

DEPARTAMENTO DEMICROBIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE GRANADA
SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA
H.U. VIRGEN DE LAS NIEVES



TESIS DOCTORAL

Colonización materna por
Streptococcus agalactiae: comparación de
métodos diagnósticos y relación con datos
clínicos y epidemiológicos

M^a del Carmen Liébana Martos
Granada, 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María del Carmen Liébana Martos
D.L.: GR 208-2014
ISBN: 978-84-9028-727-9

La Dra. Mercedes Pérez Ruiz, Facultativa Especialista de Área del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, el Dr. Manuel de la Rosa Fraile, Especialista de Área del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, y el Dr. Alfonso Ruíz-Bravo López, Catedrático de Microbiología del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.

Certifican:

Que la Tesis Doctoral que presenta la Licenciada M^a del Carmen Liébana Martos "Colonización materna por *Streptococcus agalactiae*: comparación de métodos diagnósticos y relación con datos clínicos y epidemiológicos" ha sido realizada bajo nuestra dirección, habiendo sido revisada y estando conformes con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal que designe la Universidad de Granada.

Granada, Mayo 2013

Fdo. Mercedes Pérez Ruíz

Fdo. Manuel de la Rosa Fraile

Fdo. Alfonso Ruíz-Bravo López

El doctorando M^a DEL CARMEN LIÉBANA MARTOS y los directores de la tesis MERCEDES PÉREZ RUÍZ, MANUEL DE LA ROSA FRAILE Y ALFONSO RUÍZ-BRAVO LÓPEZ Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

GRANADA, a 9 de Mayo de 2013

Director/es de la Tesis

Fdo.:MERCEDES PÉREZ RUÍZ
LÓPEZ

Fdo.:ALFONSO RUÍZ-BRAVO

Fdo.: MANUEL DE LA ROSA FRAILE

Doctorando
Fdo.:M^a DEL CARMEN LIÉBANA MARTOS

ABREVIATURAS

a: ácido

ADN: Ácido desoxirribonucleico

CDC: Centers for Diseases Control and Prevention

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato

FDA: Food and Drug Administration

FRET: “fluorescence resonance energy transfer”

HUVN: Hospital Universitario Virgen de las Nieves

IC₉₅: intervalo de confianza del 95%

IgG: inmunoglobulina G

IM: intramuscular

ITU: Infección del Tracto Urinario

IV: intravenoso

K: índice kappa de concordancia

LCR: líquido cefaloraquídeo

LR: razón de probabilidad (del inglés “likelihood ratio”)

MLST: tipificación de secuencias multiloci (del inglés: Multilocus sequence typing)

MU millones de unidades

PAI: profilaxis antibiótica intraparto

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del Inglés: Polymerase Chain Reaction)

PCR-TR: PCR en tiempo real

PFGE: electroforesis en campo pulsátil

RN/RNs: recién nacido/recién nacidos

rpm: revoluciones por minuto

RPM: rotura previa de membranas

SDZ: sulfadiazina

SEGO: Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología

SEIMC: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

SEMFyC: Sociedad Española de Medicina Familiar y Comunitaria

SEQ: Sociedad Española de Quimioterapia

SGB: Estreptococo de grupo B (*Streptococcus agalactiae*)

TM: Temperatura de fusión (melting)

TMP-SXT: trimetoprim-sulfametoxazol

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN | 10 |
| I.1. GENERALIDADES | 11 |
| I.2. SGB EN EL ADULTO NO GESTANTE | 14 |
| I.3. SGB EN LA MUJER GESTANTE | 16 |
| I.3.1. INFECCIÓN SINTOMÁTICA | 17 |
| I.3.1.1. INFECCIÓN ANTEPARTO | 17 |
| I.3.1.2. INFECCIÓN POSTPARTO | 19 |
| I.3.2. COLONIZACIÓN | 19 |
| I.3.2.1. CRIBADO PRENATAL DE SGB | 20 |
| I.3.2.1.1. ELECCIÓN DEL MOMENTO DE LA RECOGIDA DE LA MUESTRA | 21 |
| I.3.2.1.2. ELECCIÓN DEL LUGAR ANATÓMICO PARA LA TOMA DE MUESTRA | 21 |
| I.3.2.1.3. ELECCIÓN DEL MÉTODO DE DETECCIÓN | 22 |
| I.4. SGB EN EL NEONATO | 22 |
| I.4.1. ENFERMEDAD DE COMIENZO PRECOZ | 23 |
| I.4.2. ENFERMEDAD DE COMIENZO TARDÍO | 24 |
| I.5. MÉTODOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE SGB | 26 |
| I.5.1. CULTIVO | 26 |
| I.5.2. DETECCIÓN POR MÉTODOS MOLECULARES | 28 |
| I.5.2.1. PCR EN TIEMPO REAL (PCR-TR) | 29 |
| I.5.2.2. MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SGB | 31 |
| I.5.3. OTROS MÉTODOS DE DETECCIÓN | 32 |
| I.6. PROTOCOLO DE ACTUACIÓN PARA LA PREVENCIÓN DE LA INFECCIÓN NEONATAL POR SGB | 32 |
| I.6.1. PROFILAXIS ANTIBIÓTICA INTRAPARTO | 33 |
| I.6.1.1. ESTRATEGIA BASADA EN LOS FACTORES DE RIESGO | 33 |
| I.6.1.2. ESTRATEGIA BASADA EN EL CRIBADO PRENATAL | 34 |
| I.6.1.3. RECOMENDACIONES ESPAÑOLAS ACTUALES DE PROFILAXIS ANTIBIÓTICA INTRAPARTO EN LA PREVENCIÓN DE SEPSIS NEONATAL PRECOZ POR SGB | 36 |
| I.6.1.4. PAUTAS DE PROFILAXIS ANTIBIÓTICA | 37 |
| I.6.2. MANEJO DEL NEONATO | 38 |
| I.6.3. INMUNOPROFILAXIS | 39 |
| II. OBJETIVOS | 41 |
| III. MATERIAL Y MÉTODOS | 43 |

| | |
|--|----------------|
| III. 1. ÁMBITO DE ESTUDIO | 44 |
| III.2. MUESTRAS | 44 |
| III.2.1. TIPO DE MUESTRA | 44 |
| III.2.2. RECOGIDA Y TRANSPORTE DE MUESTRAS | 44 |
| III.3. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO | 45 |
| III.3.1. | CULTIVO |
| | 45 |
| III.3.1.1. ELABORACIÓN DEL MEDIO GRANADA | 46 |
| III.3.1.2. LECTURA DE RESULTADOS | 46 |
| III.3.2. PCR EN TIEMPO REAL | 47 |
| III.3.2.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS | 47 |
| III.3.2.2. AMPLIFICACIÓN DE ADN | 49 |
| III.3.2.3. OBTENCIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS | 52 |
| III.4. REGISTRO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 52 |
| III.4.1. REGISTRO DE DATOS | 52 |
| III.4.1.1. DATOS DEMOGRÁFICOS | 52 |
| III.4.1.2. DATOS CLÍNICOS | 52 |
| III.4.1.3. DATOS MICROBIOLÓGICOS | 53 |
| III.4.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 53 |
| III.4.2.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO | 54 |
| III.4.2.2. COMPARACIÓN DE LOS DATOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS CON LOS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS | 54 |
| III.4.2.3. COMPARACIÓN DE TÉCNICAS PARA DETECCIÓN DE SGB | 55 |
| IV. RESULTADOS | 56 |
| IV.1. RESULTADOS GLOBALES | 57 |
| IV.2. VALIDACIÓN DEL CRIBADO COMO PREDICTOR DE LA COLONIZACIÓN INTRAPARTO | 57 |
| IV.2.1. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL PERIODO TRANSCURRIDO ENTRE EL CRIBADO Y EL MOMENTO DEL PARTO EN LA PREDICCIÓN DE LA COLONIZACIÓN POR SGB INTRAPARTO | 59 |
| IV.3. ESTUDIO DEL UROCULTIVO COMO PREDICTOR DE LA COLONIZACIÓN POR SGB | 60 |
| IV.4. PCR EN TIEMPO REAL | 61 |
| IV.4.1. COMPARACIÓN ENTRE EL CULTIVO INTRAPARTO Y LA PCR EN TIEMPO REAL | 62 |
| IV.5. PROFILAXIS ANTIBIÓTICA INTRAPARTO | 63 |

| | |
|---|-----------|
| <u>IV.5.1. RELACIÓN ENTRE LA PROFILAXIS INTRAPARTO Y EL ESTUDIO PRENATAL DE SGB</u> | 64 |
| <u>IV.5.1.1. RELACIÓN ENTRE LA APLICACIÓN DE PROFILAXIS INTRAPARTO Y CRIBADO DE SGB</u> | 64 |
| <u>IV.5.1.2. RELACIÓN ENTRE APLICACIÓN DE PROFILAXIS INTRAPARTO Y UROCULTIVO POSITIVO FRENTE A SGB</u> | 65 |
| <u>IV.6. RESULTADO EN EL RECIÉN NACIDO</u> | 66 |
| <u>IV.6.1. CULTIVOS PERIFÉRICOS</u> | 67 |
| <u>IV.6.2. RELACIÓN ENTRE PROFILAXIS INTRAPARTO, COLONIZACIÓN MATERNA Y COLONIZACIÓN DEL RN</u> | 69 |
| <u>IV.6.3. RELACIÓN ENTRE CRIBADO PRENATAL, CULTIVO Y PCR INTRAPARTO Y COLONIZACIÓN DEL RN</u> | 70 |
| <u>IV.6.4. RELACIÓN ENTRE EL ANTIMICROBIANO UTILIZADO Y COLONIZACIÓN DEL RN</u> | 72 |
| <u>V. DISCUSIÓN</u> | 73 |
| <u>V.1. VALIDACIÓN DEL CRIBADO PRENATAL COMO PREDICTOR DE LA COLONIZACIÓN INTRAPARTO</u> | 75 |
| <u>V.2. COMPARACIÓN ENTRE CULTIVO INTRAPARTO Y PCR EN TIEMPO REAL EN LA DETECCIÓN DE SGB</u> | 77 |
| <u>V.3. PROFILAXIS INTRAPARTO Y CULTIVOS PRENATALES</u> | 80 |
| <u>V.4. COLONIZACIÓN MATERNA Y NEONATAL POR SGB</u> | 82 |
| <u>V.5. PROFILAXIS INTRAPARTO Y COLONIZACIÓN NEONATAL</u> | 83 |
| <u>VI. CONCLUSIONES</u> | 85 |
| <u>VII. BIBLIOGRAFÍA</u> | 88 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| TABLA III.1. FÓRMULA PARA PREPARACIÓN DEL MEDIO GRANADA | 46 |
| TABLA III.2. FÓRMULA PARA PREPARACIÓN DEL SUPLEMENTO DEL MEDIO GRANADA | 46 |
| TABLA III.3. CEBADORES Y SONDAS USADOS EN LA PCR | 51 |
| TABLA III. 4. CLASIFICACIÓN DEL GRADO DE ACUERDO DEL ÍNDICE KAPPA | 55 |
| TABLA IV.1. RESULTADOS DEL CULTIVO DE SGB EN EL MOMENTO DEL PARTO EN 2702 GESTANTES | 57 |
| TABLA IV.2. RESULTADOS DEL RESULTADO DEL CRIBADO DE SGB EN LA SEMANA 35-37 EN 1808 GESTANTES | 58 |
| TABLA IV.3. COMPARACIÓN ENTRE EL RESULTADO DEL CRIBADO EN LA SEMANA 35-37 Y EL DEL CULTIVO INTRAPARTO EN 1808 GESTANTES | 58 |
| TABLA IV.4. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DEL CRIBADO DE SGB SEGÚN EL PERIODO TRANSCURRIDO ENTRE EL MISMO Y EL PARTO | 59 |
| TABLA IV.5. DISCREPANCIAS ENTRE LOS RESULTADOS DEL CRIBADO Y EL CULTIVO INTRAPARTO POR GRUPOS DE PERIODO TRANSCURRIDO ENTRE AMBAS DETERMINACIONES EN 1808 GESTANTES | 60 |
| TABLA IV.6. COMPARACIÓN ENTRE EL CULTIVO INTRAPARTO Y EL UROCULTIVO PARA LA DETECCIÓN DE SGB EN 2702 GESTANTES | 60 |
| TABLA IV.7. COMPARACIÓN ENTRE EL CRIBADO Y EL UROCULTIVO PARA LA DETECCIÓN DE SGB EN 1808 GESTANTES | 61 |
| TABLA IV.8. RESULTADOS DEL CULTIVO INTRAPARTO Y LA PCR-TR PARA DETECCIÓN DE SGB EN 100 MUESTRAS ENSAYADAS | 62 |
| TABLA IV.9. MOTIVOS DE PROFILAXIS ANTIBIÓTICA INTRAPARTO EN 407 DE LAS 2702 GESTANTES | 63 |
| TABLA IV.10. ANTIBIÓTICOS USADOS EN LA PROFILAXIS INTRAPARTO DE 407 GESTANTES | 64 |
| TABLA IV.11. RESULTADO DEL CRIBADO DE SGB EN LAS 407 GESTANTES QUE RECIBIERON PROFILAXIS ENTRAPARTE | 65 |
| TABLA IV. 12. RELACIÓN ENTRE APLICACIÓN DE PROFILAXIS INTRAPARTO Y EL RESULTADO DEL CRIBADO DE SGB (N=407) | 65 |
| TABLA IV.13. RELACIÓN ENTRE COLONIZACIÓN POR SGB Y PREMATURIDAD | 67 |
| TABLA IV.14. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE COLONIZACIÓN POR SGB EN 265 RN | 67 |
| TABLA IV.15. RESULTADOS DEL CULTIVO DE EXUDADOS PERIFÉRICOS DE SGB EN RN DE MADRES COLONIZADAS | 68 |

| | |
|---|----|
| TABLA IV.16. DETECCIÓN DE SGB EN LOS EXUDADOS PERIFÉRICOS DE 37 RN COLONIZADOS DISTRIBUIDOS POR Nº DE LOCALIZACIONES POSITIVAS | 69 |
| TABLA IV. 17. RELACIÓN ENTRE EL TIPO DE PROFILAXIS ADMINISTRADA EN 156 MADRES COLONIZADAS Y LA DETECCIÓN DE SGB EN EXUDADES PERIFÉRICOS EN EL RN | 70 |
| TABLA IV.18. RELACIÓN ENTRE EL TIPO DE PROFILAXIS INTRAPARTO ADMINISTRADA EN 156 MADRES COLONIZADAS Y EL GRADO DE COLONIZACIÓN POR SGB DEL RN | 71 |
| TABLA IV.19. RESULTADOS DE PCR, CULTIVO PRENATAL INTRAPARTO Y TIPO DE PROFILAXIS INTRAPARTO EN RELACIÓN CON EL RESULTADO DEL ESTUDIO DE COLONIZACIÓN EN EL RN EN 7 CASOS | 71 |
| TABLA IV.20. REALACIÓN ENTRE LA COLONIZACIÓN EN EL RN Y EL TIPO DE ANTIMICROBIANO USADO EN LA PROFILAXIS INTRAPARTO EN 215 CASOS | 72 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| FIGURA I.1. CURVA DE FLUORESCENCIA DE PCR-TR CON TECNOLOGÍA SYBR GREEN | 30 |
| FIGURA I.2. ESTRATEGIA BASADA EN EL CRIBADO ANTEPARTO PARA LA PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD PERINATAL POR SGB. | 35 |
| FIGURA I.3. ALGORITMO DE TRATAMIENTO DE RECOMENDACIONES DE TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO PARA PROFILAXIS INTRAPARTO | 358 |
| FIGURA I. 4. MANEJO DEL NEONATO DE MADRE COLONIZADA POR SGB. | 39 |
| FIGURA III.1 CRECIMIENTO DE SGB EN PLACA Y TUBO DE MEDIO GRANADA | 47 |
| FIGURA III.2. ESQUEMA DE EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO | 49 |
| FIGURA III.3. PCR CON SONDAS FRET | 50 |
| FIGURA III.4. CURVAS DE DISOCIACIÓN PARA SGB | 50 |
| FIGURA IV.1 CURVAS DE FLUORESCENCIA DE PCR EN TIEMPO REAL DE SGB | 61 |

I. Introducción

I.1. Generalidades

Streptococcus agalactiae es un coco gram positivo, catalasa y oxidasa negativo y anaerobio facultativo perteneciente al grupo B de la clasificación de Lancefield, por lo que también es denominado *Streptococcus* grupo B o SGB. Comparte características generales con el resto de *Streptococcus* spp (Kasper y Baker, 1979; Wagner y cols., 1980). Crece en numerosos medios de cultivo dando lugar en agar sangre a colonias de 3 a 4 mm de diámetro, grisáceas, lisas y de bordes enteros. Las colonias mucosas se rodean de una zona de β -hemólisis que para algunas cepas es detectable sólo cuando se retira la colonia del agar (Edwards y Baker, 2010). Aproximadamente un 2-3% de las cepas son no hemolíticas (Brimil y cols, 2006; Edwards y Baker, 2010).

La prueba CAMP descrita por Christie, Atkins y Munich-Petersen en 1944 permite la identificación presuntiva de SGB (Christie y cols., 1944). Esta prueba no es específica, ya que el factor CAMP pueden producirlo cepas de los grupos C, F y G (MacFaddin, 1980). El factor CAMP es una proteína extracelular termoestable que aumenta la actividad hemolítica de la β -hemolisina (esfingomielinasa C) de *Staphylococcus aureus* frente a hematíes de carnero. Aproximadamente un 5% de las cepas SGB son CAMP negativas, aunque las cepas no hemolíticas dan la prueba CAMP positiva (Ferrieri, 1985; Henrichsen, 1985).

Otro criterio de identificación presuntiva es la resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SXT). SGB es capaz de utilizar timidina presente en los medios de cultivo, anulando el bloqueo de la vía del ácido fólico ejercido por SXT (Gunn, 1976; Coll y cols., 1985; Winn y cols 2006)

SGB produce un pigmento de color rojo-naranja específico en medios de cultivo diferenciales, que permite su rápida identificación (Fallon, 1974; Waitkins, 1980). La producción del pigmento es más rápidamente detectada en medios que contienen almidón, inhibidores de la vía del folato y metotrexato (de la Rosa y cols., 1990, 1992). La capacidad de producir pigmento está en relación con la capacidad de liberar hemolisina. Los genes que codifican para

la hemolisina y pigmento presentan una localización genética común, el cluster *cyl*, observándose que muchas de las cepas no hemolíticas presentan una secuencia de inserción en los genes *cylA* o *cylB* (Spellerberg, 2000).

La producción del pigmento se ve favorecida en condiciones de anaerobiosis, sin embargo son mucho más importantes las diferencias en la intensidad de pigmento dependiendo de las condiciones de incubación (aerobiosis o anaerobiosis) que se obtienen en las colonias que crecen en la superficie de las placas con respecto a los tubos con medio semisólido (de la Rosa y cols., 1992, 1994; Carazo, 1993)

Los aislados de SGB se distribuyen en diez serotipos distintos en función de su polisacárido capsular que actúa como factor de virulencia (Jorhi y col., 2006). Tanto en los aislados de adultos asintomáticos, como en los de niños o recién nacidos (RNs), predominan tres serotipos I, II y III. El serotipo III, es el que con mayor frecuencia se aísla en niños con meningitis y con enfermedad de comienzo tardío. Sin embargo esta aparente virulencia del serotipo III se circunscribe a la edad infantil. Algunos estudios han puesto de manifiesto la predominancia del serotipo II en adultos con meningitis, serotipo muy infrecuente en niños con meningitis (Edwards, Nizet y Baker, 2006; Phares y col., 2008). En Europa occidental y Estados Unidos los serotipos I y III representan el 85% de los aislados (Shet y Ferrieri, 2004), sin embargo desde los años 90 se ha observado una emergencia del serotipo V, tanto en neonatos como en adultos (Uh y cols 2001; Fernandez y cols, 1998), representando un porcentaje del 14-16% de los aislados (Phares y cols, 2008, Ippolito y cols, 2012).

