados positivos para este factor (Gajic et al., 2019). Comparando los porcentajes de prevalencia de la totalidad de los aislados, observamos que el serotipo III presenta predominantemente el factor HvgA. Sin embargo, los porcentajes de prevalencia seroespecífica de aparición de este factor, no concuerdan con nuestros hallazgos.

Uno de los mecanismos que posee EGB para facilitar el proceso de infección y colonización, es la producción de glicoproteínas de repetición rica en serina (SRR), que contienen un motivo de anclaje a la pared celular, y son reconocidas por sortasas específicas para la correcta escisión y anclaje a la membrana (Sheen et al., 2011). Se ha demostrado que las cepas de EGB portan uno de dos alelos del gen Srr, denominados Srr-1 y Srr-2, que son similares en arquitectura, pero con una homología menor al 20% de identidad (Seifert et al., 2006). Los factores Srr-1 y Srr-2, mostraron prevalencias del 70.58 y 37.25%, respectivamente de manera individual y del 7.84% con doble aparición en un mismo aislado.

El factor de virulencia Srr-1, que codifica para la proteína del mismo nombre, interactúa con una proteína de 62 kDa en la saliva humana y desempeñan un papel importante en la unión bacteriana a la célula K4 humana, implicado en la adherencia a las células epiteliales HEp-2 (U. Samen et al., 2007). Así mismo, se ha observado que juega un papel importante

en el cruce de la barrera hematoencefálica y en el desarrollo de la meningitis estreptocócica (Sorge et al., 2009). El factor Srr-1, se encontró en la mayoría de los aislados, mostrando una prevalencia del 70.58% (36 de 51 aislados), lo cual coincide con lo establecido en la literatura al ser la proteína rica en serina más común en la superficie celular de EGB. Por otro lado, el factor de virulencia Srr-2, relacionado a una hipervirulencia y que ha sido reportado aparentemente de manera restringida al serotipo III, tipo de secuencia multilocus (ST) 17 (Seifert et al., 2006), mostró una prevalencia del 37.25% (19 de 51 aislados), presentándose en los Serotipos III, IV y V. Esto podría ser un punto más a favor de la teoría de un cambio capsular del serotipo III al serotipo IV o V, debido, a una presión inmunitaria selectiva. Con respecto a la doble aparición de los locus Srr-1 y Srr-2 en un mismo aislado, se observa que dos de ellos pertenecen al serotipo V y dos a un aislado con doble serotipo. No existen reportes de una doble aparición, ya que se menciona reiteradamente, que se expresa uno u otro gen, no ambos (Seo et al., 2013).

BibA, es un nuevo factor de virulencia de EGB que se ha relacionado con la colonización bacteriana y codifica una proteína multifuncional con resistencia a la eliminación de fagocitos y capacidades de adhesión. Este factor mostró una prevalencia del 35.29% (18 de 51 aislados) que no coincide con los presentados por diversos estudios a nivel mundial. Santi y colaboradores, presentaron dos estudios realizados en Italia, en los que reportan un prevalencia del 100% con 24 y 72 aislados en cada estudio, y proponen a BibA como blanco candidato para el desarrollo de una vacuna (Santi et al., 2007, 2009). Sin embargo, un estudio más reciente, realizado en Egipto e Irán, muestra una prevalencia del 53.48% en un total de 43 aislados analizados (Ali Hamad et al., 2021). Es importante mencionar que, al realizar un análisis específico de prevalencia por serotipo en nuestro estudio, se observa que los únicos serotipos que presentan el factor BibA, son los serotipos III, IV y V. El estudio de Ali y colaboradores, no presenta especificaciones de serotipos e imposibilita una comparativa desde esta perspectiva. Un factor importante de variación que podría afectar en la presencia o ausencia de este factor en los aislados de los diferentes estudios, es el área geográfica en la que fue realizado en estudio.

Estudios recientes han demostrado que EGB presenta un pequeño organelo de superficie que media la resistencia a AMPs y facilita la adherencia del patógeno a las células

huésped. Este organelo, conocido como Pili, es codificado por dos locis conocidos como islas de Pili 1 y 2 (PI-1 y PI-2), con dos variantes de la isla de Pili 2, (PI-2a y PI-2b). Según diversos estudios, al menos una isla de Pili, ha sido encontrada en todos los serotipos humanos reportados. En nuestro estudio encontramos las siguientes prevalencias de los locus pertenecientes a la familia de islas Pili; PI-1 presente en 39 aislados (76.47%), PI-2a en 35 (68.62%) y PI-2b en 18 (35.29%). Sin embargo, 39 de los 51 aislados (76.47%), presentaron al menos dos locus (PI-1, PI-2a, o PI-2b) simultáneamente en el genoma. Las combinaciones presentaron las siguientes prevalencias; PI-1 + PI-2a, 56.86% (29 de 51), PI-1 + PI-2b, 15.68% (8 de 51) y la triple aparición, PI-2a + PI-2a + PI-2b, con un 3.92% (2 de 51).

Estos resultados coinciden con los reportados en la literatura, donde se menciona que, la mayoría de los aislados, presentan al menos dos locus simultáneamente en el genoma (Rosini et al., 2006b). Un estudio realizado por Martins y colaboradores, encontró las siguientes prevalencias con respecto a la presencia de cada factor en 898 aislados analizados; PI-1 presente en 624 aislados (70%), PI-2a en 707 (79%) y PI-2b en 191 (21%). La presencia determinada de un factor en combinación y en solitario de mayor a menor fue de; PI-1 + PI-2a en 440 aislados (49%), PI-2a solo en 294 aislados (30%), PI-1 + PI-2b en 189 (21%) y PI-2b solo en 5 (0.6%). Los resultados encontrados en ese estudio, les permitió considerar este factor como blanco objetivo para el desarrollo de una vacuna (E Martins et al., 2013). Resultados similares, fueron encontrados por McGee y colaboradores. Los tipos de pilis identificados con mayor frecuencia, fue la combinación de PI-1 + PI-2a (58,3 %), seguido de PI-2a solo (30,8 %), PI-1 + PI -2b (7,4 %), PI-2b (3,2 %) y PI-1 (0,3 %) en una población de 6340 aislados (McGee et al., 2021). Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en nuestra investigación.

Analizando la presencia de la isla de Pili PI-2b, tanto en solitario como en combinación, observamos que de los 18 aislados en los que se encontró, correspondientes al 35.29% del total de los aislados, en el 94% de los casos (17 de 18), los serotipos corresponden al serotipo III o IV. Estos resultados podrían indicar una relación directa entre la presencia de este factor y la virulencia del serotipo, pues se ha observado, que el serotipo III, es el que mayor número de casos de complicaciones clínicas ha presentado y el serotipo IV,



puede ser una seroconversión del tipo III por presión selectiva, como se ha mencionado anteriormente.

En el 3.92% de los casos encontrados (2 aislados) se encontró una presencia de los 3 locus dentro de un mismo aislado. Esto difiere totalmente con la literatura consultada, pues no existen reportes al momento de la presencia de más de 2 islas de Pili en un solo aislado (Alvim et al., 2019; E. Lin et al., 2021; Otaguiri et al., 2013). Es importante aclarar que estos dos aislados mencionados, son aquellos que presentan dos serotipos distintos (combinación II/III y II/IV). Se ha observado que los serotipos II presentan predominantemente las islas de pili PI-1 + PI-2a, mientras que los serotipos III y IV, presentan en su mayoría la isla PI-2b, por lo que, una presencia doble, provocada por una deficiente purificación de los aislados, podría alterar negativamente los resultados. Sin embargo, si la presencia de una presencia de doble serotipo aunada a una triple presencia de las tres islas de pili, se confirma, podríamos contar con un hecho sin precedentes en el estudio epidemiológico de *Streptococcus agalactiae*.

El factor *dltA-D*, que pertenece a un operón que comprende cuatro genes (*dltA*, *dltB*, *dltC* y *dltD*), se ha asociado con la biogénesis de la pared celular y se encuentra presente en todos los genomas de bacterias de bajo porcentaje de GC determinados hasta ahora (C. Guo et al., 2014). Esta afirmación coincide con nuestros resultados al estar presente en el 100% de los aislados analizados.