El tracto gastrointestinal es el reservorio humano natural del SGB y por tanto la probable fuente de la colonización vaginal (Dillon, 1982; Picard y Bergeron, 2004). SGB ha sido aislado del tracto genital y porción terminal del intestino en cultivos de mujeres embarazadas y no embarazadas en tasas que van del 10% al 40% (Edwards y Baker, 2006)

SGB es el principal agente productor de sepsis neonatal. SGB fue descrito como patógeno humano por primera vez por Fry en 1938 en tres casos

de sepsis puerperal fatal. Antes que Fry, Lancefield y Hare identificaron este microorganismo en cultivos vaginales de mujeres asintomáticas tras el parto (Lancefield y cols., 1935). En 1939 Brown definió SGB como un patógeno neonatal (Brown, 1939) y Plummer en 1941 describió los primeros casos de meningitis en RN.

El RN adquiere SGB por vía vertical. El comienzo del parto puede dar como resultado la diseminación ascendente de la bacteria que coloniza a la madre. La transmisión se produce por aspiración del líquido amniótico infectado o en el paso del niño por el canal del parto, siendo la tasa de transmisión vertical cercana al 50% en mujeres portadoras (Baker, Clark y Barret, 1973; Pass, 1979; Edwards y Baker, 2010)

La infección por SGB fue raramente descrita hasta los años sesenta, cuando muchos autores indicaron que la enfermedad causada por este microorganismo podría ser más frecuente de lo que se creía (Hodd y cols., 1961; Eickhoff y cols, 1964; Butter y cols., 1967). SGB surge en los años 70 como una de las causas fundamentales de morbi-mortalidad neonatal y todavía hoy permanece como una de las principales causas de meningitis y sepsis en RNs pese a los esfuerzos en la prevención de enfermedad perinatal causada por SGB (Bergh, 2004; Picard y Bergeron, 2004). Entre las causas que justifican el número de aislamientos que aún se registran de este microorganismo a pesar de las medidas de prevención podrían señalarse, entre otras, la mejora de las técnicas diagnósticas, disminución de la mortalidad perinatal y disminución de la incidencia de otras infecciones, así como los fallos en la administración de la profilaxis intraparto (Baker, 1977, Velaphi y cols, 2003; Goins y cols, 2010).

La enfermedad invasiva causada por SGB en adultos no gestantes se ha reconocido como un problema de salud más recientemente. En las pasadas dos décadas se ha incrementado el número de infecciones por SGB en adultos.

I.2. SGB en el adulto no gestante

En las últimas décadas se ha notado un incremento del número de infecciones invasivas causadas por SGB en adultos no gestantes. En Estados Unidos se calcula una incidencia de alrededor de 25 casos/100000 habitantes (Edwards y Baker, 2005; Phares y cols, 2008), mientras que en España algunos esta cifra es de aproximadamente 1 caso por cada 1000 admisiones hospitalarias (Blancas y cols, 2004). Si excluimos a la mujer gestante, la mayoría de estos casos se dan en adultos mayores de 65 años (principalmente varones) que presentan condiciones de salud especiales, por ejemplo aquellos que se encuentran en instituciones bajo cuidado de personal sanitario (Muñoz y cols., 1997; Farley y cols., 2001; Henning y cols., 2001). Otra de las condiciones que predisponen a la infección es la diabetes. Ya en 1964 se demostró la relación entre diabetes mellitus y enfermedad vascular periférica grave e infección por SGB (Eickhoff y cols., 1964). También predisponen a la infección por este microorganismo anomalías neurológicas, demencia, paraplejía o cuadriplejía (Montibello y cols., 2011).

Los adultos jóvenes con cáncer o infección VIH poseen también un mayor riesgo de infección por SGB (Farley y cols., 1993).

En este tipo de pacientes las manifestaciones clínicas más relevantes son:

Bacteriemia

Aproximadamente un 50% de estos pacientes tiene un desenlace fatal (Colford y cols., 1995). En los supervivientes, las infecciones recurrentes se asocian con focos de infección como endocarditis u osteomielitis (Harrison y cols., 1995). Se han descrito bacteriemias tras esplenectomía traumática o cateterización cardíaca.

Neumonía

El factor predisponente más comúnmente descrito en pacientes con neumonía es la diabetes mellitus y la enfermedad neurológica. La neumonía se manifiesta con fiebre, leucocitosis e hipoxia e infiltrados lobulares bilaterales. La infección es frecuentemente polimicrobiana, aunque SGB es el

microorganismo predominante. Las tasas de mortalidad por neumonía por SGB son del 30-85% (Edwards, Nizet y Baker, 2006)

Endocarditis

En la era preantibiótica se describieron endocarditis agudas de la válvula mitral en mujeres gestantes causadas por SGB. Los casos descritos a partir de 1945 se dan en ambos sexos con una edad media de unos 50 años y con presentaciones agudas y subagudas en las que la válvula mitral es la más frecuentemente afectada (Lerner y cols., 1977; Coldford y cols., 1995).

Aunque sigue siendo una causa poco común de endocarditis infecciosa, se ha incrementado el número de endocarditis de válvula protésica y endocarditis por SGB asociadas al abuso de drogas por vía parenteral (Alsoub y cols., 1997, Sambola y cols, 2002).

Artritis

En dos tercios de los pacientes afectados, la artritis causada por SGB es monoarticular (Nolla y cols., 2003). Afecta principalmente a rodilla, hombro, cadera y articulaciones esternoclavicular o sacroiliaca. Se presenta con fiebre y dolor articular fundamentalmente en hombres con una edad media de 58 años (Nolla y cols., 2003). Con una terapia antimicrobiana adecuada, aspiraciones de la articulación y desbridamiento quirúrgico se consigue la recuperación en la mitad de los casos (Small y cols., 1984).

Osteomielitis

Suele aparecer a consecuencia de una artritis adyacente o una enfermedad vascular periférica, cirugía ortopédica o un foco de infección cercano como una sinusitis frontal (Pischel y cols., 1985). Afecta principalmente a hombres, un tercio de ellos de edad superior a 65 años con enfermedades de base o en aquellos que han sido sometidos a intervenciones quirúrgicas óseas o con de prótesis articulares. Los huesos afectados principalmente son vértebras, pies, cadera, tibia y dedos del pie. Un 25% de las infecciones son polimicrobianas, sobre todo asociadas a *Staphylococcus aureus*. Las infecciones con un desenlace fatal son muy poco frecuentes y siempre asociadas a otros focos de infección como endocarditis.

Infecciones de piel y tejidos blandos

La piel y tejidos blandos son los sitios más comunes de infección localizada por SGB en adultos (Schwartz y cols., 1991). Celulitis, úlceras de

pie, abscesos e infección de úlceras de decúbito son las manifestaciones más comunes.

La infección por SGB puede manifestarse como piomiositis o fascitis necrotizante en ocasiones asociadas con cuadros semejantes a los del síndrome tóxico (Riefler y cols., 1988; Sutton y cols., 1985; Tang y cols., 2000).

El drenaje adecuado y la terapia antibiótica parenteral alcanzan la recuperación total en el 89% de los pacientes.

Meningitis

Las meningitis causadas por SGB se han descrito en casos de pacientes con condiciones de comorbilidad. Se da sobre todo en hombres de mediana edad (media de 52 años). Muchas de estas meningitis tienen su causa en una discontinuidad de la barrera hematoencefálica por cirugía, cáncer o sinusitis crónica. La sordera es una de las secuelas neurológicas más comunes de la meningitis por SGB (Harburg y cols., 1992; Domingo y cols., 1997)

Otras infecciones

SGB solo o como componente de una infección mixta se ha aislado en pacientes con queratitis o endoftalmitis (Edwards y Baker, 2010).

Este microorganismo es causante de infecciones del tracto urinario (ITU) en pacientes no obstétricos. Este tipo de infecciones son generalmente adquiridas en la comunidad y afectan frecuentemente a mujeres de mediana edad. También han sido descritas uretritis no gonocócicas causadas por SGB en hombres (Lefevre y cols., 1991)

Otras infecciones poco comunes causadas por SGB incluyen abscesos de mama en mujeres no lactantes, abscesos epiglóticos, aneurismas micóticos de la arteria femoral, abscesos hepáticos, peritonitis... (Edwards y Baker, 2010).

I.3. SGB en la mujer gestante

A través de los siglos la mayor tasa de mortalidad en la gestante ha sido la perinatal debida a causas obstétricas, a partos distócicos, a procesos infecciosos de la madre o el niño o a procesos sistémicos.

Ignaz Philipp Semmelweiss, un obstetra húngaro que ejerció en Viena en la primera mitad del siglo XIX, fue el primero en identificar el origen

infeccioso de la sepsis puerperal. Semmelweiss, a través de sus observaciones relacionó la muerte por sepsis de un colega tras realizar la autopsia a una mujer que había fallecido de sepsis puerperal, atribuyéndola a un agente infeccioso en la “materia en descomposición”. Estas observaciones le llevaron a aconsejar el lavado de manos antes del examen de cada paciente. Las especulaciones de Semmelweiss de una posible causa orgánica en la sepsis sentaron las bases de la teoría de los gérmenes enunciada por Pasteur muchas décadas después. (Koenig y Keenan, 2009)

Algunos lustros más tarde, y gracias a las investigaciones de Pasteur, se puso de manifiesto que la infección era debida a “agentes invisibles para el simple ojo humano”, pero identificables con microscopio. Además, se realizó una clasificación de la enfermedad según la manera de penetrar agentes patógenos en el organismo; de esta forma las infecciones puerperales se dividían en tres grupos: infecciones autogénicas (independientes de la gestación), endogénicas (dependientes de la puérpera misma y producto del proceso puerperal) y las exogénicas, que era el mecanismo más frecuente.

En 1935 Lancefield y Hare aislaron SGB de la vagina de mujeres en el postparto. SGB se considera parte de la microbiota vaginal, aunque en la mujer gestante puede ocasionar infección anteparto, como corioamnionitis, que puede dar lugar a rotura de membranas y parto prematuro (Hillier, 1999). A pesar de que SGB se encuentra como colonizador en tracto gastrointestinal y genitourinario también es considerado como la principal causa de enfermedad neonatal invasiva (Glaser y cols, 2002)

I.3.1. Infección sintomática

La infección en la mujer gestante puede ser dividida en dos categorías: infección anteparto e infección postparto.

I.3.1.1. Infección anteparto

SGB es una de las causas más comunes de morbilidad febril en la mujer gestante. La enfermedad asociada a embarazo causada por SGB es

responsable de alrededor del 15-25% de la morbilidad febril con o sin bacteriemia (Edwards y Baker, 2010). La fiebre en una madre puede ser el signo más precoz de bacteriemia en el neonato, por lo que los RNs de madres que hayan presentado fiebre anteparto deben ser cuidadosamente evaluados. La mayoría de los casos de síndrome febril en pacientes gestantes se resuelven de forma satisfactoria con la aplicación de terapia antimicrobiana adecuada, sin embargo se han documentado complicaciones fatales como absceso abdominal, endocarditis, osteomielitis vertebral, absceso epidural o fascitis necrotizante.

La corioamnionitis es una de las infecciones más comunes en el anteparto con rotura de membranas que desencadena parto prematuro, aunque, también se han descrito casos de partos prematuros en mujeres con las membranas intactas (Desa y cols., 1984; Blanc y cols., 1961). Un 40% de los casos en los que la prematuridad viene determinada por una infección se asocia a rotura prematura de membranas y en un 33% se produce con membranas intactas (Straka y cols, 2004). Existe una fuerte asociación entre infección y parto prematuro cuando éste se produce antes de la semana 32 de gestación (Andrews y cols, 2000). La sepsis neonatal se asocia comúnmente con el parto prematuro explicando en muchos casos la morbi-mortalidad perinatal (Straka y cols, 2004).

Otras manifestaciones frecuentes en mujeres embarazadas son las infecciones del tracto urinario (ITUs). La bacteriuria por SGB durante el embarazo, supone un factor de riesgo potencial para el RN. Puede aparecer bacteriuria asintomática, cistitis o pielonefritis causada por SGB (Wood y Dillon y cols., 1981). Además se ha demostrado una asociación entre colonización y/o infección en el niño e ITU o bacteriuria anteparto, y ésta su vez ha sido relacionada con riesgo de parto prematuro (Pass y cols., 1982; Moller y cols., 1984).

Las mujeres con una bacteriuria de más de 10^5 UFC/ml son aquellas que presentan un elevado grado de colonización, lo que se relaciona con un mayor riesgo de infección maternal y neonatal. (Woods y Dillon, 1981; Heath y cols., 2009).

I.3.1.2. Infección postparto

SGB como único patógeno o como componente de una infección polimicrobiana es el aislado más común en endometritis postparto en mujeres colonizadas, especialmente si se realiza cesárea (Minkoff y cols., 1982). La infección comienza de forma abrupta, apareciendo signos inespecíficos en las primeras doce horas tras el parto. La temperatura suele ser elevada, y va acompañada de taquicardia. Como consecuencia de la diseminación del microorganismo desde las trompas de Falopio puede producirse íleo paralítico y distensión abdominal. También puede producirse infección de la herida de la cesárea. SGB se aísla en alrededor del 15% de los casos de endometritis periparto, bacteriemias puerperales o infección de herida tras cesárea (Edwards y Baker, 2010)

Es importante reconocer pronto este tipo de infecciones para evitar posibles secuelas. Puede aparecer bacteriuria y bacteriemia, por lo que existe riesgo de desarrollar endocarditis y sepsis. Estas complicaciones pueden desencadenar un síndrome de distrés respiratorio asociado a un alto grado de mortalidad.

I.3.2. Colonización

El tracto gastrointestinal es el reservorio primario de SGB, y la colonización genital se produce por contigüidad (Dillon y cols, 1982). Esto explica el estado de portadora intermitente durante el embarazo y también la dificultad para erradicar la colonización vaginal (Hastings y cols, 1986). Así pues, la colonización por SGB puede ser transitoria, crónica o intermitente (Hoogkamp-Korstanje y cols, 1982, Dillon y cols., 1982, Yancey y cols, 1996).

La tasa colonización vaginal por SGB a nivel mundial oscila entre el 10% y el 40% (Glantz y Kedley, 1998; Schrag y cols, 2000, Shet y Ferrieri, 2004). En España, se han descrito tasas de colonización de alrededor del 11-18% (Alós y cols, 2012).

Los factores que influyen en la colonización por SGB son muchos y muy variados. La diabetes parece ser un factor independiente asociado con altas tasas de colonización en embarazadas (Ramos y cols., 1997). Tanto el momento del ciclo menstrual como la colocación de dispositivos intrauterinos pueden incrementar las tasas de colonización ya que favorecen el crecimiento local del microorganismo (Baker y Edwards., 1988; Farrag y cols., 1985., Chaudhary y cols., 1986). Por otra parte, la actividad sexual altera el microambiente de la vagina de forma que lo hace más permisivo a la colonización por SGB (Manning y cols., 2002). La colonización genital también está relacionada con la paridad: en mujeres con tres o menos embarazos las tasas de colonización son superiores que en mujeres multíparas (Anthony y cols.; 1978; Yow y cols.; 1980; Regan y cols., 1991).

La colonización vaginal por SGB intraparto es el mayor factor de riesgo de sepsis precoz en el RN. El riesgo de penetración desde las membranas del niño contaminadas con SGB de la madre es directamente proporcional al inóculo genital (Dillon y cols., 1987, Boyer y Gotofft., 1985; Bingen y cols., 1992). La transmisión vertical de SGB ocurre fundamentalmente en el momento del parto o a causa de la rotura prematura de membranas.

El cribado prenatal es el primer paso crítico en la prevención de la enfermedad neonatal, y por tanto pieza fundamental en los programas de prevención (Schrag y cols, 2002; Schrag y cols., 2003).

1.3.2.1. Cribado prenatal de SGB

Los CDC (Centers for Disease Control and Prevention) en sus recomendaciones para prevención de la enfermedad perinatal por SGB, indican que es necesario un cribado universal para detectar colonización en todas la embarazadas entre las semanas 35 y 37 de la gestación (CDC, 2010).

Numerosos estudios han documentado que la precisión del cribado por cultivo para la identificación del estado de portadora puede ser mejorada mediante la elección adecuada del momento de la recogida de la muestra, así

como de los lugares anatómicos de los cuales se toma y los métodos microbiológicos utilizados para la detección del microorganismo (Regan y cols., 1996; Connellan y cols., 2000).

I.3.2.1.1. Elección del momento de la recogida de la muestra

La colonización en las primeras semanas del embarazo no es predictiva del riesgo de una posterior sepsis neonatal por colonización en el momento del parto (Boyer y Gotoff., 1985). Por otra parte el tratamiento de las madres colonizadas da lugar a una erradicación temporal del microorganismo, pero la mayoría de las mujeres son recolonizadas al cabo de unas 6 semanas.

Los cultivos realizados antes de las cinco semanas previas al parto no son fiables para predecir el estado de portadora en el momento del parto (Yancey y cols., 1996). Por esta misma razón las embarazadas que hayan estado colonizadas por SGB en un embarazo anterior pueden no estarlo en el embarazo actual y viceversa (Regan y cols., 1996).

En algunos estudios, mujeres con cultivos positivos a las 26-28 semanas de gestación permanecieron colonizadas a término en un 65% de los casos, mientras que entre un 8% y un 10% de las que tuvieron cultivos negativos fueron positivas para SGB en el momento del parto (Connellan y cols., 2000; Shet y Ferrieri., 2004). Esto supone que los escobillones tomados a las 28 semanas de gestación tienen un valor predictivo positivo de sólo un 50-70%. Otros estudios han demostrado que existe mejor correlación entre la colonización intraparto y la colonización en las semanas 36-38 del embarazo que en la semana 30 (Connellan y cols., 2000; Hiller y cols., 2005).

Actualmente, los CDC recomiendan la realización del cribado universal entre las semanas 35-37, para incrementar la sensibilidad y especificidad (CDC, 2010; Alós y cols, 2012).

I.3.2.1.2. Elección del lugar anatómico para la toma de muestra

Se recomienda la toma combinada de una muestra vaginal y rectal, ya que incrementa la tasa de detección sustancialmente respecto a la toma de una

muestra de cérvix o vagina sin escobillón rectal (Badri y cols., 1977; Hiller y cols., 2005). Pueden tomarse dos escobillones, uno vaginal y otro rectal o bien uno vaginorrectal. La muestra ha de obtenerse antes de cualquier manipulación vaginal, del tercio externo de vagina (no se necesita espéculo) y de la zona anorrectal (introduciendo el escobillón en el ano) y utilizando escobillones con medio de transporte.

Se ha visto que las muestras tomadas por la misma mujer embarazada con las instrucciones adecuadas tienen un rendimiento similar a las tomadas por personal sanitario (Mercer y cols., 1995).

La identificación de SGB en una muestra de orina limpia se considera asociada a un elevado grado de colonización y también a un mayor riesgo de enfermedad neonatal por SGB, por lo que la investigación de SGB en esta muestra se incluye dentro de las recomendaciones para la indicación de una profilaxis intraparto (Persson y cols., 1985; Wood y Dillon, 1981 ; Alós y cols, 2012).

1.3.2.1.3. Elección del método de detección

El cultivo es el método de elección para detectar SGB en mujeres colonizadas. Las muestras vaginales o vaginorrectales llevan abundante microbiota regional. Para maximizar el aislamiento de SGB y evitar el sobrecrecimiento de otras bacterias deben utilizarse medios selectivos de enriquecimiento y/o medios diferenciales (CDC, 2010, ; Alós y cols, 2012). Los métodos diagnósticos para detección de SGB en muestras clínicas se describen en el apartado I.6.

1.4. SGB en el neonato

La colonización de las mucosas de los neonatos resulta de la transmisión vertical del microorganismo desde la madre. Puede producirse

intraútero, por un mecanismo de ruta ascendente, o en el momento del parto. Los principales lugares de colonización en los neonatos son la piel, la nasofaringe y el recto. El SGB persiste en la nasofaringe desde semanas a meses, mientras que la colonización cutánea desaparece tras varias semanas de vida.

La enfermedad neonatal se clasifica en enfermedad de comienzo precoz y enfermedad de comienzo tardío.

I.4.1. Enfermedad de comienzo precoz

Se habla de enfermedad de comienzo precoz cuando se da en los primeros 7 días de vida.

La tasa de transmisión vertical en el momento del parto es aproximadamente del 50% en mujeres portadoras. Los niños altamente colonizados poseen un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad por SGB de comienzo precoz (Schrag y cols., 2002).

En el momento del nacimiento, el 50-65% de los niños de madres colonizadas tienen cultivos periféricos positivos (mucosas y piel). Aproximadamente un 98% de los niños colonizados permanecen sanos, pero un 1-2% de ellos pueden desarrollar infección invasiva por SGB, aunque este porcentaje es mayor en niños de madres con complicaciones obstétricas como parto prematuro, rotura de membranas de más de 18 horas antes del parto, fiebre intraparto, corioamnionitis, bacteriemia materna, embarazos en mujeres muy jóvenes, parto gemelar, etc. (Stoll y cols., 1996). SGB es el patógeno más frecuentemente asociado con infecciones de comienzo precoz en los niños de muy bajo peso (menos de 1500 g). La mortalidad en niños con enfermedad precoz por SGB es del 4-6% (Phares y cols, 2008, Hamada y cols, 2008, Fluegge y cols, 2006). Los índices de mortalidad son inversamente proporcionales al peso al nacer (Edwards y Baker, 2010).

La incidencia de enfermedad neonatal precoz por SGB en España ha descendido un 73% tras la implementación de las medidas de prevención situándose en una tasa de aproximadamente 0,33 ‰ nacidos vivos. La

mortalidad global también ha descendido notablemente desde un 0,33‰ a un 0,18 ‰ (López-Sastre y cols., 2009).

Las tres manifestaciones más comunes de la infección de comienzo precoz son sepsis, neumonía y meningitis.

Los signos y síntomas de **sepsis** son inespecíficos. Con frecuencia hay un establecimiento brusco de la fiebre, asociado a rigidez, mal estado general, e hiperventilación. (Reimer, 1997).

Un 5-10% de los neonatos con infección por SGB desarrollan **meningitis** (Shet y Ferrieri, 2004, Fluegge y cols, 2006; Edwards y Baker, 2010). La mortalidad debida a meningitis está en torno al 7%, siendo mayor en los RNs de bajo peso (Phares y cols, 2008)

Los síntomas **respiratorios** están presentes en la mayoría de los casos de enfermedad precoz. En los niños con bacteriemia y neumonía aparecen síntomas como apnea, gruñidos, taquipnea y cianosis. En algunos casos la radiografía de tórax es diagnóstica, sin embargo en más de la mitad de los casos el patrón radiológico lo hace indistinguible del síndrome de membranas hialinas (Spellerberg, 2000).

1.4.2. Enfermedad de comienzo tardío

Se habla de enfermedad de comienzo tardío cuando comienza después de los primeros 7 días de vida. La prematuridad y el bajo peso al nacer son los factores de riesgo más destacados para desarrollar una enfermedad de comienzo tardío por SGB, además de estar asociados con una mayor mortalidad. Muchos de los niños que desarrollan una infección de comienzo tardío, muy tardío o incluso en la primera infancia (más de tres meses de vida), tuvieron períodos de gestación inferiores a las 35 semanas (Feng-Ying y cols, 2003, Heath y cols, 2004; Phares y cols, 2008; Jordan y cols, 2008). La necesidad de largos períodos de hospitalización y la inmadurez de su sistema inmunitario probablemente contribuyen a la infección. Se han descrito brotes de infección tardía en niños de bajo peso ingresados en unidades de cuidados

intensivos (MacFarghar y cols, 2010, Morinis y cols, 2011). Se han sugerido como posibles vías de transmisión la leche y las manos del personal sanitario (Jordan y cols, 2008).

La **bacteriemia** sin foco es la presentación más común de la infección de comienzo tardío. Sin embargo la presentación en forma de meningitis es más común en la enfermedad de comienzo tardío que en la de comienzo precoz (Heath y cols, 2004; Jordan y cols, 2008). Algunas meningitis de comienzo tardío presentan un desarrollo fatal rápido o pueden dar lugar a graves secuelas neurológicas (Edwards, Nizet y Baker, 2006). En ocasiones puede aparecer un foco en la inserción de catéter intravascular o tejidos blandos. Los signos iniciales incluyen fiebre, irritabilidad, letargia o ambos además de taquipnea y una pobre alimentación. En algunos casos puede aparecer afectación de vías respiratorias superiores aunque los gruñidos y apnea son menos comunes que en la infección de comienzo precoz (Edwards, Nizet y Baker, 2006).

Los **serotipos** Ia, III y V están asociados en un 78-87% a enfermedad de comienzo precoz y mujeres gestantes; sin embargo los serotipos III y V son los habitualmente asociados a enfermedad de comienzo tardío (Shet y Ferrieri, 2004, Phares y col, 2008), siendo el serotipo III el predominante en ambos casos (Noya y cols., 1987, Weisner y cols, 2004; Phares y cols, 2008).

En un 0,5-3% de los casos aparecen recaídas o recrudescencias de las infecciones de comienzo precoz o tardío por SGB. Las circunstancias que pueden favorecer esta situación pueden ser mastitis materna, ataques prolongados en niños con absceso cerebral o endocarditis de origen congénito (Edwards y Baker, 2006). El hecho de que la colonización por SGB de las mucosas (faríngea o gastrointestinal) permanezca en niños tratados por una infección invasiva puede ser la fuente de nuevos episodios de bacteriemia (Moylett y cols, 2000). En muchos casos los niños infectados por SGB serotipo III, no desarrollan niveles adecuados de anticuerpos durante la convalecencia (Denning y cols., 1988). Se ha visto que en la mayoría de las ocasiones los aislados de los segundos episodios de bacteriemia son genótipicamente

idénticos a los del episodio inicial, de lo que se deduce que las infecciones recurrentes resultan de la reinvasión a partir de las membranas que permanecen colonizadas. Un porcentaje minoritario de los aislados del segundo episodio pertenecen a cepas distintas. (Green y cols., 1994; Edwards Nizet y Baker, 2006).

I.5. Métodos de detección e identificación de SGB

I.5.1. Cultivo

SGB es un microorganismo con pocos requerimientos nutricionales. Puede desarrollarse en medios de cultivo relativamente simples, si bien el enriquecimiento con sangre, suero o glucosa favorece su crecimiento (Milligan y cols., 1978; Rufo, en Murray 1995).

La dificultad que ofrecen los medios no selectivos en la identificación de SGB es el sobrecrecimiento de microbiota del lugar anatómico de la muestra. Por ello generalmente se utilizan medios de cultivo selectivos y/o diferenciales.

Medios selectivos

Se han ensayado diferentes combinaciones antibióticas para inhibir el crecimiento de la microbiota acompañante en las muestras clínicas como gentamicina y ácido nalidíxico (Baker y cols., 1973; Easmon y cols., 1983). También se utilizan colistina y ácido nalidíxico (Fenton y Harper, 1979), polimixina B, ácido nalidíxico y cristal violeta (Gray y cols., 1979).

En general se recomienda inocular las muestras en caldos selectivos como Todd-Hewitt suplementados con gentamicina (8 µg/ml) y ácido nalidíxico (15 µg/ml) o con colistina (10 µg/ml) y ácido nalidíxico (15 µg/ml), (Fenton y cols, 1979) adicionados o no de sangre. Estos medios se incuban durante 18-24 horas a 35-37°C en un ambiente con un 5% de CO₂ y posteriormente se subcultivan en placas de agar sangre para identificar colonias con morfología compatible con SGB.

Los medios selectivos facilitan el aislamiento del microorganismo e incrementan su recuperación de muestras en las que se encuentre en poca

cantidad, pero no aceleran la identificación, que tiene que realizarse con posterioridad.

Medios diferenciales

El primer medio diferencial para SGB fue descrito en 1977, basado en la detección del pigmento rojo-anaranjado específico (Islam, 1977) y que ha supuesto el origen de otros muchos medios sólidos, semisólidos y líquidos, que se basan en la producción y detección del pigmento rojo-anaranjado, incorporando además agentes selectivos para inhibir el crecimiento de la microbiota de la muestra (Wang y cols., 1988).

En 1983 de la Rosa y cols diseñaron un medio de cultivo selectivo y diferencial, el medio Granada basado en la utilización de altas concentraciones de almidón como agente gelificante y en la acción del trimetoprim (TMP) como factor activador de la producción del pigmento (de la Rosa y cols., 1983). El efecto potenciador de la producción del pigmento obtenido con inhibidores de la ruta del folato como TMP y sulfadiazina (SDZ) se observa cuando el medio es incubado en anaerobiosis, atmósfera que por otra parte produce una inhibición del crecimiento de parte de la microbiota acompañante.

En 1992 de la Rosa y cols describieron un nuevo medio de cultivo: nuevo medio Granada, selectivo y diferencial, que utiliza agar como gelificante por lo que es más sencillo de elaborar, y basado entre otros factores en la acción del metotrexato como factor activador de la producción del pigmento (de la Rosa y cols., 1992). Su empleo como medio semisólido en tubo inoculado en aerobiosis y como medio sólido en placa incubada en anaerobiosis ha demostrado una sensibilidad del 95-98%.(de la Rosa y cols., 1992).

El nuevo medio Granada (en adelante "medio Granada") permite detectar SGB directamente a partir de muestras vaginorrectales con un rendimiento similar al de los caldos selectivos de enriquecimiento. La inoculación directa permite acortar el tiempo necesario para obtener un resultado, y la identificación mediante visualización del pigmento rojo específico

evita la necesidad de realizar identificación mediante pruebas auxiliares (Gupta y cols, 2004). También se ha ensayado la técnica de inoculación de un medio de cultivo adicional como CNA (agar sangre suplementado de colistina y ácido nalidíxico) o agar sangre en paralelo a la incubación en caldo selectivo, de modo que este último pueda ser descartado si las colonias de SGB aparecen y son identificadas en él en el plazo de 24 horas (Dunne y Holland-Staley, 1998).

Recientemente se han desarrollado medios cromogénicos para SGB, en los que el aspecto de las colonias varía según el fabricante.

Tanto la guía elaborada por los CDC como el documento consenso español para la prevención de la infección neonatal por SGB recomiendan la incubación de las muestras en un caldo de enriquecimiento como Todd-Hewitt o Lim y su posterior subcultivo en agar sangre. De forma alternativa también puede realizarse la incubación en medio líquido Granada, que permite un enriquecimiento selectivo e identificación simultáneos. (CDC, 2010; Alós y cols, 2012). Por su parte el documento consenso español de 2012 ofrece como alternativa la inoculación tras enriquecimiento en caldo selectivo en placas de medio Granada en anaerobiosis, agar sangre selectivo o medio cromogénico o bien la siembra directa en placa de medio Granada en anaerobiosis (esta última opción bajo estrictos controles de calidad del medio para comprobar sus sensibilidades) (Alós y cols, 2012).

1.5.2. Detección por métodos moleculares

Algunos autores han demostrado que las técnicas genéticas para la identificación de SGB son tan sensibles como el cultivo (Uhl y cols., 2005; Haberland y cols., 2002), si bien algunos estudios han demostrado sensibilidades y especificidades por debajo del 80% (CDC, 2010).

El uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés “polymerase chain reaction”) se ha ido extendiendo en microbiología en los últimos años. La principal ventaja teórica de un diagnóstico por técnicas

moleculares es la rapidez. Estas técnicas podrían ser utilizadas en el momento del parto (Bergeron y cols., 2000; Uhl y cols., 2005). Una serie de factores como el elevado coste y/o la escasa disponibilidad de métodos moleculares automatizados con adecuada sensibilidad que garanticen la disponibilidad del mismo durante las 24 h del día, hacen difícil por ahora su generalización (CDC,2010). Ello hace que el cultivo siga constituyendo el método de referencia para detectar SGB en muestras clínicas (CDC, 2010 Alós y cols, 2012 .

Algunos SGB no tienen capacidad de producir pigmento por lo que no pueden ser identificados mediante los medios específicos diseñados para detectar el pigmento. En estos casos serán especialmente útiles las técnicas moleculares.

Se han utilizado diferentes dianas dentro del genoma de SGB para el diseño de cebadores para PCR. Los genes que codifican el factor CAMP (genes *cfb*) están virtualmente presentes en todos los aislados de SGB, (Ke y cols., 2000), por lo que se han usado como dianas para PCR, con una sensibilidad del 75-100% y una especificidad del 80-100% con respecto al cultivo (Rallu y cols, 2006; Straka y cols, 2004). Otras secuencias diana estudiadas para este propósito son las secuencias específicas del ARN ribosómico 16S, espaciador intergénico 16S-23S (Meiri y cols, 2002) y el gen *scp-B* (Dimitriev y cols., 2004) obteniéndose una sensibilidad y especificidad del 99,6% y 100% respectivamente (Elbaradie y cols, 2009).

Aunque los métodos de PCR convencional, PCR simple, PCR anidada, etc., fueron los primeros introducidos en microbiología clínica, poseen una serie de inconvenientes, principalmente en lo que respecta al problema de contaminación y tiempo total requerido para completar el procedimiento que hoy día han sido solventados por la PCR en tiempo real (PCR-TR).

1.5.2.1. PCR en tiempo real (PCR-TR)

La PCR-TR permite la amplificación y detección (mediante lectura de fluorescencia) de forma simultánea. El procedimiento se realiza en un aparato que es termociclador (para llevar a cabo la amplificación) y fluorímetro (para la

lectura de la fluorescencia emitida en cada ciclo de PCR). Por tanto, no requiere de un proceso posterior de lectura lo cual acorta el procesamiento y reduce el riesgo de contaminación. La detección se basa en la lectura de la fluorescencia emitida por determinadas moléculas con diversos mecanismos de emisión de fluorescencia. En función de éstos, se han descrito diferentes tecnologías para detectar el amplificado en una PCR-TR: detección mediante colorantes fluorescentes como SYBR green I, que se une específicamente al ADN de doble cadena o mediante sondas marcadas con varios fluoróforos que actúan como donadores o aceptores de energía de resonancia fluorescente cuando son excitados y emisores de fluorescencia, la cual recoge el aparato. En cualquier caso, a medida que progresa la PCR aumenta el nº de amplicones susceptibles de producir fluorescencia por una o otra tecnología. Esto genera una curva de fluorescencia típica en los casos positivos (figura I.1).

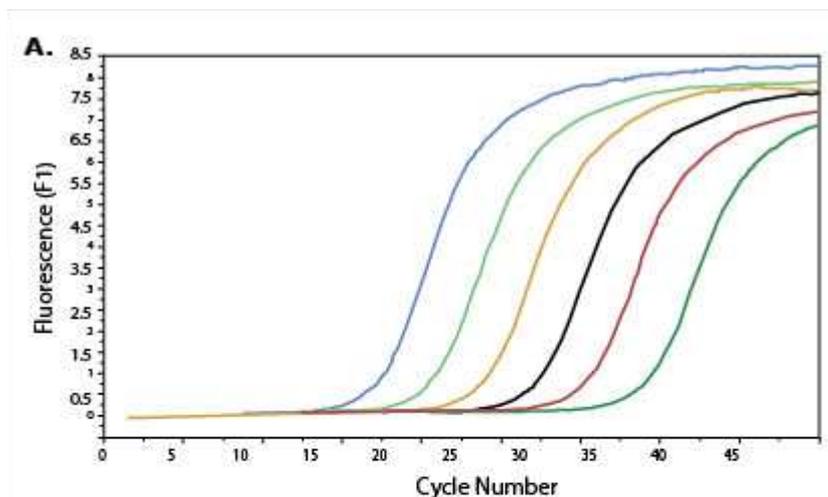


Figura I.1. Curva de fluorescencia de PCR-TR con tecnología Sybr Green

La sensibilidad de la PCR-TR descrita por los estudios realizados es apropiada para la detección directa en muestras clínicas (Ke y cols., 2000). Se han descrito ensayos de detección de SGB por PCR en muestras como líquido amniótico (Straka y cols., 2004), sangre (Golden y cols., 2004) y escobillones vaginorrectales (Bergeron y cols., 1999).

En teoría, la rapidez de este método de detección puede tener beneficios potenciales en partos prematuros. Esto también podría reducir el número de mujeres que reciben antibióticos de forma inapropiada y evitar los posibles

efectos adversos (Benitz y cols., 1999). El beneficio puede extenderse a todas aquellas gestantes con un pobre cuidado prenatal, ya que las muestras podrían obtenerse en el momento del ingreso y tener el resultado disponible en un periodo corto de tiempo (Ke y cols., 2000). La rapidez puede incrementarse mediante la utilización de métodos automáticos de extracción de ácidos nucleicos.

Se han desarrollado algunos sistemas automatizados de detección de SGB directamente desde muestras vaginorrectales como Cepheid XpertGBS, que integra la lisis y purificación de ácidos nucleicos y la PCR-TR y detección de fragmentos del gen *cfb* de SGB, o el sistema IDI-Strept B test, que ha sido aprobado por la FDA para el diagnóstico de SGB.

Si se realiza un estudio coste-beneficio, el valor de la estrategia basada en la detección de la colonización por PCR y la basada en el cultivo se igualan cuando la PCR tiene una sensibilidad cercana al 90%. Los beneficios de la PCR aumentarían cuando las tasas de colonización se incrementaran y la estancia de los niños RNs sanos se reduciría. Según Haberland y cols., si la sensibilidad y especificidad de la PCR superan el 94%, el valor global de la estrategia basada en PCR en el momento del parto es mayor que la del cribado universal por cultivo en la semana 35-37 y la basada en factores de riesgo (Haberland y cols., 2000).

1.5.2.2. Métodos moleculares de identificación y caracterización de SGB

Con fines epidemiológicos y de investigación se utilizan otro tipo de métodos basados en técnicas moleculares.

- Multilocus sequence typing (MLST). Es una técnica basada en la amplificación y secuenciación de secuencias de unos 500 pb de 7 genes que codifican para enzimas metabólicas. La variabilidad que proporcionan los distintos perfiles obtenidos se ha usado para tipar e investigar la estructura poblacional de algunas bacterias patógenas para humanos (Maiden y cols., 1998). Ciertos perfiles pueden ser asociados con cepas que causan enfermedad neonatal invasiva (Jones y cols., 2003).

- Electroforesis en campo pulsátil (PFGE): También es útil para definir la diversidad de SGB. Los distintos perfiles de digestión con enzimas de restricción dan lugar a diferentes patrones, grupos y marcadores que se relacionan con el serotipo (Rollan y cols., 1999). Estos marcadores filogenéticos han sido utilizados para identificar cepas de SGB que sean capaces de invadir el sistema nervioso central en niños (Rolland y cols., 1999; Dimitriev y cols., 2002)

1.5.3. Otros métodos de detección

Se han descrito métodos rápidos a partir de escobillones cervicales o vaginales para evaluar el estado de colonización en el momento del parto, como métodos de detección de antígeno y métodos de hibridación de ADN. Los métodos de detección de antígeno han demostrado una buena especificidad (95-97%) pero sensibilidad muy variable (dependiendo del grado de colonización), que en la mayoría de los casos es insuficiente (oscilando entre el 12% y el 67%). Se han descrito métodos de aglutinación con látex, enzimo-inmunoanálisis, ensayos inmuno-ópticos, etc. (Kontrick y cols., 1990; Skoll y cols., 1991; Tuppurainen y cols., 1989; Greenspoon y col., 1991; Green y cols., 1993).