Relacionado de igual manera a la resistencia, *ponA*, es un factor que codifica una proteína extra-citoplasmática de unión a penicilina (PBP1a), un rasgo de virulencia recientemente identificado para EGB que promueve la resistencia a la destrucción fagocítica independiente del polisacárido capsular (Jones et al., 2003). Este factor ha sido identificado en el 100% de los aislados, resultado que coincide con los encontrados por Jiang y colaboradores al reportar una presencia del 100% en todos los aislados analizados (H. Jiang et al., 2016). En este estudio se analizaron un total de 87 aislados proveniente de adultos mayores no embarazados.

El factor de virulencia *CylE*, que codifica para la  $\beta$ -H/C, una toxina pluripotente asociada a superficie que promueve la invasión de EGB a través de barreras celulares de células, fue encontrado en la totalidad de los aislados analizados. Esto coincide con lo reportado

por la literatura, ya que, como se menciona Armistead y colaboradores, la presencia y expresión del operón *cyl* es necesaria para la hemólisis y pigmentación, siendo la actividad hemolítica, un factor clave en la colonización y patogénesis de EGB (Armistead et al., 2020). Un estudio realizado por Guo y colaboradores encontró una prevalencia del 100% en un total de 91 aislados analizados (H. Guo et al., 2019). Estos resultados, coinciden con los encontrados en nuestro estudio. Interesantemente, existen reportes, en muestras de EGB de origen bovino (56 aislados totales) y de Tilapia (124 aislados totales), que muestran la misma prevalencia reportada en aislados de humano (Hernandez et al., 2021; Kannika et al., 2017), lo que sugiere una prevalencia absoluta, independientemente del origen del aislado.

El factor *cfb*, principal gen codificante para el factor CAMP, considerado como “universal” en las cepas de EGB, se usa generalmente para distinguir EGB de otro tipo de estreptococos, ya que, teóricamente, se encuentra en todos los aislados de EGB y se puede identificar mediante un ensayo de PCR (Ke et al., 2000). Este factor fue encontrado en el 100% de los aislados analizados en nuestro estudio. De manera similar, un estudio realizado por Abbas, mostró una prevalencia del 97.8% (45 de 46 aislados totales), para este factor, sin embargo, comenta que el sistema de detección utilizado (PCR), tiene muchos factores que podrían afectar el resultado, como la extracción óptima y la cantidad y pureza de ADN, haciendo referencia al aislado presentado como negativo a la presencia del gen *cfb* (Abbas, 2020).

No obstante, un estudio realizado por Cheng y colaboradores, reportó una prevalencia del 91.7% en un total 72 aislados analizados (Z. Cheng et al., 2020). Al observar resultados similares, Tickler y colaboradores, decidieron realizar secuenciación de genoma completo de 15 aislados específicamente seleccionados y descubrieron cuatro tipos de deleciones cromosómicas, que van desde 181 pb a los 49 kb. Algunas de las deleciones observadas fueron lo suficientemente grandes como para incluir el gen *cfb* completo, lo que resultó en aislados de EGB negativos para CAMP por pruebas microbiológicas y de detección molecular estándares (Tickler et al., 2018). Grandes eventos de recombinación, impulsados por presiones selectivas, se han descrito como importantes impulsores evolutivos de la diversidad de EGB (Cunha et al., 2015).

Debido a los resultados encontrados por distintos estudios, se ha observado que una limitación de las pruebas de diagnóstico molecular es la falla en la detección de los organismos objetivo debido a cambios o deleciones de nucleótidos en las regiones de unión del primer o la sonda (Yang & Rothman, 2004).

Los genes de resistencia a antibióticos encontrados se dividieron en dos grupos principales; la búsqueda de genes perfectos, que sirve para vigilancia clínica por su precisión con una identidad del 100%; y la búsqueda de genes estrictos, que permite detectar mutaciones que generen variaciones funcionales.

El gen *mreA*, resistente a macrólidos y clindamicina por eflujo activo que codifica una proteína con actividad de flavoquinasa y es responsable de una resistencia de amplio espectro a una variedad de compuestos, se ha demostrado que está presente en todos los aislados de EGB (Clarebout et al., 2001). De manera coincidente, este factor se presentó en el 100% de los aislados analizados en nuestro estudio con una identidad perfecta, confirmando que se encuentra en todos los aislados de EGB.

La resistencia de alto nivel a la gentamicina (HLGR, por sus siglas en inglés), presentada por el factor de virulencia AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia, se encuentra comúnmente en *Enterococcus spp.*, sin embargo, en EGB, se ha reportado de manera mucho menos frecuente (Buu-Hoi et al., 1990; Liddy & Holliman, 2002). El bajo número de reportes puede verse influido a que los diagnósticos de laboratorio no suelen hacer exámenes rutinarios de detección para este gen y, por ende, su prevalencia y mecanismo de acción son poco conocidos. En nuestro estudio, encontramos una prevalencia del 15.68% (8 de 51 totales), con identidad perfecta, datos contrastantes con los obtenidos por Sendi y colaboradores, donde encontraron una prevalencia del 0.17% en un análisis con 1,128 aislados totales (Sendi et al., 2016). Estos resultados, denotan una creciente resistencia a antibióticos en los últimos 10 años.

El factor APH(3')-IIIa, un gen de resistencia de alto nivel a aminoglicósidos y el gen *IsaE*, que codifica para la resistencia a pleuromutilina, un antibiótico que inhibe la síntesis de proteínas en las bacterias al unirse al componente de peptidil transferasa de la subunidad 50S de los ribosomas (Maffioli, 2013), se encontraron de manera perfecta con una prevalencia del 1.96%, es decir, solo un aislado. APH(3')-IIIa, ha sido reportado con una

prevalencia del 0.98%, 2 de 218 aislados analizados (Elisabete Martins et al., 2017), mientras que el factor IsaE, solo ha sido reportado, acorde a nuestra búsqueda, en *Streptococcus suis* (Bamphensin et al., 2021).

Los factores de resistencia con identidad perfecta se presentaron con la siguiente prevalencia: mprF 98.04%, tetM 60.78%, Tet (W/N/M) 3.92%, mefA 3.92%, tet (45) 3.92%, qacJ 1.96%, SAT-4 1.96% y ErmB 1.96%. Un estudio realizado por Zhou y colaboradores, reportó que, de un total de 238 aislados analizados, el 100% fueron susceptibles a la ampicilina y la penicilina, mientras se determinó un aumento considerable en la prevalencia de varios genes de resistencia, como mprF con un 100% y tetM, con un 71% en los genomas de EGB (Zhou et al., 2022), resultados coincidentes con los encontrados en nuestra investigación. Por otro lado, un estudio realizado por Nabavinia y colaboradores, encontró una prevalencia de tetM 93% y mefA 0% (Nabavinia et al., 2020), prevalencias que difiere con nuestros resultados. Uno de los principales probables factores para esta diferencia es el lugar geográfico en el cual fueron realizados los análisis.

Con respecto a los factores de resistencia qacJ, SAT-4 y ErmB, encontrados con identidad estricta en el aislado 48, han sido reportados comúnmente en cepas de *Staphylococcus spp.* y *Enterococcus spp.* (Correa et al., 2008; Ignak et al., 2017) y recientemente, se les ha relacionado con la cepa CC12 de *Streptococcus agalactiae*, causante de una infección del torrente sanguíneo con una mortalidad significativamente mayor a las cepas NO-CC12 (J. Liu et al., 2021). A nuestro conocimiento, el gen qacJ, no ha sido reportado de cepas humanas por ningún estudio publicado al momento. Es importante destacar que el aislado 48, serotipo III, presentó 9 de los 12 factores de resistencia analizados, mostrando un panorama, preocupante con el creciente aumento en casos de cepas multidrogresistente.