Las últimas recomendaciones de los CDC proponen como prueba diagnóstica la aglutinación directa con látex desde el caldo de enriquecimiento tras incubación (CDC, 2010), sin embargo el documento consenso español no recomienda en la actualidad su utilización en nuestro medio (Alós y cols., 2012)., y en caso de utilizarse, el estado de portadora de la gestante debe confirmarse mediante cultivo.

1.6. Protocolo de actuación para la prevención de la infección neonatal por SGB

La prevención de la infección neonatal por SGB se lleva a cabo mediante una doble estrategia de profilaxis en las madres colonizadas y vigilancia y manejo del neonato.

I.6.1. Profilaxis antibiótica intraparto

La profilaxis antibiótica intraparto de madres colonizadas y/o con factores de riesgo de transmisión vertical de SGB al neonato es la estrategia recomendada para la prevención de la sepsis neonatal. Los primeros ensayos asumían un 100% de efectividad de la profilaxis intraparto, aunque posteriores estudios han demostrado una efectividad cercana al 90% (CDC, 2010).

Las primeras guías de los CDC recomendaban el uso de una de las 2 siguientes estrategias para prevenir la sepsis neonatal mediante profilaxis intraparto: una estrategia basada en los factores de riesgo y la otra, basada en el cribado universal de SGB mediante cultivo (CDC 1996). Posteriormente se demostró que la estrategia basada en el cribado de SGB detectaba un mayor porcentaje de mujeres con riesgo de transmitir la bacteria a su RN.

Los RNs de embarazadas sin factores de riesgo y colonizadas por SGB presentan una probabilidad de padecer infección neonatal 25 veces mayor que las madres que presentan factores de riesgo sin estar colonizadas (Boyer y cols., 1985), la presencia de factores de riesgo en ausencia de colonización no aumenta la posibilidad del RN de sufrir infección precoz por SGB. De hecho, sólo en menos de la mitad de los RNs que se infectan durante el parto existen factores de riesgo. (Schrag y cols., 2002).

Por ello, los CDC revisaron sus guías y recomendaron el cribado universal como estrategia de identificación de candidatas a recibir profilaxis intraparto (CDC 2002). Sólo aquellas mujeres con estado de colonización desconocido en el momento del parto serían manejadas en función de la presencia de factores de riesgo (CDC 2010).

I.6.1.1. Estrategia basada en los factores de riesgo

Los principales factores de riesgo que se consideran a la hora de recomendar una profilaxis intraparto son: parto prematuro, rotura prematura de membranas > 18 h y fiebre intraparto.

Existe una relación inversa entre la duración del intervalo de rotura de membranas y el parto y el momento de aparición de los síntomas de la bacteriemia por SGB en el RN, lo que indica que la exposición continua en el útero incrementa el riesgo de una infección diseminada (Tseng y cols, 1974). Regan y colaboradores (1996) encontraron que una alta colonización en el segundo trimestre de la gestación se relaciona con un incremento del riesgo de parto prematuro o bajo peso del RN. Ambos factores aparecen a menudo factores de forma concomitante lo que contribuye a un incremento del riesgo de infección probablemente a causa de la inmadurez del sistema inmunitario del RN. Se estima que la incidencia de la infección de comienzo precoz en niños prematuros es 15 veces superior que en RNs a término (Aber y cols., 1976; Pass y cols., 1982; Baker y cols, 1988)

La fiebre intraparto junto con el hecho de haber tenido un hijo con enfermedad por SGB anteriormente, son los factores de riesgo más relacionados con la enfermedad de comienzo precoz (Schrag y cols., 2002).

1.6.1.2. Estrategia basada en el cribado prenatal

Este enfoque se basa en la realización de un cribado universal prenatal para detectar la colonización vaginorrectal por SGB a todas las embarazadas entre las semanas 35 y 37 de la gestación.

La estrategia basada en el cribado universal para la prevención de la enfermedad precoz por SGB ha conseguido un descenso importante en el número de enfermedades cuando ha sustituido a la estrategia basada en factores de riesgo en la prevención de la infección neonatal, ya que éstos en muchos casos no se identifican (Hafner y cols., 1998). Entre las madres cuyos hijos presentan enfermedad temprana por EGB más de 60% no presentaban evidencias de factores de riesgo (CDC, 2010). Se considera que una estrategia basada en los factores de riesgo puede prevenir el 50% de los casos de Enfermedad neonatal precoz (Vergnano y cols., 2009)

Las mujeres con cultivo positivo son candidatas a recibir profilaxis intraparto (Schrag y cols., 2002). La estrategia de prevención basada en el

cribado universal es un 50% más efectiva que la basada en la identificación de los factores de riesgo en la prevención de la enfermedad perinatal (Schrag y cols., 2002).

La estrategia basada en el cribado prenatal se resume en la figura I.2.

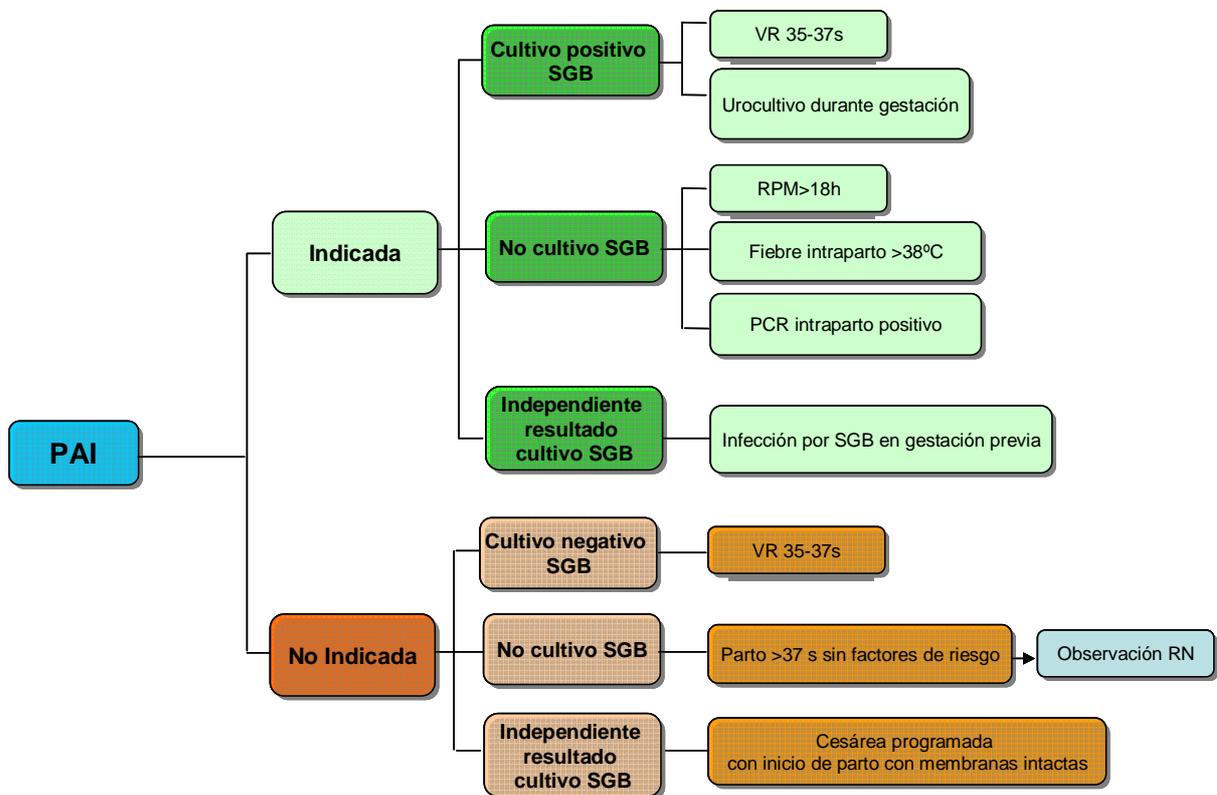


Figura I.2. Estrategia basada en el cribado anteparto para la prevención de la enfermedad perinatal por SGB (tomado de Alós y cols, 2012)

PAI: Profilaxis antibiótica intraparto; RPM: Rotura previa de membranas; VR: Vagino-rectal; s: semanas; RN: Recién nacido; h: horas

Independientemente de la estrategia utilizada, la profilaxis intraparto se recomienda a todas las mujeres con bacteriuria por SGB durante el embarazo, sin necesidad de realizar cribado vagino-rectal en la semana 35-37 (Alós, 2012). La infección por SGB en partos anteriores es indicativa de un bajo título de anticuerpos protectores frente a SGB. El diagnóstico de la bacteriuria causada por SGB en la gestante tiene interés por las complicaciones perinatales que puede ocasionar. Se sabe que los niños de madres que han sufrido algún episodio de bacteriuria durante el embarazo presentan una

colonización más alta y frecuente y son más propensos a desarrollar infección por SGB (Persson y cols., 1986).

Uno de los factores relacionados con un mayor el riesgo de enfermedad en el RN es el serotipo. El serotipo III, es el que aparece en la mayoría de las infecciones de comienzo precoz y prácticamente en todas las de comienzo tardío. Las gestantes con niveles bajos de anticuerpos frente a serotipo III son más propensas a dar a luz a niños con infección neonatal (Baker y Kasper, 1976, 1977, Bhushan y col., 1998).

I.6.1.3. Recomendaciones españolas actuales de profilaxis antibiótica intraparto en la prevención de sepsis neonatal precoz por SGB

Las recomendaciones de profilaxis antibiótica intraparto no son eficaces en la prevención de la sepsis neonatal tardía, por lo que estas recomendaciones no se aplican a estos casos.

Las indicaciones actuales de profilaxis intraparto en España se basan fundamentalmente en el cribado universal y en ausencia de éste, en los factores de riesgo de la madre. Estas indicaciones quedan recogidas en el documento de consenso para la prevención de la infección perinatal elaborado por la Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología (SEGO), Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Sociedad Española de Quimioterapia (SEQ) y Sociedad Española de Medicina Familiar y Comunitaria (SEMFyC) (Alós y cols, 2012) son:

- a) Independientemente de la edad gestacional:
- Todas las mujeres identificadas como portadoras vaginales o rectales de SGB en un cultivo realizado dentro de las cinco semanas previas al parto.
 - Todas las mujeres en que se detecte SGB en orina durante la gestación, independientemente del resultado del cultivo vaginal o rectal si se ha realizado.
 - Todas las gestantes que previamente hayan tenido un hijo con infección neonatal por SGB, independientemente del resultado del cultivo vaginal o rectal si se ha realizado.

- Todas las mujeres con rotura de membranas superior a 18 horas cuando no se disponga del resultado del cultivo.
- Todas las mujeres con fiebre intraparto ($>38^{\circ}\text{C}$), con posibilidad de corioamnionitis u otra infección materna.

- b) Partos de <37 semanas de gestación cuyo estado de colonización por SGB se desconozca.
- c) Partos de >37 semanas de gestación sin ningún factor de riesgo, en el caso de que se desconozca si la madre es portadora de SGB.

La profilaxis no está indicada en los siguientes casos:

1. Cultivo vaginal o rectal negativos para SGB en la presente gestación en un cultivo realizado dentro de las cinco semanas anteriores al parto, aunque existan factores de riesgo o hayan sido positivos en embarazos anteriores.
2. Cesárea programada en mujer con cultivo positivo para SGB sin comienzo del parto y membranas íntegras.

1.6.1.4. Pautas de profilaxis antibiótica

Basándonos en la prevalencia de la colonización en mujeres embarazadas, aproximadamente entre un 20 y un 25% de ellas tienen indicaciones de profilaxis intraparto. La duración y el número de dosis administradas antes del parto son factores importantes a la hora de reducir fracasos en el tratamiento intraparto. La efectividad de la profilaxis intraparto es del 86-89% cuando la primera dosis se da al menos 4h antes del momento del parto y de 71% cuando se administra dentro de las dos últimas horas (Lin y cols. 2001).

El antibiótico de elección es la penicilina G (5 MU + 2,5 MU cada 4 h hasta la conclusión del parto). La ampicilina es una buena alternativa y la cefazolina puede utilizarse en pacientes con hipersensibilidad moderada a beta-lactámicos.

En casos de hipersensibilidad a penicilina se puede utilizar clindamicina intravenosa (900 mg cada 8 horas) hasta la conclusión del parto, aunque estos regímenes parecen incrementar la resistencia in vitro de las cepas de SGB (Fernández y cols., 1998; Schauf y cols., 1976; Deveikis y cols., 1977) y hay pocos datos sobre su efectividad. En casos en los que no se disponga de los datos de sensibilidad, las recomendaciones de los CDC desaconsejan la utilización de eritromicina por las elevadas tasas de resistencia actuales. (figura I.4).

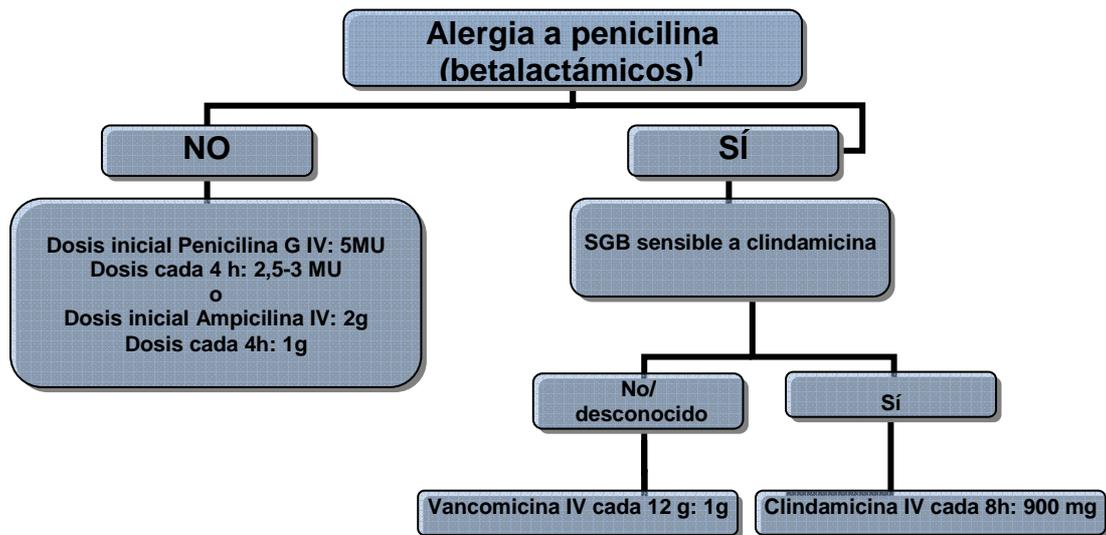


Figura I.3. Algoritmo de tratamiento de recomendaciones de tratamiento antibiótico para profilaxis intraparto. ¹En caso de pacientes con poco riesgo (que no han presentado en aplicaciones anteriores de penicilina o cefalosporinas historia de anafilaxia, angioedema, urticaria o dificultad respiratoria) podría utilizarse a criterio 2 g de Ampicilina IV seguida de 1 g cada 4 horas (tomado de Alós y cols, 2012)

I.6.2. Manejo del neonato

No se recomienda la administración de antibióticos a los RNs de madres colonizadas. Esta estrategia está asociada a un incremento del 40% en la mortalidad a pesar de reducir el índice de infección por SGB en un 68% (Benitz y cols., 1999). El procedimiento seguido con los RNs de madres colonizadas, dependiendo de las circunstancias en que se desarrolla el parto es el siguiente (figural.5):

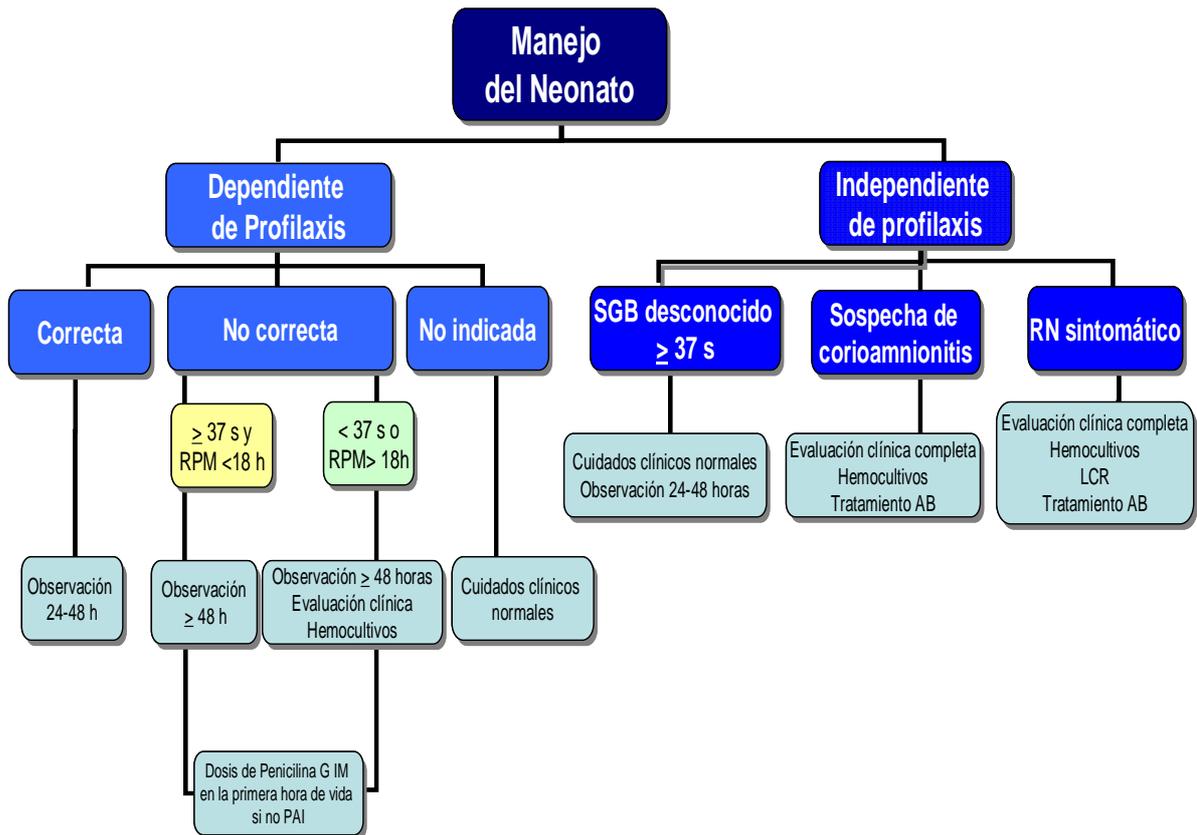


Figura I. 4. Manejo del neonato de madre colonizada por SGB
(Tomado de Alós y cols, 2012).

I.6.3. Inmunoprofilaxis

La implementación de la profilaxis antibiótica intraparto ha resultado en una reducción sustancial de la enfermedad por SGB pero es incapaz de prevenir la mayoría de las enfermedades de comienzo tardío, los abortos o la prematuridad relacionados con SGB, además de no ser útil en la enfermedad en adultos.

Un título bajo de anticuerpos maternos frente a SGB es un factor determinante en el desarrollo de la infección en el niño. Teóricamente sería posible prevenir la infección neonatal por SGB mediante la vacunación de las embarazadas, pero este enfoque, aunque prometedor, no está suficientemente contrastado para su utilización clínica, debido en muchos casos a la variabilidad de resultados en algunos ensayos (Schuchat, 1999; Baker y cols., 2003, Schrag y cols., 2002; Paoletti y cols, 2002).

Los anticuerpos específicos frente a los polisacáridos capsulares de SGB parecen mostrar protección frente a la enfermedad. La respuesta inmunológica en individuos con anticuerpos preexistentes alcanza aproximadamente el 100%, pero en individuos no inmunes va del 40% al 85%. Muchos de los polisacáridos son poco inmunógenos en adultos, por lo que se han desarrollado conjugados de éstos con toxoide tetánico u otros adyuvantes que han demostrado ser más inmunógenos y seguros (Wessels y cols., 1990; Madoff y cols., 1994). Los ensayos realizados en fase 1 y 2 sobre mujeres sanas y no embarazadas parecen mostrar que las vacunas con antígenos de serotipos de SGB asociados a enfermedad son bien tolerados e inmunógenos. Se está desarrollando una nueva generación de vacunas que incorporan proteínas de superficie y pili de SGB junto a los polisacáridos capsulares, con lo que podrían ser la solución al problema de la variabilidad geográfica de la distribución de serotipos capsulares (Rodríguez-Granger y cols, 2011).

La administración de vacunas multivalentes durante el tercer trimestre del embarazo teóricamente podría lograr una concentración de anticuerpos específicos suficiente para proteger al feto de la enfermedad temprana y tardía. Los anticuerpos generados son del tipo IgG₁ e IgG₂ que atraviesan la barrera placentaria y persisten más de 10 años tras la inmunización (Baker y cols, 2000). Esto podría eliminar la necesidad del cribado prenatal y la profilaxis intraparto con su consiguiente coste y potenciales efectos adversos.

Un reto para demostrar la eficacia de la vacuna para prevenir la enfermedad por SGB es la extensa muestra requerida. Además, una de las dificultades más importantes es la dificultad para realizar ensayos de la vacuna es la población a la que va dirigida, que incluye adolescentes, mujeres en edad fértil y niños.

II. Objetivos

La capacidad de disminuir el riesgo de transmisión de SGB en el momento del parto depende del rendimiento del cribado prenatal entre las semanas 35 y 37 de la gestación. Por tanto la confirmación de la fiabilidad de dicho cultivo como predictor de la colonización intraparto ofrece la posibilidad de evaluar la eficacia de dicha medida de prevención. Por otra parte la comparación de los métodos tradicionales basados en el cultivo frente a los métodos moleculares, podría permitir determinar qué técnicas diagnósticas ofrecen mayores ventajas y por tanto mayores beneficios en la práctica clínica.

La ausencia de colonización en un RN de madre portadora de SGB por una adecuada profilaxis intraparto en la madre con cribado prenatal positivo hace del cribado universal la mejor estrategia para prevenir la sepsis neonatal por SGB.

Por ello, los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1. Determinar la fiabilidad del cultivo en la semana 35-37 como predictor de la colonización intraparto, comparándolo con el cultivo vaginal en el momento del parto.
2. Comparar la PCR-TR frente al cultivo convencional en medio Granada como métodos para la detección de la colonización por SGB en el momento del parto.
3. Analizar la relación entre la detección de SGB mediante cultivo y PCR-TR con la colonización en el RN.
4. Analizar la relación entre la profilaxis intraparto y la colonización por SGB en el RN.

III. Material y métodos

III. 1. **Ámbito de estudio**

La población de estudio estaba constituida por las mujeres gestantes del Área Sanitaria Norte de Granada con pródromos de parto que acudieron al Hospital Universitario Virgen de las Nieves (HUVN), así como los RN de madres portadoras de SGB, en el periodo de estudio comprendido entre octubre de 2004 y junio de 2005.

III.2. **Muestras**

III.2.1. **Tipo de muestra**

Se recogieron muestras de **escobillones vaginorrectales** en las madres, tomados en dos momentos:

1. Entre las semanas 35-37 de gestación, dentro del protocolo de cribado de portadoras de SGB (en adelante “cribado”).
2. En el momento del ingreso con pródromos de parto (en adelante “intraparto”).

Se obtuvieron **muestras de orina** anteparto para el estudio de bacteriuria asintomática.

Se obtuvieron muestras de **frotis ótico, faríngeo y umbilical de los RNs** de madres con cribado positivo para evaluar la colonización por SGB en los mismos.

III.2.2. **Recogida y transporte de muestras**

Para la toma de muestra vaginorrectal se recogió un escobillón de la parte baja de la vagina (introito vaginal), seguido de una toma del recto, introduciéndolo a través del esfínter anal, utilizando un mismo escobillón para ambas tomas (escobillón vaginorrectal). La muestra intraparto se tomó por duplicado. Uno de los escobillones se utilizó para realizar el cultivo y el otro para la PCR-TR. Los escobillones se remitieron al laboratorio en medio de transporte no nutritivo de Amies.

Para la toma de la muestra de orina se entregaron las siguientes recomendaciones a las gestantes:

- Utilizar la primera orina de la mañana
- Utilizar un frasco estéril y no abrirlo hasta el momento de uso
- Si se utilizan frascos con conservantes, seguir las instrucciones del fabricante
- Para la toma de muestra:
 - a) Lavar los genitales externos y zonas próximas con agua y jabón, enjuagar con agua y secar con una gasa o paño limpio, siempre de delante hacia atrás
 - b) Separar los labios vulvares (vaginales) con la mano y comenzar a orinar, despreciando la primera parte de la orina
 - c) Orinar en el frasco estéril (aproximadamente 10 ml), procurando que la orina salga libremente , sin rozar los genitales externos

III.3. Estudio microbiológico

III.3.1. Cultivo

Los escobillones, tanto los vaginorrectales destinados al cultivo, como de exudados periféricos de los RNs, se sembraron en tubos de medio Granada y se incubaron en baño de agua a 37°C.

Las muestras de orina se inocularon en placa de medio Granada y se incubaron en anaerobiosis a 37°C.

III.3.1.1. Elaboración del medio Granada

La composición del medio Granada (de la Rosa y cols., 1992) es la siguiente (tabla III.1):

Tabla III.1. Fórmula para preparación del medio Granada

| | |
|--|------|
| Almidón (Merk 1252) | 10 g |
| Proteosa peptona nº 3 (BD-Difco 211693) | 25g |
| NaH ₂ PO ₄ (Merk 65386) | 8,5g |
| MOPS-sal hemisódica (Sigma m-9027) (a. 2-n-morfolino propanosulfónico) | 11g |
| Agua destilada | 1 L |
| Suplemento 100X* | 10ml |
| Agar bacteriológico nº 1 (Oxoid) | 10g |
| pH 7,4 ± 0,1 | |

Para la preparación de 1 L de medio: disolver los componentes en 1L de agua destilada, calentando suavemente con agitación, autoclavar a 0,5 atm/ 20 min (o 1 atm/ 7 min), dejar enfriar a 50-55 °C y añadir 10 ml de suplemento 100X (tabla III.2) filtrado y 50 ml de suero de caballo.

Tabla III.2. Fórmula para preparación del suplemento del medio Granada 100X

| | |
|-----------------------------------|---------------|
| Glucosa (Merk 8342) | 25g |
| Piruvato sódico (Merk 6619) | 10g |
| MgSO ₄ (Sigma m-7506) | 2g |
| Metotrexato sal sódica (Lederle) | 6 mg |
| Cristal violeta (Merk ob 276415) | 2mg |
| Sulfato de colistina (Sigma 1511) | 50mg |
| Metronidazol (Sigma m1547) | 100mg |
| Agua destilada | c.s.p. 100 ml |

III.3.1.2. Lectura de resultados

Se realizó una primera lectura de las muestras a las 18 h para determinar su positividad:

- Se consideraron positivos aquellos escobillones en los que se observó el desarrollo de pigmento naranja en el medio.

- Se consideraron negativos aquellos escobillones en los que no se observó la aparición del pigmento naranja (figura III.1).

Los cultivos negativos a las 18 h se reincubaron hasta las 48 h en una estufa a 37°C.

Las muestras que no presentaron pigmento naranja a las 48 h se consideraron negativas.



Figura III.1 Crecimiento de SGB en placa y tubo de medio Granada

II.3.2. PCR en tiempo real

III.3.2.1. Extracción de ácidos nucleicos

El escobillón destinado a la PCR se conservó en su medio de transporte refrigerado a 4°C.

La extracción de ácidos nucleicos se realizó con el sistema Qiamp DNA blood kit (Qiagen). Este método se basa en la propiedad del silica gel de unir ADN junto con la velocidad de centrifugación. Previamente se realiza la lisis de la muestra con tampón AL incluido en el kit. El procedimiento de extracción fue el siguiente:

- El escobillón se introdujo en tubos de tapón de rosca con 600 µl de solución salina estéril y se agitó con vortex. La suspensión se centrifugó 10 min a 3000 rpm.

- Tras descartar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 180 µl de solución de lisozima (25 µg/ml) y se incubó durante 30 min en baño de agua a 37°C para realizar la rotura de la pared bacteriana.
- Se añadieron 20 µl de proteinasa k y 200 µl de tampón de lisis AL y se incubó en termobloque a 56°C durante 30 min y posteriormente a 95°C durante 10 min para inactivar la proteinasa k.
- Se añadieron 200 µl de etanol absoluto y se agitó en vortex.
- El contenido de los tubos se transfirió a una columna de Qiagen para la extracción del ADN y se centrifugó durante 45 seg a 14000 rpm. Se eliminó el tubo colector y se sustituyó por uno nuevo.
- Se añadieron 500 µl de tampón de lavado AW1 y se centrifugó durante 45 seg a 14000 rpm.
- Se transfirió la columna a tubos nuevos y se añadieron 500 µl de tampón de lavado AW2 y se centrifugó durante 3 min a 14000 rpm.
- Se transfirió la columna a tubos nuevos y se centrifugó durante 1 min para eliminar los restos de etanol.
- Se transfirió la columna a tubos de elución y se añadieron 100 µl de tampón AE (incluido en el kit). Se incubó la columna durante 1-4 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 1 min a 14000 rpm para obtener el eluido final que contiene el ADN (figura III.2)

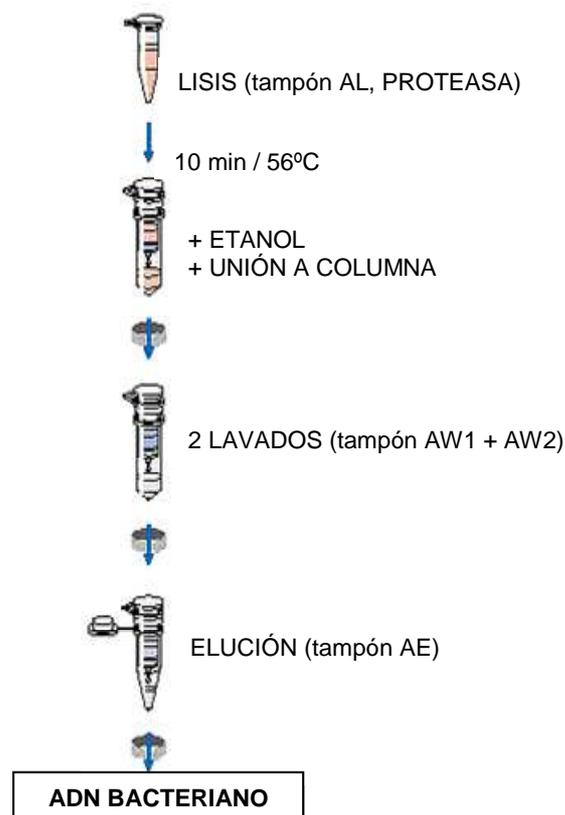


Figura III.2. Esquema de extracción de ADN bacteriano

III.3.2.2. Amplificación de ADN

Para la amplificación del ADN a partir del material extraído se empleó una técnica de PCR-TR utilizando sondas FRET (“fluorescence resonance energy transference”).

El sistema se compone de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN diana, separadas entre sí por un nucleótido. Una de las sondas lleva un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas, los dos fluorocromos están próximos. Al ser excitado, el donador transfiere su energía al aceptor que, a su vez, emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo. La detección se realiza en la fase de hibridación de cada ciclo de PCR (figura III.3).

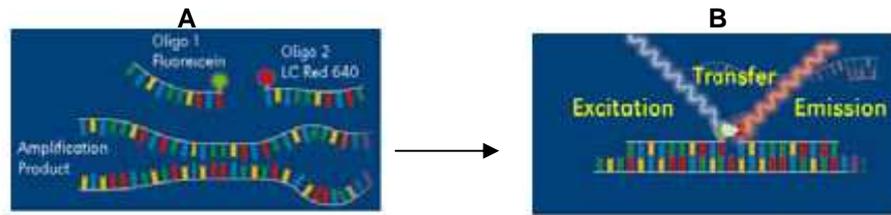


Figura III.3. PCR-TR con sondas FRET. A. Sondas y diana de ADN en solución antes del paso de hibridación. B. Hibridación, transferencia de la energía de resonancia fluorescente y emisión de fluorescencia captada por el fluorímetro

La especificidad de la PCR se determina tras ésta mediante análisis de las curvas de disociación y cálculo de la T_m (temperatura de disociación) específica. Este paso se lleva a cabo sometiendo el producto de la PCR a desnaturalización a 95°C y posterior renaturalización a 40°C . Cuando se somete la muestra a renaturalización, todas las sondas disponibles van a hibridar con los amplicones; en este momento la fluorescencia emitida es máxima ya que las sondas están hibridadas y por tanto, próximas entre sí de forma que la energía de resonancia fluorescente es transferida de la sonda dadora a la aceptora, la cual emite fluorescencia que es recogida por el fluorímetro. A medida que aumenta gradualmente la temperatura, se va produciendo una disminución lenta de la señal de fluorescencia, ya que se van separando las sondas hasta que llega un punto crítico en el que este descenso es abrupto, debido a que el 50% de la sonda se ha separado de los amplicones. La temperatura la que se produce este descenso brusco se denomina temperatura de melting o de disociación (T_m), que se identifica como el punto más alto de la derivada negativa de la curva de desnaturalización. La T_m para el fragmento de SGB amplificado con este método es de $59^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ (figura III.4).

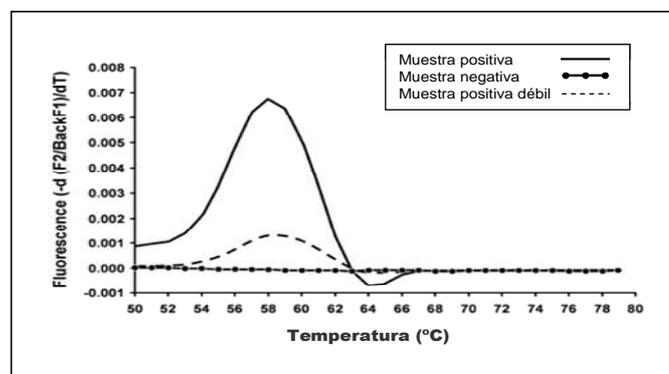


Figura III.4. Curvas de disociación para SGB

La diana es el gen *cfb* que codifica para el factor CAMP. La pareja de cebadores y sondas utilizados fueron desarrollados por Ke y cols (2000) (tabla III.3).

Tabla III.3. Cebadores y sondas usados en la PCR-TR

| Nombre | Secuencia | Posición en el gen | Tm* |
|------------------------|----------------------------------|--------------------|------|
| Cebador SGB-FOR | TTTCACCAGCTGTATTAGAAGTA | 369 | 57,4 |
| Cebador SGB-REV | GTTCCCTGAACATTATCTTTGAT | 522 | 57,4 |
| Sonda SGB-FLU | AAGCCCAGCAAATGGCTCAA-FAM | 447 | 60,6 |
| Sonda SGB-LC640 | LC640-GCTTGATCAAGATAGCATTGAGTTGA | 469 | 64,6 |

*Temperatura de melting o de disociación (°C); FAM, 6-fluoresceína; LC640, LightCycler® Red 640

Los cebadores y sondas fueron sintetizados por Tibmolbiol (Berlín, Alemania)

La PCR-TR se llevó a cabo en un equipo Lightcycler® 1.2. (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), con el kit de amplificación de ADN genérico Lightcycler® Faststart DNA Master^{plus} HybProbe (Roche Diagnostics). La preparación de la mezcla de reacción se llevó a cabo con 4 µl del reactivo 1 del kit (enzima Taq DNA polimerasa, tampón de reacción y dNTPs), 6 µl de agua estéril, 0,5 µl de cada cebador a 20 µM (concentración final: 0,5 µM) y 2 µl de cada sonda SGB-LC640 y SGB-FLU a 2 µM (concentración final: 0,2 µM). A cada capilar se añadieron 15 · l de la mezcla de reacción y 5 · l del ADN extraído para obtener un volumen final de 20 · l. Se cerraron con tapón y centrifugaron los capilares durante 5 s para introducir la mezcla de reacción en los mismos.

El aparato se programó con el siguiente método:

- Desnaturalización y activación de la Taq DNA polimerasa a 96°C / 10 min.
- PCR: 50 ciclos de desnaturalización 96°C/ 10 s, hibridación a 55°C/ 10 s y extensión a 72°C/ 20 s. La fluorescencia emitida por la sonda SGB-LC640 en la fase de hibridación de cada ciclo se lee en el canal F2 (640 nm).

-Análisis de las curvas de disociación y cálculo de la Tm: desnaturalización a 95°C/ 0 s seguido de renaturalización a 40°C/ 30 s, y posterior aumento progresivo de la temperatura (rampa de 0,2°C/s) hasta 85°C con monitorización continua de la fluorescencia en el canal F2. El análisis posterior de la curva de disociación te da la Tm.

III.3.2.3. Obtención e interpretación de resultados

Se consideró que la PCR fue positiva cuando se detectaba una curva de fluorescencia típica con un ciclo umbral de detección (Cp, “crossing point”) comprendido entre 18 y 49 y una Tm de 59 °C \pm 2,5°C.

III.4. Registro de datos y análisis estadístico

III.4.1. Registro de datos

Se elaboró una base de datos con el programa File Maker Pro (versión 5.0) en la que se recogieron los datos de las mujeres gestantes y RN incluidos en el estudio. Los datos recogidos se exportaron a una hoja de cálculo MS excel (MS office XP) para su posterior estudio estadístico.

III.4.1.1. Datos demográficos

En la base de datos se recogieron datos demográficos como nombre, apellidos, edad y número de historia clínica de la madre y del niño en el caso de madres colonizadas.

III.4.1.2. Datos clínicos

Se realizó una revisión de las historias clínicas de las gestantes y se recogieron los siguientes datos:

- **Datos del parto y profilaxis intraparto** en el caso de haberse realizado: profilaxis completa o incompleta, antibiótico utilizado y motivo de la profilaxis. La profilaxis intraparto se realiza mediante la administración intravenosa de penicilina o ampicilina cada 4h hasta la conclusión del parto. Se define como profilaxis completa aquella en la que se administran 2 o más dosis durante al menos 4 h y como profilaxis incompleta aquella que se realiza durante menos de 4 h y en la que se administran sólo una dosis de antibiótico.
- **Datos del parto:** tipo de parto, o cesárea en el caso de realizarse.
- **Datos de los RNs:** peso, prematuridad.

III.4.1.3. Datos microbiológicos

- **Datos del cultivo de muestras anteriores a la fecha de ingreso** para la investigación de SGB (fecha, días de gestación, número de muestra y resultados del cultivo):
 - Resultado de SGB en el urocultivo.
 - Muestra vaginorrectal para cribado entre la semana 35-37 de la gestación: número de muestra, días de gestación en el momento de la toma y resultado de SGB. Los resultados fueron codificados como positivo, negativo o desconocido.
- **Datos de la muestra vaginorrectal intraparto:** fecha, días de gestación, número de muestra y resultados del cultivo y PCR para detección de SGB. Los resultados fueron codificados como positivo o negativo.
- **Datos de los cultivos periféricos (ótico, umbilical y faríngeo) de los RNs de madres colonizadas:** número de muestra y resultados de SGB. Los resultados fueron codificados como positivo o negativo.