## 9. CONCLUSIONES

- De acuerdo al análisis del locus CPS en los 51 aislados, el serotipo II fue el mayormente identificado con una prevalencia de 27.45%. La distribución de serotipos fue de la siguiente manera: Ia, 9 (17.64%); Ib, 2 (3.92%); II, 14 (27.45%); III, 7 (13.72%); IV, 10 (19.60); V, 5 (9.80%); No Tipificable, 1 (1.96%) y doble serotipo, 3 (5.88%). No se identificaron los serotipos VI, VII, VIII y IX.
- Los factores de virulencia, sodA, cspA, lmb, dltA-D, ponA, CylE y cfb fueron encontrados en la totalidad de los aislados. El resto de los factores se distribuyeron de la siguiente manera: ScpB, 98.03% de los casos; FbsA 90.19%; PI-1 76.47%; bca 72.54%; srr-1 70.58%; PI-2a 68.62%; FbsB 54.90%; HvgA 39.21%; srr-2 37.25%; PI-2b 35.29% y bibA 35.29%.
- A los aislados 3 y 15 se les identificó por análisis de secuencia doble serotipo y se encontraron todos de los factores de virulencia.
- Los aislados que se identificaron con serotipo III y IV fueron los que presentaron la mayor cantidad (83.3%) de los factores de virulencia.
- Con respecto a la identificación de genes de resistencia a antibióticos, el 100% de los aislados presentó el gen mreA, mientras que, el gen mprF estuvo presente en 98%.
- Un aislado (No. 48) presentó los genes de resistencia IsaE, qacJ, SAT-4 y ErmB, cuyos reportes en aislados *S. agalactiae* de seres humanos son escasos, pero son comúnmente encontrados en aislados de animales.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, H. H. (2020). Screening of group b streptococcus agalactiae virulence factors (SCPB, SIP, CFB) in Iraqi pregnant women. *Plant Archives*, 20, 282–287.
- Afshar, B., Broughton, K., Creti, R., Decheva, A., Hufnagel, M., Kriz, P., Lambertsen, L., Lovgren, M., Melin, P., Orefici, G., Poyart, C., Radtke, A., Rodriguez-Granger, J., Sørensen, U. B. S., Telford, J., Valinsky, L., & Zachariadou, L. (2011). International external quality assurance for laboratory identification and typing of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci). *Journal of Clinical Microbiology*, 49(4), 1475–1482. <https://doi.org/10.1128/JCM.02365-10>
- Ali Hamad, A., Farrag, A. A., El-Waseif, A. A., & Obaid Gattia Alkawla, S. (2021). Novel molecular diagnosis of Cyl E, Spb 1 and bib A virulence genes of *Streptococcus agalactiae* from pregnant women. *Materials Today: Proceedings*, xxxx, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.06.347>
- Alos, J., Andreu, A., Arribas, L., Cabero, L., De Cueto, M., López, J., Melchor, J., Puertas, A., De la Rosa, M., Salcedo, S., Sánchez, M., Sánchez, M., & Torrejon, R. (2013). Prevención de la infección perinatal por estreptococo del grupo B. Recomendaciones españolas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(3), 159–172.
- Alvim, D. C. S. S., Ferreira, A. F. M., Leal, M. A., Oliveira, L. M. A., Botelho, A. M. N., Botelho, A. C. N., Figueiredo, A. M. S., Fracalanza, S. E. L., Teixeira, L. M., & Pinto, T. C. A. (2019). Biofilm production and distribution of pilus variants among *Streptococcus agalactiae* isolated from human and animal sources. *Biofouling*, 35(8), 938–944. <https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1678592>
- Ardanuy, C., Tubau, F., & Lin, J. (2005). Distribution of Subclasses mefA and mefE of the mefA Gene among Clinical Isolates of Macrolide-Resistant ( M-Phenotype ) *Streptococcus pneumoniae* , Viridans Group Streptococci , and *Streptococcus pyogenes*. *American Society of Microbiology*, 49(2), 827–829. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.827>
- Areej Alhazmi. (2018). *Molecular Characterization of Streptococcus agalactiae Isolates from Human Cases of Invasive Disease Collected in Alberta, Canada: 2003-2013*. University of Alberta.

- Armistead, B., Whidbey, C., Iyer, L. M., Herrero-Foncubierta, P., Quach, P., Haidour, A., Aravind, L., Cuerva, J. M., Jaspan, H. B., & Rajagopal, L. (2020). The *cyl* Genes Reveal the Biosynthetic and Evolutionary Origins of the Group B Streptococcus Hemolytic Lipid, Granadaene. *Frontiers in Microbiology*, *10*(January), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03123>
- Baker, C., & Kasper, D. L. (1976). Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. *New England Journal of Medicine*, *294*(14), 753–756.
- Bamphensin, N., Chopjitt, P., Hatrongjit, R., Boueroy, P., Fittipaldi, N., Gottschalk, M., & Kerdsin, A. (2021). Non-penicillin-susceptible streptococcus suis isolated from humans. *Pathogens*, *10*(9). <https://doi.org/10.3390/pathogens10091178>
- Baron, M. J., Bolduc, G. R., Goldberg, M. B., Aupérin, T. C., & Madoff, L. C. (2004). Alpha C protein of group B Streptococcus binds host cell surface glycosaminoglycan and enters cells by an actin-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(23), 24714–24723. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402164200>
- Beigverdi, R., Jabalameli, F., Mirsalehian, A., Hantoushzadeh, S., Boroumandi, S., Taherikalani, M., & Emaneini, M. (2014). Virulence factors, antimicrobial susceptibility and molecular characterization of Streptococcus agalactiae isolated from pregnant women. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, *61*(4), 425–434.
- Belard, S., Toepfner, N., Capan-melser, M., Mombo-, G., Zoleko-manego, R., Groger, M., Matsiegui, P., Agnandji, S. T., Adegnika, A. A., González, R., Kremsner, P. G., Menendez, C., Ramharter, M., & Berner, R. (2015). Streptococcus agalactiae Serotype Distribution and Antimicrobial Susceptibility in Pregnant Women in Gabon , Central Africa. *Nature Publishing Group, September*, 8–11. <https://doi.org/10.1038/srep17281>
- Bobadilla, F. J., Novosak, M. G., Cortese, I. J., Delgado, O. D., & Laczeski, M. E. (2021). Prevalence, serotypes and virulence genes of Streptococcus agalactiae isolated from pregnant women with 35–37 weeks of gestation. *BMC Infectious Diseases*, *21*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05603-5>

- Bolduc, G. R., Baron, M. J., Gravekamp, C., Lachenauer, C. S., & Madoff, L. C. (2002). The alpha C protein mediates internalization of group B Streptococcus within human cervical epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 4(11), 751–758. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00227.x>
- Bryan, J. D., & Shelver, D. W. (2009). Streptococcus agalactiae CspA Is a Serine Protease That Inactivates Chemokines. *Journal of Bacteriology*, 191(6), 1847–1854. <https://doi.org/10.1128/JB.01124-08>
- Buu-Hoi, A., Le Bouguenec, C., & Horaud, T. (1990). High-level chromosomal gentamicin resistance in Streptococcus agalactiae (Group B). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(6), 985–988. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.6.985>
- Buurman, E. T., Timofeyeva, Y., Gu, J., Kim, J., Kodali, S., Liu, Y., Mininni, T., Moghazeh, S., Pavliakova, D., Singer, C., Singh, S., Handke, L. D., Lotvin, J., Prasad, A. K., Scully, I. L., Donald, R. G. K., Jansen, K. U., & Anderson, A. S. (2019). A Novel Hexavalent Capsular Polysaccharide Conjugate Vaccine ( GBS6 ) for the Prevention of Neonatal Group B Streptococcal Infections by Maternal Immunization. *The Journal of Infectious Diseases*, 220, 105–115. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz062>
- Cheng, Q., Debol, S., Lam, H., Eby, R., Edwards, L., Matsuka, Y., Olmsted, S. B., & Cleary, P. P. (2002). Immunization with C5a Peptidase or Peptidase-Type III Polysaccharide Conjugate Vaccines Enhances Clearance of Group B Streptococci from Lungs of Infected Mice. *Infection and Immunity*, 70(11), 6409–6415. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.6409>
- Cheng, Q., Staflieni, D., Purushothaman, S. S., & Cleary, P. (2002). Erratum: The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasin (*Infection and Immunity* (2002) 70:5 (2408-2413)). *Infection and Immunity*, 70(6), 3309. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.5.2408-2413.2002>
- Cheng, Z., Qu, P., Ke, P., Yang, X., Zhou, Q., Lan, K., He, M., Cao, N., Qin, S., & Huang, X. (2020). Antibiotic Resistance and Molecular Epidemiological Characteristics of Streptococcus agalactiae Isolated from Pregnant Women in Guangzhou, South China. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1368942>



- Cieslewicz, M. J., Chaffin, D., Glusman, G., Kasper, D., Madan, A., Rodrigues, S., Fahey, J., Wessels, M. R., & Rubens, C. E. (2005). *Structural and Genetic Diversity of Group B Streptococcus Capsular Polysaccharides*. *73*(5), 3096–3103. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.5.3096>
- Clarebout, G., Villers, C., & Leclercq, R. (2001). Macrolide resistance gene *mreA* of *Streptococcus agalactiae* encodes a flavokinase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(8), 2280–2286. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.8.2280-2286.2001>
- Correa, J. E., De Paulis, A., Predari, S., Sordelli, D. O., & Jeric, P. E. (2008). First report of *qacG*, *qacH* and *qacJ* genes in *Staphylococcus haemolyticus* human clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *62*(5), 956–960. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn327>
- Cunha, V. Da, Davies, M. R., Douarre, P., & Rosinski, I. (2015). *Europe PMC Funders Group Streptococcus agalactiae clones infecting humans were selected and fixed through the extensive use of tetracycline*. *337549*, 1–23. <https://doi.org/10.1038/ncomms5544.Streptococcus>
- De Cueto, M., Sanchez, M. J., Sampedro, A., Miranda, J. A., Herruzo, A. J., & Rosa-Fraile, M. (1998). Timing of intrapartum ampicillin and prevention of vertical transmission of group B streptococcus. *Obstetrics and Gynecology*, *91*(1), 112–114. [https://doi.org/10.1016/S0029-7844\(97\)00587-5](https://doi.org/10.1016/S0029-7844(97)00587-5)
- Devi, A. S., & Ponnuraj, K. (2010). Cloning , expression , purification and ligand binding studies of novel fibrinogen-binding protein FbsB of *Streptococcus agalactiae*. *Protein Expression and Purification*, *74*(2), 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.07.004>
- Di Renzo, G. C., Melin, P., Berardi, A., Blennow, M., Carbonell-Estrany, X., Donzelli, G. P., Hakansson, S., Hod, M., Hughes, R., Kurtzer, M., Poyart, C., Shinwell, E., Stray-Pedersen, B., Wielgos, M., & El Helali, N. (2015). Intrapartum GBS screening and antibiotic prophylaxis: A European consensus conference. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, *28*(7), 766–782. <https://doi.org/10.3109/14767058.2014.934804>
- Diedrick, M. J., Flores, A. E., Hillier, S. L., Creti, R., & Ferrieri, P. (2010). Clonal

- analysis of colonizing group B Streptococcus, serotype IV, an emerging pathogen in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), 3100–3104.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00277-10>
- Doare, K. Le, & Heath, P. T. (2013). An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine*, 31, D7–D12. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.01.009>
- Dogan, B., Schukken, Y. H., Santisteban, C., & Boor, K. J. (2005). Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among Streptococcus agalactiae isolates from bovine and human hosts. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), 5899–5906. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.12.5899-5906.2005>
- Doran, K. S., Chang, J. C. W., Benoit, V. M., Eckmann, L., & Nizet, V. (2002). Group B streptococcal  $\beta$ -hemolysin/cytolysin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of interleukin-8. *Journal of Infectious Diseases*, 185(2), 196–203. <https://doi.org/10.1086/338475>
- Doran, K. S., Liu, G. Y., & Nizet, V. (2003). Group B streptococcal  $\beta$ -hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis. *Journal of Clinical Investigation*, 112(5), 736–744. <https://doi.org/10.1172/JCI200317335>
- Dramsi, S., Caliot, E., Bonne, I., Guadagnini, S., Prévost, M., Kojadinovic, M., Lalioui, L., Poyart, C., & Trieu-cuot, P. (2006). Assembly and role of pili in group B streptococci. *Molecular Microbiology*, 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05190.x>
- Eberly, M. D., & Rajnik, M. (2015). The Effect of Universal Maternal Screening on the Incidence of Neonatal Early-Onset Group B Streptococcal Disease. *Clinical Pediatrics*, 48(4), 369–375.
- Edmond, K. M., Kortsalioudaki, C., Scott, S., Schrag, S. J., Zaidi, A. K. M., Cousens, S., & Heath, P. T. (2012). Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months : systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, 379(9815), 547–556. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61651-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61651-6)
- Edmond, T., Malick, Z. F., Yehouenou, L. C., & Bankolé, H. S. (2017). Bacterial Distribution and Antibiotic Susceptibility Pattern of group B Streptococcus  $\beta$  hemolytic ( GBS ) in Vagin ... Bacterial Distribution and Antibiotic Susceptibility

- Pattern of group B Streptococcus  $\beta$  hemolytic ( GBS ) in Vaginal Infections at Coton. *American Journal of Infectious Diseases and Microbiology*, 5(3), 109–114.  
<https://doi.org/10.12691/ajidm-5-3-3>
- Edwards, M. S., & Baker., C. J. (2001). *Group B streptococcal infections* (T. W. B. S. Co. (ed.)).
- Ekelund, K., Slotved, H. C., Nielsen, H. U., Kaltoft, M. S., & Konradsen, H. B. (2003). Emergence of invasive serotype VIII group B streptococcal infections in Denmark. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4442–4444.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4442-4444.2003>
- Eskandarian, N., Ismail, Z., Neela, V., van Belkum, A., Desa, M. N. M., & Amin Nordin, S. (2015). Antimicrobial susceptibility profiles, serotype distribution and virulence determinants among invasive, non-invasive and colonizing Streptococcus agalactiae (group B streptococcus) from Malaysian patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34(3), 579–584.  
<https://doi.org/10.1007/s10096-014-2265-x>
- Farley, M. (2001). Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clinical Infectious Diseases*, 33(4), 556–561. <https://doi.org/10.1086/322696>
- Farley, M. M. (2001). Group B Streptococcal Disease in Nonpregnant Adults. *Emerging Infections*, 33.
- Figuroa, J. R., Ortiz, F., Esteves, A., & Casanova, G. (2007). Colonización materna por Streptococcus del grupo B en México: estimación de la prevalencia basada en la revisión bibliográfica. *Ginecología Obstetricia*, 75(7), 399–403.
- Fischetti, V. A., Novick, R. P., Ferretti, J. J., Portnoy, D. A., & Rood, J. J. (2000). *Gram-positive pathogens* (J. J. Fischetti, V. A.; Novick, R. P.; Ferretti, J. J.; Portnoy, D. A.; Rood (ed.)). ASM Press, American Society for Microbiology.  
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20013038301>
- Florindo, C., Damiao, V., Silvestre, I., Farinha, C., Rodrigues, F., Nogueira, F., Martins-Pereira, F., Castro, R., Borrego, M. J., Santos-Sanches, I., & Group for the Prevention of Neonatal GBS Infection. (2014). Epidemiological surveillance of colonising group B Streptococcus epidemiology in the Lisbon and Tagus Valley regions, Portugal (2005 to 2012): emergence of a new epidemic type IV/clonal