III.4.2. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la utilización del paquete estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

III.4.2.1. Análisis descriptivo

Se realizó estadística descriptiva de los datos demográficos, epidemiológicos y microbiológicos. Se determinó la media con el intervalo de confianza del 95% (IC₉₅) para las variables numéricas.

Para la evaluación de la influencia del periodo transcurrido entre el cultivo prenatal y el momento del parto en la sensibilidad del cribado para detectar colonización por SGB, se agruparon los periodos en 3 grupos por intervalos de semanas: 1-2 semanas; 3-5 semanas y más de 5 semanas. Como medida de tendencia central se calculó la media y como medida de dispersión se calculó la amplitud intercuartílica.

III.4.2.2. Comparación de los datos clínico-epidemiológicos con los resultados microbiológicos

Los datos clínico-epidemiológicos se compararon con los resultados microbiológicos mediante análisis bivalente utilizando chi cuadrado para variables cualitativas y t de Student (o test no paramétricos de Mann-Whitney cuando fue necesario) para variables cuantitativas como edad o peso.

Los intervalos de confianza se calcularon para el 95% (IC₉₅) y los contrastes estadísticos se consideraron significativos para una $p < 0,05$.

Cuando el número de alternativas de respuesta de una de las variables comparadas en una tabla de contingencia en un análisis era mayor de dos, se utilizaron los residuos tipificados corregidos para identificar entre qué categorías se producen las diferencias significativas, considerando como significativos aquellos valores fuera del rango -1,96, 1,96 (Rodríguez, 2004).

También se realizó el análisis de la razón de probabilidad para un resultado positivo (likelihood ratio o LR+). La magnitud de la LR indica la capacidad de una determinada prueba para confirmar o excluir un diagnóstico, midiendo cuánto más probable es un resultado positivo según la presencia de enfermedad, o en nuestro caso la condición de portadora. Es, en definitiva, el

cociente entre la fracción de verdaderos positivos (sensibilidad) y la fracción de falsos positivos (1-especificidad):

$$LR+ = \frac{\text{Sensibilidad}}{1-\text{Especificidad}}$$

III.4.2.3. Comparación de técnicas para detección de SGB

Se tomó el cultivo en el momento del ingreso por parto en curso como técnica de referencia para determinar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos del cribado y de la PCR-TR en el momento del parto.

Como medida para determinar el grado de concordancia entre técnicas se utilizó el índice kappa, siguiendo la clasificación de Landis y Koch (Landis y Koch, 1977) (tabla III.4).

Tabla III. 4. Clasificación del grado de acuerdo del índice kappa según la clasificación de Landis y Koch (Landis y Koch, 1977)

| Kappa | Grado de concordancia |
|--------------|------------------------------|
| < 0 | Sin acuerdo |
| 0 - 0,2 | Insignificante |
| 0,2 - 0,4 | Bajo |
| 0,4 - 0,6 | Moderado |
| 0,6 - 0,8 | Bueno |
| 0,8 - 1 | Muy bueno |

Además se determinó la sensibilidad y los valores predictivos del cribado en función del tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y el momento del parto. Para ello, este periodo se categorizó en semanas y se compararon los resultados del cribado con el cultivo intraparto.

IV. Resultados

IV.1. Resultados globales

Durante el periodo de estudio se recibieron 2702 muestras de gestantes que ingresaron en el Servicio de Urgencias del HUVN por pródromos de parto o parto en curso.

La tasa de colonización determinada por los datos del cultivo intraparto fue del 16,6% (tabla IV.1).

Tabla IV.1. Resultados del cultivo de SGB en el momento del parto en 2702 gestantes (octubre 2004-junio 2005)

| SGB intraparto | N | (%) |
|-----------------------|----------|------------|
| Positivo | 449 | 16,6 |
| Negativo | 2253 | 83,4 |
| Total | 2702 | 100 |

Se conocía la edad de las gestantes en 855 casos. La edad media de las gestantes fue de 29,8 años (IC₉₅: 29,4-30,1), dentro de un rango entre 13 y 44 años. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el resultado del cultivo en el momento del ingreso entre las gestantes por edad ($p=0,09$).

IV.2. Validación del cribado como predictor de la colonización intraparto

Se obtuvieron los datos del cultivo para el cribado de SGB en la semana 35-37 de 1808 gestantes. En 896 casos (33,1%) no se pudo obtener el dato del cribado prenatal.

La distribución de los casos en función del resultado del cribado prenatal fue la que se muestra en la tabla IV.2

Tabla IV.2. Resultados del cribado de SGB en la semana 35-37 de gestación en 1808 gestantes (octubre 2004-junio 2005)

| SGB cribado | N | (%) |
|--------------------|----------|------------|
| Positivo | 292 | 16,1 |
| Negativo | 1516 | 83,9 |
| Total | 1808 | 100,0 |

Comparando estos resultados con el cultivo intraparto se obtienen los datos recogidos la tabla IV.3.

Tabla IV.3. Comparación del cribado con el cultivo intraparto para la detección de SGB en 1808 gestantes

| SGB intraparto | SGB cribado | | | | Total | |
|-----------------------|--------------------|----------|-----------------|----------|--------------|----------|
| | Positivo | | Negativo | | n | % |
| | n | % | n | % | | |
| Positivo | 250 | 13,8 | 56 | 3,1 | 306 | 16,9 |
| Negativo | 42 | 2,3 | 1460 | 80,7 | 1502 | 83,1 |
| Total | 292 | 16,1 | 1516 | 83,8 | 1808 | 100 |

De los datos obtenidos se deduce que la sensibilidad del cribado prenatal respecto al cultivo intraparto es de 81,7%, la especificidad de 97,2%, su valor predictivo positivo 85,7% y su valor predictivo negativo es del 96,3%.

El valor de la LR+ fue de 29,2, lo que indica que la probabilidad de una gestante de estar colonizada por SGB en el momento del parto es 29,2 veces mayor si el resultado del cribado es positivo que si es negativo.

El análisis de la concordancia entre ambas técnicas dio un índice kappa de 0,804. Existen 98 casos (5,4% del total) en los que se obtiene discrepancia entre los resultados de ambos cultivos. Un 3,7% de los casos con cribado negativo (56/1516) dio positivo el cultivo intraparto frente a un 2,8% de los casos con cultivo intraparto negativo (42/1502) que dio positivo el cribado.

IV.2.1. Evaluación de la influencia del periodo transcurrido entre el cribado y el momento del parto en la predicción de la colonización por SGB intraparto

Se recogieron datos de la fecha de toma de la muestra de cribado e intraparto. Se hicieron 3 grupos atendiendo a la diferencia en semanas entre la realización del cribado y el momento del parto:

Grupo I: 1-3 semanas

Grupo II: 3-5 semanas

Grupo III: >5 semanas

De los 1808 casos, la toma de muestra para el cribado se hizo como media 3,73 semanas antes del parto (IC₉₅: 3,59-3,86). La amplitud intercuartílica fue de 3, lo que supone que el 50% de los cribados se realizaron alrededor de la tercera semana antes del parto.

La tabla IV.4 muestra los resultados obtenidos en el cribado según el periodo trascurrido entre éste y el momento del parto, así como el porcentaje de detección mediante la técnica de referencia en las mujeres analizadas y los valores de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos del cribado.

Tabla IV.4. Evaluación del rendimiento del cribado de SGB según el periodo transcurrido entre el mismo y el parto

| GRUPO | CULTIVO POSITIVO ¹ | | Total | S | E | VPP | VPN |
|-------|-------------------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | CR | IP | | | | | |
| I | 107 (15,97%) | 111 (16,56%) | 670 | 81,98 | 97,13 | 85,04 | 96,44 |
| II | 160 (15,92%) | 172 (17,14%) | 1003 | 83,13 | 97,95 | 89,37 | 96,55 |
| III | 25 (18,51%) | 23 (17,03%) | 135 | 69,56 | 91,96 | 64,00 | 93,63 |

¹n (%); CR, cribado; IP, cultivo intraparto; S, sensibilidad (%); E, especificidad (%); VPP, valor predictivo positivo (%); VPN, valor predictivo negativo (%)

El análisis de las discrepancias entre los resultados del cribado y del cultivo intraparto en función del periodo transcurrido entre la toma de muestra

para ambas determinaciones demostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos establecidos (tabla IV.5)

Tabla IV.5. Discrepancias entre los resultados del cribado y el cultivo intraparto por grupos de periodo transcurrido entre ambas determinaciones en 1808 gestantes

| GRUPO | n | CR +/IP - | | CR -/IP + | | Total | | p |
|--------------|------|-----------|------|-----------|------|-------|-------|-------|
| | | n | % | N | % | n | % | |
| I | 670 | 16 | 2,38 | 20 | 2,98 | 36 | 5,37 | 0,002 |
| II | 1003 | 17 | 1,69 | 29 | 2,89 | 46 | 4,58 | |
| III | 135 | 9 | 6,66 | 7 | 5,18 | 16 | 11,85 | |
| Total | 1808 | 42 | 2,32 | 56 | 3,09 | 98 | 5,42 | |

CR, cribado; IP, cultivo intraparto

El análisis de los residuos corregidos demostró que esta discordancia era significativamente mayor cuando la diferencia entre el cribado y el cultivo intraparto superaba las 5 semanas.

IV.3. Estudio del urocultivo como predictor de la colonización por SGB

De las 2702 gestantes, el urocultivo prenatal fue positivo para SGB en 225 (8,3%) casos (tabla IV.6). La concordancia entre el urocultivo durante el embarazo y el cultivo intraparto fue baja (tabla IV.6).

Tabla IV.6. Comparación entre el cultivo intraparto y el urocultivo para la detección de SGB en 2702 gestantes

| UROCULTIVO | SGB INTRAPARTO | | Total | S | E | VPP | VPN | Índice Kappa |
|-----------------|----------------|----------|-------|-------|------|-------|-------|--------------|
| | Positivo | Negativo | | | | | | |
| Positivo | 147 | 78 | 225 | 65,33 | 87,8 | 32,73 | 96,53 | 0,363 |
| Negativo | 302 | 2175 | 2477 | | | | | |
| Total | 449 | 2253 | 2702 | | | | | |

Tampoco se obtuvo una buena concordancia entre el urocultivo y el cribado (tabla IV.7).

Tabla IV.7. Comparación entre el cribado y el urocultivo para la detección de SGB en 1808 gestantes

| UROCULTIVO | CRIBADO | | Total | Índice Kappa |
|--------------|----------|----------|-------|--------------|
| | Positivo | Negativo | | |
| Positivo | 113 | 54 | 167 | 0,425 |
| Negativo | 179 | 1462 | 1641 | |
| Total | 292 | 1516 | 1808 | |

IV.4. PCR en tiempo real

Se evaluaron por PCR-TR 100 muestras vaginorrectales intraparto, 50 positivas y 50 negativas. En 51 muestras el resultado de PCR fue positivo. El Cp osciló entre 24,64 y 45,31, con una media de $34,87 \pm 5,72$ (IC₉₅: 33,04-36,71) (figura IV.1).

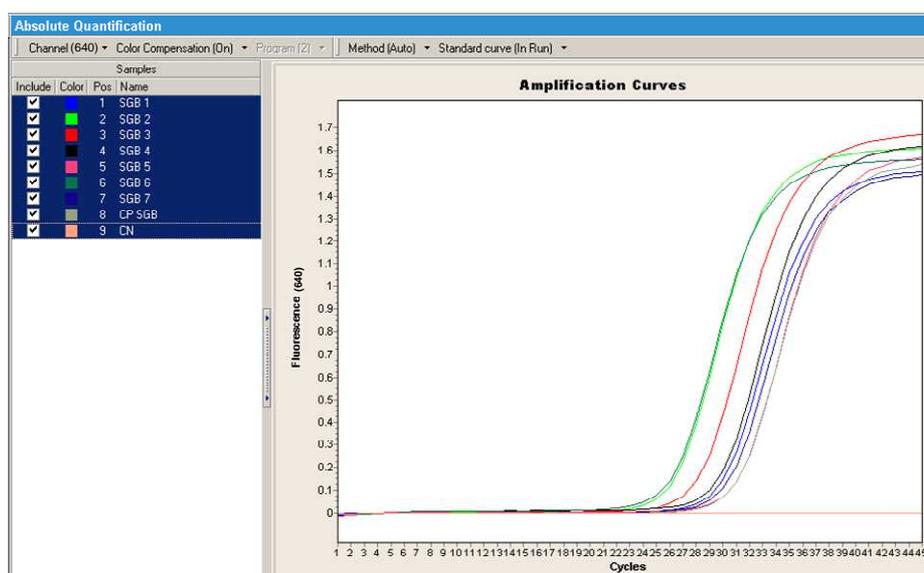


Figura IV.1 Curvas de fluorescencia de PCR-TR de SGB.

SGB 1-7: muestras positivas para SGB; CP SGB: control positivo; CN: control negativo

Para el proceso de extracción del material genético se empleó un tiempo total de aproximadamente 70 min. En la preparación de la mezcla de reacción y dispensación de las muestras se emplearon aproximadamente 10 min. La PCR y análisis de la Tm dura aproximadamente 1 h y 30 min, por lo que el tiempo total para la realización de la técnica de PCR fue aproximadamente de 3 h.

El tiempo necesario para dar un resultado parcial mediante cultivo en medio Granada es de 18 h y para un informe negativo definitivo de 48 h.

En ambos casos, la lectura tras el proceso es inmediata. Sin embargo, el tiempo de manipulación empleado en una u otra técnica es opuesto al requerido para obtener un resultado. Mientras que el cultivo de medio Granada no requiere una manipulación superior a escasos minutos, el tiempo de manipulación empleado para realizar la PCR es muy superior, estimándose que con el método empleado en este estudio es de más de 1 h.

IV.4.1. Comparación entre el cultivo intraparto y la PCR en tiempo real

Al comparar los resultados de la PCR-TR con el cultivo intraparto se demostró una buena concordancia entre ambas técnicas (tabla IV.8).

Tabla IV.8. Resultados del cultivo intraparto y la PCR-TR para detección de SGB en 100 muestras ensayadas

| | | PCR-TR | | Total | Índice Kappa |
|--------------------|----------|----------|----------|-------|--------------|
| | | Positivo | Negativo | | |
| CULTIVO INTRAPARTO | Positivo | 46 | 4 | 50 | 0,86 |
| | Negativo | 3 | 47 | 50 | |
| Total | | 49 | 51 | 100 | |

En 4 casos (8%) con cultivo positivo, la PCR-TR fue negativa, y en 3 casos (6%) con cultivo negativo, la PCR-TR fue positiva. Por tanto, la

sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la PCR-TR fueron del 92%, 94%, 93,9% y 92,1%, respectivamente.

IV.5. Profilaxis antibiótica intraparto

Un total de 407 mujeres recibieron profilaxis intraparto, 232 (57%) incompletas (1 dosis de antibiótico) y 175 (43%) completas (≥ 2 dosis).

Los motivos por los que se administró profilaxis intraparto en las gestantes, reflejados en las historias clínicas de las mismas, fueron los siguientes (tabla IV.9):

- Cultivo para SGB positivo en el cribado de la semana 35-37
- Urocultivo positivo en algún momento de la gestación
- Resultado del cribado desconocido o no realizado por parto prematuro
- Resultado del cribado desconocido y rotura de membranas > 18 h.
- Resultado del cribado desconocido y fiebre intraparto >38°C
- Cultivo positivo para SGB en el momento del parto

Tabla IV.9. Motivos de profilaxis antibiótica intraparto en 407 de las 2702 gestantes

| MOTIVO DE LA PROFILAXIS | PROFILAXIS INTRAPARTO | | TOTAL |
|-------------------------------------|-----------------------|------------|------------------|
| | COMPLETA | INCOMPLETA | n (%) |
| No consta | 10 | 11 | 21 (5,16) |
| SGB desconocido o parto prematuro | 6 | 10 | 16 (3,93) |
| SGB desconocido + bolsa rota > 18 h | 9 | 2 | 11 (2,7) |
| SGB desconocido o fiebre > 38°C | 0 | 1 | 1 (0,25) |
| SGB + intraparto | 7 | 10 | 17 (4,18) |
| SGB + urocultivo | 53 | 90 | 143 (35,1) |
| SGB + cribado | 90 | 105 | 195 (47,9) |
| Total | 175 | 232 | 407 (100) |

En 8 casos (1,96%) se aplicó profilaxis a gestantes con todos los cultivos negativos para SGB. El 86% de las mujeres con cribado desconocido y presencia de factores de riesgo recibió profilaxis antibiótica intraparto.

El antibiótico más utilizado en la profilaxis intraparto fue la ampicilina, seguida de la cefotaxima (tabla IV.10).

Tabla IV.10. Antibióticos usados en la profilaxis intraparto de 407 gestantes

| Antibiótico | PROFILAXIS INTRAPARTO | | | | Total | % |
|--------------|-----------------------|-----------|------------|-----------|------------|------------|
| | INCOMPLETA | % | COMPLETA | % | | |
| Desconocido | 5 | 2,16 | 3 | 1,71 | 8 | 1,97 |
| Penicilina | 1 | 0,43 | 0 | 0 | 1 | 0,25 |
| Ampicilina | 210 | 90,52 | 169 | 95,57 | 379 | 93,12 |
| Cefotaxima | 13 | 5,60 | 0 | 0 | 13 | 3,19 |
| Eritromicina | 2 | 0,86 | 3 | 1,71 | 5 | 1,23 |
| Amoxicilina | 1 | 0,43 | 0 | 0 | 1 | 0,25 |
| Total | 232 | 57 | 175 | 43 | 407 | 100 |

IV.5.1. Relación entre la profilaxis intraparto y el estudio prenatal de SGB

IV.5.1.1. Relación entre la aplicación de profilaxis intraparto y cribado de SGB

Por los datos de laboratorio analizados, se obtuvieron 292 resultados positivos de cribado, de los cuales, el 79,8% (n= 233) correspondían a mujeres que recibieron profilaxis intraparto, de las que el 55,8% fueron incompletas y en el 44,2%, completas. Los datos de profilaxis respecto al resultado del cribado se muestran en la tabla IV.11.

Tabla IV. 11. Resultado del cribado de SGB en las 407 gestantes que recibieron profilaxis intraparto.

| CRIBADO | PROFILAXIS INTRAPARTO | | | | | | p |
|--------------------|-----------------------|------|----------|------|-------|-----|-------|
| | INCOMPLETA | | COMPLETA | | TOTAL | | |
| | n | % | n | % | n | % | |
| Positivo | 130 | 55,8 | 103 | 44,2 | 233 | 100 | |
| Negativo | 33 | 62,3 | 20 | 37,3 | 53 | 100 | 0,692 |
| Desconocido | 69 | 57 | 52 | 43 | 121 | 100 | |
| Total | 232 | 57 | 175 | 43 | 407 | 100 | |

No se demostraron dichas diferencias entre el resultado del cribado y el tipo de profilaxis (completa o incompleta) realizada.

De las 407 mujeres que recibieron profilaxis, en 121 se desconocía el resultado del cribado. De ellas, el cultivo intraparto fue positivo en 96 casos (44 profilaxis incompleta y 52 profilaxis completa) y negativo en 25.

IV.5.1.2. Relación entre aplicación de profilaxis intraparto y urocultivo positivo frente a SGB

En 174 casos en los que se administró profilaxis intraparto, el urocultivo fue positivo (tabla IV.12), lo que supone el 42,75% de las madres que recibieron profilaxis. De estas, la profilaxis administrada fue incompleta en un 48,71% y completa en un 36,8% de los casos.

Según lo registrado en las historias clínicas, un 63,5% (33 de 52) de las mujeres con urocultivo positivo como criterio único para la administración de profilaxis intraparto recibieron dicha profilaxis.