- complex 17 clone. *Euro Surveillance : Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 19(23), 10–13.  
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.23.20825>
- Forquin, M. P., Tazi, A., Rosa-Fraile, M., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., & Dramsi, S. (2007). The putative glycosyltransferase-encoding gene *cylJ* and the group B streptococcus (GBS)-specific gene *cylK* modulate hemolysin production and virulence of GBS. *Infection and Immunity*, 75(4), 2063–2066.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.01565-06>
- Franken, C., Haase, G., Brandt, C., Podbielski, A., Martin, S., La, C., & Lu, R. (2001). Horizontal gene transfer and host specificity of beta- haemolytic streptococci : the role of a putative composite transposon containing *scpB* and *lmb*. *Molecular Microbiology*, 41(4), 925–935.
- Gajic, I., Plainvert, C., Kekic, D., Dmytruk, N., Mijac, V., Tazi, A., Glaser, P., Ranin, L., Poyart, C., & Opavski, N. (2019). Molecular epidemiology of invasive and non-invasive group B Streptococcus circulating in Serbia. *International Journal of Medical Microbiology*, 309(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.10.005>
- Gherardi, G., Imperi, M., Baldassarri, L., Pataracchia, M., Alfarone, G., Recchia, S., Orefici, G., Dicuonzo, G., & Creti, R. (2007). Molecular epidemiology and distribution of serotypes, surface proteins, and antibiotic resistance among group B streptococci in Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2909–2916.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00999-07>
- Granlund, M., Michel, F., & Norgren, M. (2001). Mutually Exclusive Distribution of IS 1548 and GBSi1 , an Active Group II Intron Identified in Human Isolates of Group B Streptococci. *Journal of Bacteriology*, 183(8), 2560–2569.  
<https://doi.org/10.1128/JB.183.8.2560>
- Graux, E., Hites, M., Martiny, D., Maillart, E., Delforge, M., Melin, P., & Bauby, N. (2020). Invasive group B Streptococcus among non-pregnant adults in Brussels-Capital Region , 2005 – 2019. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*.
- Guo, C., Chen, R., Kalhor, D., Wang, Z., Liu, G., Lu, C., & Liu, Y. (2014). Identification of genes preferentially expressed by highly virulent piscine

- Streptococcus agalactiae upon interaction with macrophages. *PLoS ONE*, 9(2).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087980>
- Guo, H., Fu, M., Peng, Q., Chen, Z., Liu, J., Qiu, Y., & Huang, Y. (2019). Antimicrobial resistance and molecular characterization of Streptococcus agalactiae from pregnant women in southern China. *Journal of Infection in Developing Countries*, 13(9), 802–809. <https://doi.org/10.3855/jidc.11395>
- Gutekunst, H., Eikmanns, B. J., & Reinscheid, D. J. (2003). Analysis of RogB-Controlled Virulence Mechanisms and Gene Expression in Streptococcus agalactiae. *Infection and Immunity*, 71(9), 5056–5064.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.5056>
- Gutekunst, H., Eikmanns, B. J., & Reinscheid, D. J. (2004). The Novel Fibrinogen-Binding Protein FbsB Promotes Streptococcus agalactiae Invasion into Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 72(6), 3495–3504.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.72.6.3495>
- Hardie, J. M., & Whiley, R. A. (1995). *The genus Streptococcus*.
- Harris, T. O., Bohnsack, J. F., Rubens, C. E., Harris, T. O., Shelver, D. W., Bohnsack, J. F., & Rubens, C. E. (2003). A novel streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen. Find the latest version: A novel streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cl. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(1), 61–70. <https://doi.org/10.1172/JCI200316270>. Introduction
- Hensler, M. E., Quach, D., Hsieh, C. J., Doran, K. S., & Nizet, V. (2008). CAMP factor is not essential for systemic virulence of Group B Streptococcus. *Microbial Pathogenesis*, 44(1), 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.08.005>
- Herbert, M. A., Beveridge, C. J., & Saunders, N. J. (2004). Bacterial virulence factors in neonatal sepsis: group B streptococcus. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 17(3), 225–229.
- Hernandez, L., Bottini, E., Cadona, J., Cacciato, C., Monteavaro, C., Bustamante, A., & Sanso, A. M. (2021). Multidrug Resistance and Molecular Characterization of Streptococcus agalactiae Isolates From Dairy Cattle With Mastitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(April), 1–9.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.647324>

- Hickman, M. E., Rench, M. A., Ferrieri, P., & Baker, C. J. (1999). Changing epidemiology of group B streptococcal colonization. *Pediatrics*, *104*(2 I), 203–209. <https://doi.org/10.1542/peds.104.2.203>
- Huptas, C., Scherer, S., & Wenning, M. (2016). Optimized Illumina PCR-free library preparation for bacterial whole genome sequencing and analysis of factors influencing de novo assembly. *BMC Research Notes*, *9*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2072-9>
- Ignak, S., Nakipoglu, Y., & Gurler, B. (2017). Frequency of antiseptic resistance genes in clinical staphylococci and enterococci isolates in Turkey. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, *6*(1), 66–68. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0244-6>
- Jacobsson, K. (2003). A novel family of fibrinogen-binding proteins in *Streptococcus agalactiae*. *Veterinary Microbiology*, *96*, 103–113. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00206-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00206-2)
- Jarva, H., Hellwage, J., Jokiranta, T. S., Markus, J., Zipfel, P. F., & Meri, S. (2004). The Group B Streptococcal  $\beta$  and Pneumococcal Hic Proteins Are Structurally Related Immune Evasion Molecules That Bind the Complement Inhibitor Factor H in an Analogous Fashion. *The Journal of Immunology*, *172*(5), 3111–3118. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.3111>
- Jiang, H., Chen, M., Li, T., Liu, H., Gong, Y., & Li, M. (2016). Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* causing community- and hospital-acquired infections in Shanghai, China. *Frontiers in Microbiology*, *7*(AUG), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01308>
- Jiang, S. M., Cieslewicz, M. J., Kasper, D. L., & Wessels, M. R. (2005). Regulation of virulence by a two-component system in group B *Streptococcus*. *Journal of Bacteriology*, *187*(3), 1105–1113. <https://doi.org/10.1128/JB.187.3.1105-1113.2005>
- Jing, L. I., Kasper, D. L., Ausubel, F. M., Rosner, B., & Michel, J. L. (1997). Inactivation of the  $\alpha$  C protein antigen gene, bca, by a novel shuttle/suicide vector results in attenuation of virulence and immunity in group B *Streptococcus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

- 94(24), 13251–13256. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13251>
- Jones, A. L., Needham, R. H. V., Clancy, A., Knoll, K. M., & Rubens, C. E. (2003). Penicillin-binding proteins in streptococcus agalactiae: A novel mechanism for evasion of immune clearance. *Molecular Microbiology*, 47(1), 247–256. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03297.x>
- Jurgens, B. Y. D., Sterzik, B., & Fehrenbach, F. J. (1987). Unspecific binding of group B Streptococcal Cocytolysin (CAMP Factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity. *Journal of Experimental Medicine*, 165(March), 720–732.
- Kannika, K., Pisuttharachai, D., Srisapoome, P., Wongtavatchai, J., Kondo, H., Hirono, I., Unajak, S., & Areechon, N. (2017). Molecular serotyping, virulence gene profiling and pathogenicity of Streptococcus agalactiae isolated from tilapia farms in Thailand by multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 122(6), 1497–1507. <https://doi.org/10.1111/jam.13447>
- Kapatai, G., Patel, D., Efstratiou, A., & Chalker, V. J. (2017). Comparison of molecular serotyping approaches of Streptococcus agalactiae from genomic sequences. *BMC Genomics*, 18(429), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3820-5>
- Ke, D., Ménard, C., Picard, F. J., Boissinot, M., Ouellette, M., Roy, P. H., & Bergeron, M. G. (2000). Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci. *Clinical Chemistry*, 46(3), 324–331. <https://doi.org/10.1093/clinchem/46.3.324>
- Kong, F., Gowan, S., Martin, D., James, G., & Gilbert, G. L. (2002). Molecular profiles of group B streptococcal surface protein antigen genes: Relationship to molecular serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 620–626. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.2.620-626.2002>
- Kong, F., Lambertsen, L. M., Slotved, H., Ko, D., Wang, H., & Gilbert, G. L. (2008). Use of Phenotypic and Molecular Serotype Identification Methods To Characterize Previously Nonserotypeable Group B Streptococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(8), 2745–2750. <https://doi.org/10.1128/JCM.00189-08>
- Kothari, N. J., Morin, C. A., Glennen, A., Jackson, D., Harper, J., Schrag, S. J., & Lynfield, R. (2009). Invasive Group B Streptococcal Disease in the Elderly, Minnesota, USA, 2003–2007. *Emerging Infectious Diseases*, 15(8), 1279–1281.

<https://doi.org/10.3201/eid1508.081381>

- Laczeski, M., Novosak, M., Quiroga, M., & Vergara, M. (2014). Primer estudio molecular de *Streptococcus agalactiae* serotipo V en Misiones , Argentina. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, *34*(4), 132–139.
- Lalioui, L., Pellegrini, E., Dramsi, S., Baptista, M., Bourgeois, N., Doucet-populaire, F., Rusniok, C., Zouine, M., Glaser, P., Kunst, F., Poyart, C., & Trieu-cuot, P. (2005). The SrtA Sortase of *Streptococcus agalactiae* Is Required for Cell Wall Anchoring of Proteins Containing the LPXTG Motif , for Adhesion to Epithelial Cells , and for Colonization of the Mouse Intestine. *Infection and Immunity*, *73*(6), 3342–3350. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3342>
- Lamy, M. C., Zouine, M., Fert, J., Vergassola, M., Couve, E., Pellegrini, E., Glaser, P., Kunst, F., Msadek, T., Trieu-Cuot, P., & Poyart, C. (2004). CovS/CovR of group B streptococcus: A two-component global regulatory system involved in virulence. *Molecular Microbiology*, *54*(5), 1250–1268. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04365.x>
- Lan, R., & Reeves, P. R. (2000). Intraspecies variation in bacterial genomes: The need for a species genome concept. *Trends in Microbiology*, *8*(9), 396–401. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01791-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01791-1)
- Lang, S., & Palmer, M. (2003). Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a pore-forming toxin. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(40), 38167–38173. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303544200>
- Liddy, H., & Holliman, R. (2002). Group B *Streptococcus* highly resistant to gentamicin [3]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *50*(1), 142–143. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf090>
- Lin, E., Zou, S., Wang, Y., Lee, C. C., Chiu, C. H., & Feng, Y. (2021). Phylogeny, recombination, and invasiveness of group B *Streptococcus* revealed by genomic comparisons of its global strains. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *40*(3), 581–590. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-04067-4>
- Lin, S., Jang, A., Zhi, Y., Gao, S., Lim, S., Lim, J. H., Song, J. Y., & Sullam, P. M. (2018). Vaccination With a Latch Peptide Provides Serotype- Independent Protection Against Group B *Streptococcus* Infection in Mice. *The Journal of*



- Infectious Diseases*, 217(1), 93–102. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix565>
- Lin, S. M., Zhi, Y., Ahn, K. B., & Lim, S. (2018). Status of group B streptococcal vaccine development. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 7(1), 76–81.
- Lindahl, G., Sta, M., & Areschoug, T. (2005). Surface Proteins of Streptococcus agalactiae and Related Proteins in Other Bacterial Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(1), 102–127. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.1.102>
- Liu, G. Y., Doran, K. S., Lawrence, T., Turkson, N., Puliti, M., Tissi, L., & Nizet, V. (2004). Sword and shield: Linked group B streptococcal  $\beta$ -hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(40), 14491–14496. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406143101>
- Liu, J., Chen, F., Guan, H., Yu, J., Yu, J., Zhao, J., Liu, Y., & Shen, L. (2021). Emerging Fatal Ib/CC12 Hypervirulent Multiresistant Streptococcus agalactiae in Young Infants With Bloodstream Infection in China. *Frontiers in Microbiology*, 12(December). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.767803>
- Madoff, L. C., Michel, J. L., Gong, E. W., Kling, D. E., & Kasper, D. L. (1996). Group B streptococci escape host immunity by deletion of tandem repeat elements of the alpha C protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(9), 4131–4136. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.9.4131>
- Maffioli, S. I. (2013). A Chemist's Survey of Different Antibiotic Classes. *Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance*, 1–22. <https://doi.org/10.1002/9783527659685.ch1>
- Maisey, H. C., Quach, D., Hensler, M. E., Liu, G. Y., Gallo, R. L., Nizet, V., & Doran, K. S. (2008). A group B streptococcal pilus protein promotes phagocyte resistance and systemic virulence. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(6), 1715–1724. <https://doi.org/10.1096/fj.07-093963>
- Martins, E. R., Andreu, A., & Ramirez, M. (2013). Distribution of Pilus Islands in Streptococcus agalactiae That Cause Human Infections : Insights into Evolution and Implication for. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(2), 313–316. <https://doi.org/10.1128/CVI.00529-12>
- Martins, E., Andreu, A., Melo-Cristino, J., & Ramirez, M. (2013). Distribution of pilus

- islands in *Streptococcus agalactiae* that cause human infections: Insights into evolution and implication for vaccine development. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(2), 313–316. <https://doi.org/10.1128/CVI.00529-12>
- Martins, Elisabete, Pedroso-Roussado, C., Melo-Cristino, J., Ramirez, M., Oliveira, H., Vaz, T., Gião, M., Ferreira, R., Silva, A. C., Costa, H., Silva, M. F., Afonso, M. A., Domingos, A., Marrão, G., Grossinho, J., Lopes, P., Felício, L., Lameirão, A., Mota Vieira, A. P., ... Paixão, P. (2017). *Streptococcus agalactiae* causing neonatal infections in Portugal (2005-2015): Diversification and emergence of a CC17/PI-2b multidrug resistant sublineage. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00499>
- McGavin, M., Duncan, C., Low, D. E., & McGeer, A. (2001). Prevalence and Mechanisms of Macrolide Resistance in Invasive and Noninvasive Group B *Streptococcus* Isolates from Ontario , Canada. *American Society of Microbiology*, 45(12), 3504–3508. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3504>
- McGee, L., Chochua, S., Li, Z., Mathis, S., Rivers, J., Metcalf, B., Ryan, A., Alden, N., Farley, M. M., Harrison, L. H., Snippes Vagnone, P., Lynfield, R., Smelser, C., Muse, A., Thomas, A. R., Schrag, S., & Beall, B. W. (2021). Multistate, Population-Based Distributions of Candidate Vaccine Targets, Clonal Complexes, and Resistance Features of Invasive Group B *Streptococci* within the United States, 2015-2017. *Clinical Infectious Diseases*, 72(6), 1004–1013. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa151>
- Mohamed, S., Abdelsalam, H., Ahmed, M., & Ibrahim, Y. (2018). Group B streptococcal carriage , antimicrobial susceptibility , and virulence related genes among pregnant women in Alexandria , Egypt. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(1), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.01.003>
- Nabavinia, M., Khalili, M. B., Sadeh, M., Eslami, G., Vakili, M., Azartoos, N., & Mojibiyani, M. (2020). Distribution of pilus island and antibiotic resistance genes in *streptococcus agalactiae* obtained from vagina of pregnant women in Yazd, Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 12(5), 411–416. <https://doi.org/10.18502/ijm.v12i5.4601>
- Nizet, V., & Rubens, C. E. (2000). Pathogenic mechanisms and virulence factors of