Se demostraron diferencias estadísticamente significativas entre el resultado del urocultivo y el grado de profilaxis (incompleta o completa) realizada. Hubo un porcentaje significativamente mayor de mujeres con urocultivo positivo que recibieron profilaxis incompleta (tabla IV.12).

Tabla IV.12. Relación entre la aplicación de profilaxis intraparto y el resultado del urocultivo (n=407)

| UROCULTIVO | INCOMPLETA | | COMPLETA | | TOTAL | | p |
|-----------------|------------|-------|----------|-------|-------|-------|-------|
| | n | % | N | % | n | % | |
| NEGATIVO | 119 | 51,29 | 114 | 65,14 | 232 | 57,25 | 0,007 |
| POSITIVO | 113 | 48,71 | 61 | 34,86 | 174 | 42,75 | |
| TOTAL | 232 | 100 | 175 | 100 | 407 | 100 | |

IV.6. Resultado en el recién nacido

Durante el periodo de estudio se recogieron los datos de los cultivos periféricos de los RNs de madres colonizadas por SGB o con resultado desconocido. No se registró ninguna sepsis neonatal precoz por SGB en la población estudiada.

El peso medio de los RNs fue de 3259 g (IC₉₅: 3265,52-3259,22). No se demostraron diferencias significativas al comparar el peso del RN y la colonización materna por SGB determinada en el cribado (p= 0,317) o en el momento del parto (p= 0,283).

Se produjeron 39 partos prematuros entre las 2702 gestantes. Se analizó la relación entre la colonización por SGB y el parto prematuro, comparando los datos de prematuridad con el cultivo intraparto y con el cribado (15 prematuros de 1808 gestantes). El porcentaje de prematuridad fue significativamente mayor entre las mujeres colonizadas, tanto en la semana 35-37 de gestación como en el momento del parto (tabla IV.13).

Tabla IV.13. Relación entre colonización por SGB y prematuridad

| Cultivo SGB | Prematuridad | | Total (n) | p |
|----------------------------|--------------|------------|-----------|--------|
| | No (n) | Sí [n (%)] | | |
| Cribado positivo | 281 | 11 (3,8) | 292 | <0,001 |
| Cribado negativo | 1512 | 4 (0,3) | 1516 | |
| Total | 1793 | 15 (0,8) | 1808 | |
| Entraparte positivo | 422 | 27 (6) | 449 | <0,001 |
| Entraparte negativo | 2241 | 12 (0,5) | 2253 | |
| Total | 2663 | 39 | 2702 | |

IV.6.1. Cultivos periféricos

Se realizaron cultivos de exudados periféricos de 265 RN, siendo positivos para SGB en alguna de las localizaciones en 39 casos (14,7%). La tabla IV.14 muestra los resultados de los cultivos periféricos en relación con los resultados de estudio de colonización en la madre.

Tabla IV.14. Resultados del estudio de colonización por SGB en 265 RN

| SGB recién nacido | SGB MATERNO* | | Total |
|-------------------|--------------|----------|-------|
| | Positivo | Negativo | |
| Positivo | 37 | 2 | 39 |
| Negativo | 166 | 60 | 226 |
| Total | 203 | 62 | 265 |

*Resultado SGB en cribado y/o cultivo intraparto

El 95% de los resultados positivos correspondió a madres colonizadas por SGB ($p= 0.001$). De los 62 RN de madres no colonizadas, 2 fueron positivos a SGB, aunque en una sola de las 3 localizaciones periféricas en ambos casos.

Se analizaron los datos de los cultivos de los 203 RN de madres colonizadas por SGB, detectado mediante cultivo en la semana 35-37 de gestación y/o en el momento del parto. En 37 casos (18,2 %) el cultivo fue positivo en al menos uno de los exudados periféricos. La muestra en la que se detectó más frecuentemente SGB fue el exudado ótico. Los resultados obtenidos en dichos cultivos se muestran en la tabla IV.15.

Tabla IV.15. Resultados del cultivo de exudados periféricos de SGB en 203 RN de madres colonizadas

| Tipo de exudado | SGB positivo[n (%)] |
|---------------------------|----------------------------|
| Ótico (n= 203) | 28 (13,8) |
| Faríngeo (n= 203) | 18 (8,9) |
| Umbilical (n= 203) | 18 (8,9) |

El exudado ótico fue positivo en el 75,7% y los exudados faríngeo y umbilical en el 48,6%, cada uno, de los RN colonizados.

Por nº de localizaciones, se observó una mayoría de RN colonizados con una sola localización positiva (56,7%) (tabla IV.16).

De los positivos de cada tipo de exudado, el 42,9%, 33,3% y 16,7% de los exudados ótico, faríngeo y umbilical, respectivamente, lo fueron a esa única localización.

Tabla IV.16. Detección de SGB en los exudados periféricos de 37 RN colonizados distribuidos por nº localizaciones positivas

| Nº localizaciones | Tipo de muestra | Positivos [n (%)*] | Total [n (%)*] |
|--------------------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------|
| 1 localización | Ótico | 12 (32,4) | |
| | Faríngeo | 6 (16,2) | |
| | Umbilical | 3 (8,1) | |
| Total | | 21 (56,7) | 21 (56,7) |
| 2 localizaciones | Ótico + Faríngeo | 1 (2,7) | |
| | Ótico + Umbilical | 4 (10,8) | |
| | Faríngeo + Umbilical | 0 (0) | |
| Total | | 5 (13,5) | 5 (13,5) |
| 3 localizaciones | Ótico + Faríngeo + Umbilical | 11 (29,7) | 11 (29,7) |
| Total | | | 37 (100) |

*% respecto al nº total de positivos

IV.6.2. Relación entre profilaxis intraparto, colonización materna y colonización del RN

De las 449 madres en las que se detectó SGB intraparto, en 174 casos se disponía de los datos de profilaxis y de cultivos periféricos en el RN. En 156 casos de madres con profilaxis, se detectaron 32 (20,5%) de RN positivos, frente a 3 (16,7%) positivos de 18 madres sin profilaxis. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de los cultivos periféricos y la aplicación o no de profilaxis en la madre ($p=0,700$).

Sin embargo, en los 156 casos en los que se administró profilaxis intraparto, se observó que la colonización por SGB fue significativamente mayor en los RN de madres colonizadas que recibieron profilaxis incompleta (tabla IV.17).

Tabla IV. 17. Relación entre el tipo de profilaxis intraparto administrada en 156 madres colonizadas y la detección de SGB en el RN

| Profilaxis | SGB en el RN | | p |
|-------------------|--------------|---------------|-------|
| | n | Positivos (%) | |
| Completa | 68 | 9 (13,2) | 0,048 |
| Incompleta | 88 | 23 (26,1) | |
| Total | 156 | 32 (20,5) | 156 |

Igualmente, al estudiar la relación entre el tipo de profilaxis en la madre y el grado de colonización en el RN, medido por el nº de localizaciones periféricas positivas en cada uno, se observaron diferencias estadísticamente significativas. La detección de SGB en más de uno de los exudados periféricos pasó del 1,5% en los RN de madres que recibieron profilaxis completa a un 13,6% en los RN de madres con profilaxis incompleta (tabla IV.18).

Tabla IV. 18. Relación entre el tipo de profilaxis intraparto administrada en 156 madres colonizadas y el grado de colonización por SGB del RN

| Profilaxis | Número de localizaciones positivas [n (%)] | | | Total | P |
|-------------------|--|-----------|-----------|-------|-------|
| | 0 | 1 | >1 | | |
| Completa | 59 (86,8) | 8 (11,8) | 1 (1,5) | 68 | 0,022 |
| Incompleta | 65 (73,9) | 11 (12,5) | 12 (13,6) | 88 | |
| Total | 124 (79,5) | 19 (12,2) | 13 (8,3) | 156 | |

IV.6.3. Relación entre cribado prenatal, cultivo y PCR intraparto y colonización del RN

También se analizaron los resultados de PCR y se compararon con los resultados del RN. Sólo se dispone de 7 casos en los que la madre tuviera realizada la investigación de SGB por cultivo intraparto y PCR y además se

dispusiera de los datos de profilaxis y resultados del estudio de SGB en exudados periféricos (tabla IV.19).

Tabla IV.19. Resultados de PCR, cultivo prenatal intraparto y tipo de profilaxis intraparto en relación con el resultado del estudio de colonización en el RN en 7 casos

| Nº caso | PCR | IP | CR | UC | Profilaxis | Periféricos Positivos |
|---------|-----|----|----|----|------------|--------------------------|
| 1 | + | + | NC | NC | COMPLETA | Ótico |
| 2 | + | + | NC | + | COMPLETA | Ótico |
| 3 | + | + | NC | NC | INCOMPLETA | Ótico |
| 4 | - | - | NC | NC | NO | Ótico |
| 5 | + | + | NC | + | INCOMPLETA | Ótico+Faríngeo+Umbilical |
| 6 | + | + | + | NC | INCOMPLETA | Faríngeo |
| 7 | + | - | + | NC | NO | Ótico+Umbilical |

IP, cultivo intraparto; CR, cribado; UC, urocultivo; +, positivo; -, negativo; NC, no consta

Aunque el nº de casos estudiados es bajo, se puede observar que en los dos casos en los que el RN tiene SGB en más de una localización, el resultado de SGB en la madre fue positivo por PCR (casos 5 y 7). En el caso 5, el alto grado de colonización en la madre (urocultivo, PCR y cultivo intraparto positivos) se relacionó con un alto grado de colonización en el RN. En el caso 7, sin embargo, no hubo concordancia en los resultados intraparto por las dos técnicas, siendo el cultivo negativo. En este caso el cribado había sido positivo, no constaba realización del urocultivo en el embarazo, y en el RN dos de las 3 localizaciones periféricas fueron positivas.

En el único caso en el que la PCR fue negativa, el cultivo intraparto fue también negativo y no se realizó o no se disponía de los datos del cribado y urocultivo antenatal. El resultado positivo a SGB en el exudado ótico en el RN de dicho caso, podría explicar un fallo de las técnicas microbiológicas o bien contaminación de la muestra al realizar la toma y/o la siembra.

IV.6.4. Relación entre el antimicrobiano utilizado y colonización del RN

En cuanto al antimicrobiano utilizado, no se demostraron diferencias significativas en la tasa de colonización en función del tipo de antibiótico (tabla IV.20). No obstante, en este estudio más del 93% de las pacientes recibieron profilaxis con ampicilina, por lo que el efecto que el tipo de antimicrobiano pudiera tener en la colonización del RN no se puede valorar con precisión.

Tabla IV.20. Relación entre la colonización en el RN y el tipo de antimicrobiano usado en la profilaxis intraparto en 215 casos

| Antimicrobiano | Cultivo periférico [n (%)] | | Total [n (%)] | p |
|----------------|----------------------------|------------|---------------|------|
| | Negativo | Positivo | | |
| Otros | 10 (5,52) | 1 (2,94) | 11 (5,11) | |
| Ampicilina | 171 (94,47) | 33 (97,06) | 204 (94,88) | 0,53 |
| Total | 181 (84,19) | 34 (15,81) | 215 (100) | |

V. Discusión

Streptococcus agalactiae sigue siendo una de las principales causas de morbi-mortalidad entre los RNs en ausencia de medidas de prevención.

La influencia de factores como la edad en la tasa de colonización materna no está totalmente comprobada. Algunos estudios relacionan la mayor edad de la paciente con una mayor tasa de colonización (Islam, 1981; Regan y cols, 1991, Schrag y cols, 2000) sin embargo en otros estudios no se observan estas diferencias (Jauréguy y cols, 2003, Valkenburg-van den Berg y cols, 2006). En nuestro estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de colonización de las gestantes por edad . A pesar de que el tipo de muestra y la población sobre la que se realizan los estudios es similar, el tamaño de muestra o las diferencias en la estratificación de la misma pueden explicar en parte la discrepancia entre estos estudios.

Las tasas de colonización de las madres gestantes a nivel mundial oscilan entre un 10 y un 40% según los estudios (Edwars y Baker, 2010). Este porcentaje de colonización está influido por la población estudiada, el número de lugares anatómicos muestreados y el método de detección utilizado (Meyn y cols, 2009). En nuestra población, durante el periodo de estudio analizado, se ha detectado una tasa de colonización de un 16,6%. En España, el 11-18,2% de las gestantes son portadoras vaginales y/o rectales de SGB (Alós y cols, 2012). Estudios realizados previamente en nuestro laboratorio registraron tasas de colonización vaginal intraparto del 12% (Sánchez Pérez, 1996). El porcentaje obtenido en el presente trabajo es mayor, probablemente porque las muestras utilizadas fueron vaginorrectales, mientras que en el estudio anterior eran exudados vaginales. Se sabe que el exudado vaginorrectal es una muestra mejor para la detección de colonización por SGB que el vaginal solo (Daniels y cols, 2010, CDC, 2010).

V.1. Validación del cribado prenatal como predictor de la colonización intraparto

La sensibilidad del cribado prenatal en este estudio fue de 81,69%, la especificidad de 97,02%, su valor predictivo positivo del 85,7% y su valor predictivo negativo del 96,3%.

La siembra directa en medios diferenciales proporciona crecimiento e identificación en un solo paso, por lo que el resultado puede estar disponible en un menor periodo de tiempo. Las recomendaciones de los CDC aceptan como alternativa de subcultivo tras enriquecimiento selectivo en medio líquido, el empleo en medios diferenciales como el medio Granada, o bien la inoculación directa de la muestra en medio Granada líquido que contribuye al enriquecimiento y permite una identificación más rápida (CDC, 2010). Estudios anteriores obtienen tasas de colonización similares a las que presentamos en este estudio, mientras que los valores de sensibilidad, especificidad, y valores predictivos del cribado frente al cultivo intraparto son similares o algo inferiores tras realizar enriquecimiento selectivo en medio líquido (Yancey y cols., 1996; Valkenburg-van den Berg y cols., 2006; Kovavisarach y cols de 2008; Towers y cols, 2010). Las recomendaciones españolas de 2012 aceptan como alternativa la siembra directa en medio Granada para el cribado prenatal, siempre que se realicen estrictos controles de calidad del medio (Alós y cols, 2012) y algunos estudios previos han mostrado tasas de sensibilidad y especificidad elevadas al comparar siembra directa en medio Granada frente al enriquecimiento en medio líquido (Rosa-Fraile y cols, 1999; Gupta y cols, 2004).

En algunas ocasiones las gestantes reciben un cuidado prenatal insuficiente, y no se dispone de los datos del cribado vaginorrectal en el momento del parto. En un 33,1% de los casos estudiados no se conocía el resultado del cribado prenatal para SGB, bien por no haber registro del mismo o por no haberse realizado. En estos casos, el cultivo intraparto resultó positivo en un 16%. El índice de concordancia del cribado prenatal y el cultivo intraparto fue de 0,804, lo que indica un grado de acuerdo muy bueno, por lo que el

cribado prenatal puede considerarse como un buen predictor del estado de colonización de la gestante en el momento del parto.

El estado de portadora de SGB puede ser transitorio (Anthony y cols, 1981; Dillon y cols, 1982; Boyer y cols, 1983). En este trabajo se observa que en un 3,1% de las gestantes el resultado del cribado es negativo y el del cultivo intraparto positivo. Estudios similares obtienen un porcentaje de falsos negativos del cribado prenatal del 9,8%, observando una diferencia del 4% entre portadoras en el cribado y en el momento del parto, que achacan a una toma o transporte inadecuado de la muestra (Towers y cols., 2010).

Por otra parte, un 2,3% (42 casos) con cribado positivo fueron negativos en el cultivo intraparto. Esto pudo deberse a diversos factores, la diferente calidad en la toma de muestra en el cribado y en el momento del parto, la característica colonización intermitente del SGB, etc. Aquellos casos en los que el resultado del cribado fue negativo y el cultivo intraparto positivo podrían considerarse falsos negativos de la técnica de cribado. Considerando un porcentaje de portadoras del 16,6% en nuestra población, y que alrededor de un 2% de los RNs de madres portadoras que no reciben profilaxis intraparto pueden desarrollar enfermedad neonatal, teóricamente un 0,1 de cada 1000 RNs estarían a riesgo de desarrollar enfermedad neonatal debido a un fallo en la técnica del cribado.

Otro de los puntos críticos a considerar para que el cribado sea eficaz es el momento de la toma de las muestras. En muchos casos, las discrepancias entre los resultados del cribado antenatal y el cultivo en el momento del parto están relacionadas principalmente con el tiempo que transcurre entre ambas tomas (Conellan y cols, 2000). En este trabajo se observó que la sensibilidad del cribado era inversamente proporcional al tiempo transcurrido entre éste y el momento del parto. Cuando el periodo transcurrido fue superior a 5 semanas, la sensibilidad del cribado disminuyó de forma significativa. Como ya se vio en estudios similares realizados, los valores predictivos positivo y negativo son más elevados cuando el cribado se realiza entre las semanas 35 y 37 de la gestación que cuando entre el cribado y el momento del parto distaban 5 o más semanas (Yancey y cols en 1996; Hillier y cols, 2005). Además, de los resultados discrepantes, en un 62% de los casos cribado positivo/cultivo

intraparto negativo y en un 64% de los casos cribado negativo/cultivo intraparto positivo, había transcurrido un periodo superior a 3 semanas entre ambas toma.

Se detectó urocultivo positivo frente a SGB en un 8,3% de las gestantes, cifra algo superior a la de otros estudios en los que el porcentaje de detección es del 2-7% (Mackenna y cols, 2003; CDC, 2010). La tasa obtenida en este estudio está más cercana a las de otros estudios realizados en nuestro país, que oscilan entre un 10,7% (Centelles-Serrano y cols., 1999) y un 12,6% (Tamayo y cols, 2004).

De los casos en los que se detectó SGB en orina en el 32,3% y el 34,1% el cribado y el cultivo intraparto fueron negativos, respectivamente. Los índices de concordancia fueron de moderados a bajos entre el urocultivo y el cultivo vaginorrectal. La detección de SGB en orina indica alto grado de colonización (CDC, 2010; Schrag y cols, 2002), y por tanto parece más probable que aquellas gestantes que presentan urocultivos positivos a lo largo de su embarazo se recolonizen antes del parto, aunque el resultado del cribado antenatal sea negativo (Centelles-Serrano y cols 1999). Según las recomendaciones de los CDC, la detección de bacteriuria por SGB en algún momento de la gestación debe ser incluida como una indicación para la realización de dicha profilaxis, incluso en ausencia de otros cultivos positivos (CDC, 2010). Las diferencias en la tasa de colonización si consideramos de forma independiente la orina y el exudado vaginorrectal (10,8% frente a 16,7%), así como los bajos índices de concordancia de ambas muestras para detectar SGB hacen pensar que el resultado del urocultivo debe constituir un factor de riesgo independiente para la aplicación de profilaxis intraparto.

V.2. Comparación entre cultivo intraparto y PCR en tiempo real en la detección de SGB

Debido a las dificultades que se presentan en ocasiones para tener disponible el resultado del cribado antenatal, algunos autores afirman que el

momento ideal para realizarlo es durante el parto, pero los métodos convencionales de cultivo resultan muy lentos para poder ser utilizados en ese momento y para la aplicación a tiempo de profilaxis intraparto si fuera necesaria. Se han intentado desarrollar métodos rápidos para la detección directa de SGB en muestras clínicas. Los métodos basados en la detección de antígenos han mostrado sensibilidades entre el 19 y el 82% (Yancey y col, 1992, Perkins y col., 1995, Thinkphamrop, 2003), porcentajes insuficientes para unas pruebas de cribado.