- group B streptococci. In *ASM Press*.
- Nobbs, A. H., Rosini, R., Rinaudo, C. D., Maione, D., Grandi, G., & Telford, J. L. (2008). Sortase A Utilizes an Ancillary Protein Anchor for Efficient Cell Wall Anchoring of Pili in *Streptococcus agalactiae*. *Infection and Immunity*, *76*(8), 3550–3560. <https://doi.org/10.1128/IAI.01613-07>
- Otaguiri, E. S., Morguette, A. E. B., Tavares, E. R., Dos Santos, P. M. C., Morey, A. T., Cardoso, J. D., Perugini, M. R. E., Yamauchi, L. M., & Yamada-Ogatta, S. F. (2013). Commensal *Streptococcus agalactiae* isolated from patients seen at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil: Capsular types, genotyping, antimicrobial susceptibility and virulence determinants. *BMC Microbiology*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-297>
- Palacios, G. C., González, M. N., Beltrán, M., & Arredondo, J. L. (2005). Serotypes of 286 group B streptococci isolated from asymptomatic carriers and invasive disease cases in Mexico. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, *47*(1–2), 21–24.
- Palacios, G., Eskew, E., Solorzano, F., & Mattingly, S. (1997). Decreased Capacity for Type-Specific-Antigen Synthesis Accounts for High Prevalence of Nontypeable Strains of Group B Streptococci In Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, *35*(11), 2923–2926.
- Palacios, G., Hernández, T., Rivera, L., Briones, E., Caballero, A., Vázquez, J., Amador, G., García, R., Solorzano, F., & Rodríguez, C. (2017). Infección perinatal por estreptococo del grupo B : panorama global , en América Latina y en México. *Gaceta Médica de México*, *153*, 361–370.
- Park, C., Nichols, M., & Schrag, S. J. (2014). Two Cases of Invasive Vancomycin-Resistant Group B Streptococcus Infection. *The New England Journal of Medicine*, *370*, 885–886. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1308504>
- Pezzicoli, A., Santi, I., Lauer, P., Rosini, R., Rinaudo, D., Grandi, G., & Telford, J. L. (2008). Pilus Backbone Contributes to Group B Streptococcus Paracellular Translocation through Epithelial Cells. *The Journal of Infectious Diseases*, *198*, 890–898. <https://doi.org/10.1086/591182>
- Phares, C. R., Lynfield, R., Farley, M. M., Mohle-Boetani, J., Harrison, L. H., Petit, S., Craig, A. S., Schaffner, W., Zansky, S. M., Gershman, K., Stefonek, K. R.,

- Albanese, B. A., Zell, E. R., Schuchat, A., & Schrag, S. J. (2008). Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 299(17), 2056–2065.  
<https://doi.org/10.1001/jama.299.17.2056>
- Pritzlaff, C. A., Chang, J. C. W., Kuo, S. P., Tamura, G. S., Rubens, C. E., & Nizet, V. (2001). Genetic basis for the  $\beta$ -haemolytic/cytolytic activity of group B streptococcus. *Molecular Microbiology*, 39(2), 236–248.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02211.x>
- Ragunathan, P., Sridaran, D., Weigel, A., Shabayek, S., Spellerberg, B., & Ponnuraj, K. (2013). Metal Binding Is Critical for the Folding and Function of Laminin Binding Protein , Lmb of Streptococcus agalactiae. *Plos One*, 8(6), e67517.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067517>
- Rajagopal, L. (2010). Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence. *Future Microbiol*, 4(2), 201–221.  
<https://doi.org/10.2217/17460913.4.2.201.Understanding>
- Ring, A., Braun, J. S., Pohl, J., Nizet, V., Stremmel, W., & Shenep, J. L. (2002). Group B streptococcal  $\beta$ -hemolysin induces mortality and liver injury in experimental sepsis. *Journal of Infectious Diseases*, 185(12), 1745–1753.  
<https://doi.org/10.1086/340818>
- Rosenau, A., Martins, K., Amor, S., Lanotte, P., Mee-marquet, N. Van Der, Mereghetti, L., & Quentin, R. (2007). Evaluation of the Ability of Streptococcus agalactiae Strains Isolated from Genital and Neonatal Specimens To Bind to Human Fibrinogen and Correlation with Characteristics of the fbsA and fbsB Genes □. *Infection and Immunity*, 75(3), 1310–1317. <https://doi.org/10.1128/IAI.00996-06>
- Rosini, R., Rinaudo, C. D., Soriani, M., Lauer, P., Mora, M., Maione, D., Taddei, A., Santi, I., Ghezzi, C., Brettoni, C., Buccato, S., Margarit, I., Grandi, G., & Telford, J. L. (2006a). Identification of novel genomic islands coding for antigenic pilus-like structures in Streptococcus agalactiae. *Molecular Microbiology*, 61(June), 126–141.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05225.x>
- Rosini, R., Rinaudo, C. D., Soriani, M., Lauer, P., Mora, M., Maione, D., Taddei, A., Santi, I., Ghezzi, C., Brettoni, C., Buccato, S., Margarit, I., Grandi, G., & Telford,

- J. L. (2006b). Identification of novel genomic islands coding for antigenic pilus-like structures in *Streptococcus agalactiae*. *Molecular Microbiology*, *61*(1), 126–141. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05225.x>
- Ross, P. W., & PW, R. (1978). *Ecology of group B streptococci*.
- Saad, E. J., Baenas, D. F., Boisseau, C. S., García, M. J., Sanchez, P. E., Balderramo, D. C., Hernández, D., Nú, S. A., & Caeiro, J. P. (2018). *Streptococcus agalactiae* bacteremia in non-pregnant adult patients at two teaching hospitals. *Revista Argentina de Microbiología*, *50*(3), 280–284. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.08.002>
- Samen, U., Eikmanns, B. J., Reinscheid, D. J., & Borges, F. (2007). The surface protein Srr-1 of *Streptococcus agalactiae* binds human keratin 4 and promotes adherence to epithelial HEp-2 cells. *Infection and Immunity*, *75*(11), 5405–5414. <https://doi.org/10.1128/IAI.00717-07>
- Samen, U. M., Eikmanns, B. J., & Reinscheid, D. J. (2006). The transcriptional regulator RovS controls the attachment of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells and the expression of virulence genes. *Infection and Immunity*, *74*(10), 5625–5635. <https://doi.org/10.1128/IAI.00667-06>
- Santi, I., Maione, D., Galeotti, C. L., Grandi, G., Telford, J. L., & Soriani, M. (2009). BibA induces opsonizing antibodies conferring in vivo protection against group B streptococcus. *Journal of Infectious Diseases*, *200*(4), 564–570. <https://doi.org/10.1086/603540>
- Santi, I., Scarselli, M., Mariani, M., Pezzicoli, A., Massignani, V., Taddei, A., Grandi, G., Telford, J. L., & Soriani, M. (2007). BibA: A novel immunogenic bacterial adhesin contributing to group B *Streptococcus* survival in human blood. *Molecular Microbiology*, *63*(3), 754–767. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05555.x>
- Schrag, S., Gorwitz, R., Fultz-Butts, K., & Schuchat, A. (2002). Prevention of perinatal group B streptococcal disease. *Centers for Disease Control and Prevention*, *51*(RR-11), 1–22.
- Schrag, S., Zywicki, S., Farley, M. M., Reingold, A. L., Harrison, L. H., Lefkowitz, L. B., James L., H., Danila, R., Cieslak, P. R., & Schuchat, A. (2000). Group B *Streptococcal* disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *The New*

- England Journal of Medicine*, 342(1), 15–20.
- Schuchat, A. (1998). Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: Shifting paradigms. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3), 497–513. <https://doi.org/10.1128/cmr.11.3.497>
- Seifert, K. N., Adderson, E. E., Whiting, A. A., Bohnsack, J. F., Crowley, P. J., & Brady, L. J. (2006). A unique serine-rich repeat protein (Srr-2) and novel surface antigen ( $\epsilon$ ) associated with a virulent lineage of serotype III *Streptococcus agalactiae*. *Microbiology*, 152(4), 1029–1040. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28516-0>
- Sendi, P., Furitsch, M., Mauerer, S., Florindo, C., Kahl, B. C., Shabayek, S., Berner, R., & Spellerberg, B. (2016). Gentamicin Resistance in *Streptococcus agalactiae*. *American Society of Microbiology*, 60(3), 1702–1707. <https://doi.org/10.1128/AAC.01933-15.Address>
- Seo, H. S., Minasov, G., Seepersaud, R., Doran, K. S., Dubrovskaya, I., Shuvalova, L., Anderson, W. F., Iverson, T. M., & Sullam, P. M. (2013). Characterization of fibrinogen binding by glycoproteins Srr1 and Srr2 of *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(50), 35982–35996. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.513358>
- Sheen, T. R., Jimenez, A., Wang, N. Y., Banerjee, A., van Sorge, N. M., & Doran, K. S. (2011). Serine-rich repeat proteins and pili promote *Streptococcus agalactiae* colonization of the vaginal tract. *Journal of Bacteriology*, 193(24), 6834–6842. <https://doi.org/10.1128/JB.00094-11>
- Slotved, H. C., Kong, F., Lambertsen, L., Sauer, S., & Gilbert, G. L. (2007). Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2929–2936. <https://doi.org/10.1128/JCM.00117-07>
- Solorzano, F., Echaniz, G., Conde, C., Calderon, E., Arredondo, J., & Beltran, M. (1989). Cervicovaginal Infection with Group B Streptococci Among Pregnant Mexican Women. *The Journal of Infectious Diseases*, 159(5), 1003–1004.
- Song, J. Y., Lim, J. H., Lim, S., Yong, Z., Seo, H. S., & Lim, J. H. (2018). Progress toward a group B streptococcal vaccine. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 14(11), 2669–2681. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1493326>

- Sorge, N. M. V., Quach, D., Gurney, M. A., Sullam, P. M., Nizet, V., & Doran, K. S. (2009). The group B streptococcal serine-rich repeat 1 glycoprotein mediates penetration of the blood-brain barrier. *Journal of Infectious Diseases*, *199*(10), 1479–1487. <https://doi.org/10.1086/598217>
- Spellerberg, B., Lanotte, P., & Mereghetti, L. (2010). Enhanced Expression of lmb Gene Encoding Laminin- Binding Protein in Streptococcus agalactiae Strains Harboring IS1548 in scpB-lmb Intergenic Region. *Plos One*, *5*(5), e10794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010794>
- Spellerberg, B., Rozdzinski, E., Martin, S., Weber-heynemann, J., & Lütticken, R. (2002). rfg Encodes a Novel Two-Component Signal Transduction System of Streptococcus agalactiae. *Infection and Immunity*, *70*(5), 2434–2440. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.5.2434>
- Takahashi, S., Nagano, Y., Nagano, N., Hayashi, O., Taguchi, F., & Okuwaki, Y. (1995). Role of C5a-ase in group B streptococcal resistance to opsonophagocytic killing. *Infection and Immunity*, *63*(12), 4764–4769. <https://doi.org/10.1128/iai.63.12.4764-4769.1995>
- Tazi, A., Disson, O., Bellais, S., Bouaboud, A., Dmytruk, N., Dramsi, S., Mistou, M., Khun, H., Mechler, C., Tardieux, I., Trieu-cuot, P., & Lecuit, M. (2010). The surface protein HvgA mediates group B streptococcus hypervirulence and meningeal tropism in neonates. *Journal of Experimental Medicine*, *207*(11), 2313–2322. <https://doi.org/10.1084/jem.20092594>
- Teatero, S., Ferrieri, P., Martin, I., Demczuk, W., McGeer, A., & Fittipaldi, N. (2017). Serotype Distribution, Population Structure, and Antimicrobial Resistance of Group B Streptococcus Strains Recovered from Colonized Pregnant Women. *Journal of Clinical Microbiology*, *55*(2), 412–422.
- Teatero, S., McGeer, A., Li, A., Gomes, J., Seah, C., Demczuk, W., Martin, I., Wasserscheid, J., Dewar, K., Melano, R. G., & Fittipaldi, N. (2015). Population structure and antimicrobial resistance of invasive serotype iv group b streptococcus, toronto, ontario, canada. *Emerging Infectious Diseases*, *21*(4), 585–591. <https://doi.org/10.3201/eid2014.140759>
- Tettelin, H., Masignani, V., Cieslewicz, M. J., Donati, C., Medini, D., Ward, N. L.,

- Angiuoli, S. V., Crabtree, J., Jones, A. L., Durkin, A. S., Deboy, R. T., Davidsen, T. M., Mora, M., Scarselli, M., Margarit, I., Peterson, J. D., Hauser, C. R., Sundaram, J. P., Nelson, W. C., ... Fraser, C. M. (2005). Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial “pan-genome.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(39), 13950–13955.
- Tickler, I. A., Tenover, F. C., Dewell, S., Le, V. M., Blackman, R. N., Goering, R. V., Rogers, A. E., Piwonka, H., Jung-Hynes, B. D., Chen, D. J., Loeffelholz, M. J., Gnanashanmugam, D., & Baron, E. J. (2018). *Streptococcus agalactiae* strains with chromosomal deletions evade detection with molecular methods. *Journal of Clinical Microbiology*, *57*(4). [https://doi.org/10.1128/JCM.02040-18\\_rfseq1](https://doi.org/10.1128/JCM.02040-18_rfseq1)
- Villaseñor-Sierra, A., P. Morales-Velázquez, & Palacios-Saucedo, G. (2004). Prevalencia de *Streptococcus agalactiae* del serotipo III en embarazadas. *Ginecología y Obstetricia de México*, *72*(3), 103–108.
- Wang, N., Patras, K. A., Seo, H. S., Cavaco, C. K., Rösler, B., Neely, M. N., Sullam, P. M., & Doran, K. S. (2014). Group B Streptococcal Serine-Rich Repeat Proteins Promote Interaction With Fibrinogen and Vaginal Colonization. *The Journal of Infectious Diseases*, *210*(6), 982–991. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu151>
- Watkins, L. K. F., Mcgee, L., Schrag, S. J., Beall, B., Jain, J. H., Pondo, T., Farley, M. M., Harrison, L. H., Zansky, S. M., Baumbach, J., Lynfield, R., Vagnone, P. S., Ascp, M. T., Miller, L. A., Schaffner, W., Thomas, A. R., Watt, J. P., Petit, S., & Langley, G. E. (2020). Epidemiology of Invasive Group B Streptococcal Infections Among Nonpregnant Adults in the United States, 2008-2016. *Journal of the American Medical Association*, *303*(4), 479–488. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2018.7269>
- Wijk, X. M. Van, Li, S., Meng, B. X., Mckee, K. K., Kuppevelt, T. H. Van, Yurchenco, P. D., Palsson, B. O., Lewis, N. E., Nizet, V., & Esko, J. D. (2017). Whole-Genome Sequencing of Invasion-Resistant Cells Identifies Laminin 2 as a Host Factor for Bacterial Invasion. *MBIO*, *8*(1), 1–11.
- Williams & Wilkins. (1990). VERY LATE ONSET OF GROUP B STREPTOCOCCAL DISEASE IN INFANTS INFECTED WITH THE HUMAN



IMMUNODEFICIENCY VIRUS. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 9(12), 925–927.

- Yang, S., & Rothman, R. (2004). PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis*, 4, 337–348. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01044-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01044-8)
- Yao, K., Poulsen, K., Maione, D., Daniela Rinaudo, C., Baldassarri, L., Telford, J. L., Skov Sørensen, U. B., & Kilian, M. (2013). Capsular gene typing of streptococcus agalactiae compared to serotyping by latex agglutination. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(2), 503–507. <https://doi.org/10.1128/JCM.02417-12>
- Zastempowska, E., Twarużek, M., Grajewski, J., & Lassa, H. (2022). Virulence Factor Genes and Cytotoxicity of Streptococcus agalactiae Isolated from Bovine Mastitis in Poland . *Microbiology Spectrum*. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02224-21>
- Zhou, Y., Wang, L.-Q., Yan, Q., Lee, C.-C., Hsu, M.-H., Liao, W.-T., Zhang, L., & Chiu, C.-H. (2022). Genomic Analysis of Group B Streptococcus from Neonatal Sepsis Reveals CC17 Clonal Expansion and Insights into Virulence- and Resistance-Associated Traits After Intrapartum Antibiotic Prophylaxis. *Clinical Infectious Diseases*, ciac331. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/cid/ciac331>