Los métodos que han mostrado una mayor sensibilidad y especificidad han sido aquellos basados en la detección de ácidos nucleicos. Estos métodos presentan sensibilidades entre 85% y 100% y especificidades entre 93% y 100% tanto con técnicas basadas en PCR convencional como con PCR-TR (Davies y cols, 2004, Golden y cols, 2004, Bergeron y cols, 2000, Réglier-Poupet y cols, 2005, Uih y cols, 2005). En nuestro estudio, la sensibilidad de la PCR-TR frente al cultivo fue del 92,59% y la especificidad del 94,33%. Estudios similares que utilizan igualmente los genes *cfb* como diana de la PCR, obtienen sensibilidades de 94-100% y especificidades de entre el 66,5% y el 100% comparadas con el cultivo (Bergeron y col, 2000, Davies y cols, 2004, Convert y cols, 2005, Gavino y Wang y col, 2007, Block y col, 2008).

Algunos autores han obtenido peores resultados con la PCR en muestras vaginorrectales que en vaginales o rectales (Bergeron y cols., 2000); en otros estudios han puesto de manifiesto que las muestras vaginales de embarazadas contienen más inhibidores de la PCR que las de mujeres no gestantes (Ke y cols., 2000), mientras que otros estudios en los que se diseñaron otras dianas situadas en distintas regiones del genoma de SGB obtienen una sensibilidad inferior al 75% (Chan y cols, 2006, Rallu y cols, 2006). Estos datos demuestran una gran variabilidad en los resultados obtenidos con la PCR, que podría en parte deberse a la variabilidad de las técnicas usadas así como de las dianas del genoma de SGB. El sistema de extracción de ácidos nucleicos también influye en el rendimiento de la PCR. En nuestro caso la extracción de ADN se realizó mediante una técnica manual. Tanto el procesamiento como la reproducibilidad de la PCR se podría mejorar si se utilizan sistemas de extracción automatizados.

Otra de las ventajas de la PCR es la rapidez. En nuestro trabajo, el tiempo total de realización de la PCR-TR fue de unas 2,5 h. Los métodos basados en el cultivo previo enriquecimiento de la muestra en caldo selectivo requieren al menos 48 h de incubación y posterior identificación de colonias sospechosas, y aquellos que se basan en cultivo directo en medios selectivos y diferenciales como el medio Granada, requieren al menos 18 h para hacer una primera lectura. En el mejor de los casos, en muestras con un elevado grado de colonización, y utilizando medio Granada semisólido en tubo, hasta las 5 h de incubación en baño no se detecta producción de pigmento. No obstante, el tiempo de procesamiento de la muestra requerido para la PCR utilizada en este trabajo fue muy superior al requerido para el cultivo, lo cual supone una desventaja importante de la técnica molecular.

La PCR requiere de un personal entrenado, que tendría que estar disponible de forma ininterrumpida para la realización de la técnica. La alternativa actual son los sistemas automáticos de PCR. Se han comercializados plataformas automatizadas como GenXpert®, o IDI-Strep® en las que se integran los pasos de extracción, amplificación y detección en tiempo real en un mismo cartucho de reacción. El tiempo de procesamiento es mínimo (similar al requerido para un cultivo) y el resultado estaría disponible en 2h. Existe poca experiencia en clínica en estos momentos con este tipo de plataformas como para que sustituyan de una forma fiable a los sistemas clásicos de detección, y además el coste es muy superior. Por tanto, son necesarios más estudios para poner de manifiesto la ventaja real de estos sistemas frente a los métodos clásicos de cultivo.

El método de PCR utilizado en este estudio no es coste-efectivo si se tiene en cuenta el tiempo de manejo y procesamiento requeridos para la obtención de un resultado y que las cifras de sensibilidad y especificidad fueron equiparables a las del cribado prenatal. El empleo de sistemas de PCR automatizados con un manejo mínimo puede ser útil para detectar colonización intraparto en mujeres con cribado desconocido o no realizado.

Las recomendaciones de los CDC admiten la utilización de la PCR, pero sólo tras enriquecimiento en caldo selectivo, ya que la sensibilidad de estos métodos en ausencia de este paso previo no es adecuada (CDC, 2010). Sin embargo, diversos estudios demuestran resultados discrepantes, e incluso

mejor rendimiento de la muestra directa (Uhl y cols, 2005; Goodrichy Miller, 2007). En general, los resultados de sensibilidad de la PCR no son superiores al cribado prenatal, teniendo además en cuenta que el enriquecimiento previo y PCR puede que no aporte suficientes ventajas con respecto al cribado prenatal mediante cultivo.

Las técnicas basadas en cultivo permiten recuperar la cepa para estudios de susceptibilidad frente a antimicrobianos. La guía de los CDC de 2010 recomienda la realización del antibiograma debido a las altas tasas de resistencia a eritromicina y clindamicina actuales (CDC 2010) Una de las mejoras que deberían contemplar las técnicas rápidas basadas en la PCR sería incluir marcadores de resistencia para poder guiar de una forma apropiada la administración de la profilaxis intraparto en mujeres alérgicas a la penicilina (Melin, 2011).

V.3. Profilaxis intraparto y cultivos prenatales

En nuestro estudio disponemos de los datos de la realización de profilaxis intraparto en 407 mujeres. De ellas en un 5,16% no consta el motivo por el que le fue aplicada dicha profilaxis. En la mayoría de los casos (87,22%) la profilaxis fue administrada por la existencia de algún cultivo positivo para SGB, ya fuera el cribado, urocultivo o muestra vaginorrectal intraparto. La indicación más frecuente para la realización de la profilaxis fue el resultado del cribado positivo (47,91%), dato similar al obtenido en 2005 por Navas y cols en un hospital madrileño (44,7% de las indicaciones) (Navas y cols., 2005). En un 6,88% la profilaxis se administró por desconocerse el resultado del cribado prenatal.

La profilaxis antibiótica se administró correctamente en el 79,08% de los casos en los que la gestante presentaba algún criterio que la recomendara. De todas las profilaxis administradas, el 42,3% fueron profilaxis completas. Este porcentaje es similar al encontrado en otros estudios (Alsina-Manrique y cols, 2005, Navas y cols, 2005). Por los datos de laboratorio, se comprobó que en un 1,96% de los casos se aplicó profilaxis sin estar indicada, ya que todos los

cultivos resultaron negativos para SGB. Esta cifra es inferior a la de otros estudios en los que se alcanza el 7% de profilaxis inadecuadas (Alsina-Manrique y cols, 2005).

La profilaxis intraparto está indicada en caso de conocerse el estado de portadora de la madre en el momento del parto, o en el caso de que éste sea desconocido y presentar algún factor de riesgo. En nuestro estudio se administró profilaxis a 233 gestantes cuyo cribado prenatal había resultado positivo, lo que supone un 79,8% de las mujeres colonizadas, cifras similares a las de otros estudios, en los que entre un 83% y un 90% de las gestantes con cribado positivo recibieron profilaxis (Centelles-Serrano y cols, 2009; Berardi, 2011, Lin y cols, 2011).

Sin embargo, de todas las madres con cribado desconocido, solo en un 13,4% de los casos consta la administración de profilaxis intraparto. Este dato contrasta con otros como el estudio de Alsina-Manrique y cols de 2005 en el que un 78% de las madres con estado de portadora desconocido recibieron profilaxis intraparto, si bien en este último caso el porcentaje de gestantes con cribado desconocido representaba solo el 2,7% del total (Alsina-Manrique y cols., 2005).

La presencia de SGB en orina durante la gestación es también un criterio de indicación de profilaxis intraparto (CDC, 2010). En nuestro estudio, en 48 (11,79%) casos se realizó profilaxis intraparto en base al resultado del urocultivo, ya que no se conocía el dato del cribado prenatal. En un estudio previo, se administró profilaxis intraparto al 18,07% de las mujeres basándose en el resultado del urocultivo, pero teniendo en cuenta que en este estudio no se realizaba cribado prenatal a las gestantes con cultivo de orina positivo para SGB (Centelles-Serrano y cols., 2009). En este mismo estudio se demostró que un 60% de las mujeres con un urocultivo positivo en el primer trimestre presentaban colonización vaginal al final del embarazo. En nuestro caso, de aquellos casos en los que la profilaxis se aplicó utilizando como único criterio la positividad del urocultivo, el 68,75% presentaron cultivo intraparto positivo. No obstante, se demostró una baja concordancia entre el urocultivo y el cultivo de

muestra vaginorrectal antenatal e intraparto. Probablemente, la colonización vaginal transitoria por SGB en muchos casos contribuya a esta baja concordancia.

V.4. Colonización materna y neonatal por SGB

La colonización vaginal de las madres se ha relacionado con el bajo peso al nacer de los RNs, así como con la prematuridad, especialmente en mujeres embarazadas con un alto grado de colonización por SGB (Regan y cols., 1996, Kaufman y Fairchild, 2004). En nuestro caso no se observan diferencias estadísticamente significativas entre el peso de los RNs y la colonización materna por SGB, en consonancia con lo publicado por otros autores (Kadanali y cols, 2005, Natarajan y cols, 2006). Sin embargo al igual que en otros estudios (Heath y cols, 2004, Currie y cols, 2011), sí se demostró una relación significativa entre el estado de portadora de la madre y el parto prematuro.

Durante el periodo de estudio no se registró ninguna sepsis neonatal por SGB a pesar de detectarse RNs colonizados.

La detección de microorganismos en los cultivos periféricos de los RNs no debe considerarse como criterio definitivo de infección, pero puede ser útil para orientar la etiología en las sepsis neonatales con hemocultivo negativo, cuando en tres o más exudados se aísla un agente típico de infección (SEIMC, 2002). Por otra parte, la ausencia del microorganismo hace improbable la existencia de una infección adquirida durante el parto. Se detectó colonización por SGB en 37 RN de 203 madres colonizadas (18,2%). En otros estudios, las tasas de colonización en RN oscilan entre el 8,7% (Al-Sweih y col, 2005) y el 17,3% (Kadalani y cols, 2005). Estas cifras se elevan notablemente en lugares en los que no está implantada la profilaxis intraparto como medida de prevención, en los que el porcentaje de RN colonizados alcanza el 52,5% (Madzivhandila y cols, 2011). Observamos que en el 57% de los casos, fue positiva sólo una localización, siendo el exudado ótico el que registró el mayor número de cultivos. Casi en el 30% se detectó SGB en las tres localizaciones.

En un estudio similar (Kadalani y cols., 2005), el 33,62% de los RNs presentaron SGB en las tres localizaciones. Si bien no existe mucha experiencia en relacionar el número de localizaciones positivas y el posible incremento del riesgo de infección neonatal, el aislamiento en un mayor número de localizaciones puede ser indicativo de un mayor grado de colonización y por tanto de la necesidad de una mayor vigilancia de los RNs.

V.5. Profilaxis intraparto y colonización neonatal

Actualmente la única medida eficaz para prevenir el desarrollo de sepsis neonatal precoz por SGB es la aplicación de profilaxis antibiótica intraparto a las madres portadoras (SEIMC, 2002, CDC, 2010, Alós y cols, 2012). Los primeros ensayos que se realizaron sugerían una eficacia de la profilaxis intraparto de un 100% en la prevención de la enfermedad neonatal de comienzo precoz (CDC, 2010). Posteriores estudios observacionales cifran la efectividad entre un 86% y un 89% (Lin y col., 2001; Schrag y col., 2002).

Si nos centramos en los RNs de madres cuyo cultivo intraparto fue positivo, no se observan diferencias estadísticamente significativas en el resultado de los cultivos periféricos en función de si las madres recibieron o no profilaxis, pero sí en función de si ésta fue completa o incompleta, tanto en número de RNs colonizados como en el nº de localizaciones positivas.

Esto demuestra que la duración de la profilaxis tiene una gran importancia para evitar la transmisión de SGB al RN. En un estudio realizado por Lim y cols en 1986 se encontró que un 46,24% de los niños nacidos de madres portadoras de SGB que no habían recibido profilaxis estaban colonizados, frente a ninguno de los que nacieron de madres a las que se les administró profilaxis durante las 6 h anteriores al parto (Lim y cols, 1986). En nuestro estudio, la colonización del RN pasó del 1,5% al 13,6% de madres que recibieron profilaxis completa e incompleta, respectivamente.

Otro factor que puede influir en la efectividad de la profilaxis intraparto es el antimicrobiano utilizado. El fármaco de elección es la penicilina ya que tiene

un espectro más estrecho de actividad antimicrobiana y por tanto es más probable que tenga un menor efecto sobre especies bacterianas entéricas. Sin embargo, la ampicilina es una alternativa aceptable (CDC, 2010, Alós y cols, 2012). De las 407 profilaxis registradas, en un solo caso se utilizó penicilina, mientras que en 93,12% de los casos el antimicrobiano utilizado fue la ampicilina. Algunos estudios mostraban un incremento de la resistencia en gram negativos por efecto del uso de profilaxis intraparto (Levine y cols, 1999), aunque estudios posteriores muestran que no existen diferencias significativas en la resistencias de gram negativos según el antimicrobiano utilizado en la profilaxis (Edwards y cols, 2003, Chen y cols, 2005, Stoll y cols, 2011)

En nuestro caso disponemos de pocos datos de profilaxis realizadas con eritromicina, por lo que no podemos establecer una relación entre la utilización de este antimicrobiano y la eficacia de la profilaxis intraparto. De las 425 profilaxis sólo 6 se realizaron con eritromicina (1,47%) y ninguna con clindamicina. Los CDC recomiendan la utilización de vancomicina, frente a eritromicina o clindamicina debido al incremento en las tasa de resistencia cuando no esté disponible el resultado del antibiograma (CDC, 2010). En España, las tasas de resistencia frente a eritromicina son de entre el 12 y 17% y frente a clindamicina de entre el 12% y 13% (Betriu y cols, 2003, Alsina Manrique y cols, 2006, Martins y cols, 2011). Estas cifras permiten la utilización de estos antimicrobianos en la profilaxis intraparto, pero hacen necesaria la realización de un antibiograma a las cepas aisladas en las gestantes alérgicas a penicilina.

VI. Conclusiones

- 1.** El cribado mediante cultivo vaginorrectal prenatal ofrece buena sensibilidad y especificidad así como un elevado grado de concordancia con el cultivo vaginorrectal intraparto. Por ello, es un método adecuado para predecir la colonización materna en el momento del parto.
- 2.** La sensibilidad del cribado prenatal disminuye progresivamente a medida que aumenta el tiempo transcurrido entre éste y el momento del parto. El cribado prenatal debe realizarse dentro de las 5 semanas anteriores al parto, y para un rendimiento óptimo, entre 1 y 3 semanas antes del parto.
- 3.** Se demuestra una baja concordancia entre los resultados del urocultivo y los del cultivo vaginorrectal, bien antenatal o bien intraparto, lo cual no permite establecer al urocultivo como buen predictor de la colonización vaginorrectal en el momento del parto.
- 4.** La PCR en tiempo real presenta buenos valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos respecto al método de referencia, por lo que podría constituir una herramienta útil en casos en los que se desconozca el resultado del cribado prenatal.
- 5.** En nuestra área sanitaria se demuestra un buen cumplimiento de la estrategia de prevención de sepsis neonatal mediante profilaxis intraparto basada en el cribado universal, ya que el 87,2% de las gestantes colonizadas recibieron profilaxis intraparto.
- 6.** El porcentaje de partos prematuros fue significativamente mayor en las madres colonizadas por SGB.
- 7.** Más del 80% de los RNs de madres colonizadas intraparto que habían recibido profilaxis presentaron cultivos de exudados de piel y mucosas negativos.

8. La profilaxis completa en madres colonizadas por SGB en el momento del parto se relacionó tanto con una menor tasa de colonización en el RN como con un menor número de localizaciones positivas.

VII. Bibliografía

- **Aber RC, Allen N, Howell JT, Wilkenson HW, Facklan RR.** Nosocomial transmission of group B streptococci. *Pediatrics* 1976; 58 3) 346-353
- **Alós Cortés JI, Andreu Domingo A, Arribas Mir L, Cabero Roura L, de Cueto López MJ, José Sastre J, Melchor Marcos JC, Puertas Prieto A, de la Rosa Fraile M, Salcedo Abizanda S, Sánchez Luna M, Sánchez Pérez M J y Rafael Torrejón Cardoso R.** Prevención de la infección perinatal por estreptococo del grupo B. Recomendaciones españolas. Actualización 2012. Documento de consenso SEIMC/SEGO/SEN/SEQ/SEMFYC. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012. Artículo en prensa
- **Alsina-Manrique L, Iriando M, Muñoz-Almagro C, Borrás M, Pou J, Juncosa T, Jiménez R.** Evaluación de la aplicación del cribado de estreptococos del grupo B para la prevención de la infección perinatal en un hospital de tercer nivel. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24: 505-8.
- **Alsoub H, Najma F, Robida A.** Group B streptococcal endocarditis in children beyond the neonatal period. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16:418-420
- **Al-Sweih N, M. Hammoud M, Al-Shimmiri M. Jamal L, Neil and Rotimi V.** Serotype distribution and mother to baby transmission rate of *Streptococcus agalactiae* among expectant mothers in Kuwait. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2005; 272: 131-135.
- **Andrews JI, Diekema DJ, Hunter SK, Rhomberg PR, Pfaller MA , Jones RN, Doern GV.** Group B streptococci causing neonatal bloodstream infection: Antimicrobial susceptibility and serotyping results from SENTRY enters in the Western Hemisphere. *American Journal Obstet Gynecol* 2000; 183: 859-862
- **Anthony BF, Eisenstadt, R, Carter J, Ski, K, Hobel CJ.** Genital and Intestinal Carriage of Group B Streptococci During Pregnancy. *J Infect Dis* 1981; 143(6): 761-766

- **Anthony BF, Okada DM, Hobel CJ.** Epidemiology of Group B *Streptococcus*: longitudinal observations during pregnancy. *J Infect Dis* 1978; 137:34-38
- **Badri MS, Zawaneh S, Cruz AC, Mantilla G, Baer H Spellacy WN.** Rectal colonization with group B *Streptococcus*: Relationship to vaginal colonization of pregnant women. *J Infect Dis* 1977. 132 (2): 308-312
- **Baker CJ, Clark DJ, Barrett FF.** Selective broth medium for isolation of group B streptococci. *Appl Microbiol* 1973; 26:884-885
- **Baker CJ, Edwards MS.** Group B streptococcal infections: Perinatal impact and prevention methods. *Ann NY Acad Sci* 1988; 549: 193-202
- **Baker CJ, Goroff DK, Alpert S, Crockett VA, Zinner SH, Evrard JR.** Vaginal colonization with group B *Streptococcus*: a study in college women. *J Infect Dis* 1977; 135 (3): 392-397
- **Baker CJ, Kasper DL.** Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. *N Engl J Med* 1976; 1; 294:753-756.
- **Baker CJ, Paoletti LC, Rench MA, et al.** Use of capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine for type II group B streptococcus in healthy women. *J Infect Dis.* 2000; 182: 1129-1138
- **Benitz WE, Gould JB, Durzin ML.** Antimicrobial prevention of early onset group B streptococcal sepsis: estimates of risk reduction based on a critical literature review. *Pediatrics* 1999; 103: e78.
- **Berardi A.** Universal antenatal screening for group B streptococcus in Emilia-Romagna. *J Med Screen.* 2011;18(2):60-4
- **Bergeron MG, Gagnon M, Ke D, mnier M, Ménard C, Picard FJ et al.** Less than one hour detection of group B streptococci in pregnant women during labor: a prospective study. In: Abstracts of 39th Interscience Conference on

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Francisco. Whashington DC. American Society for Microbiology. 1999; 225.

- **Bergeron MG, Ke D, Ménard C, Picard J, Gagnon M, Bernier M, Ouellette M, Roy, PH, Marcoux S, Fraser W.** Rapid Detection of Group B Streptococci en pregnant women at delivery. The New England Journal of Medicine. 2000; 343: 175-179.
- **Bergh K, Stoelhaug A, Loeseth K, Bevanger L.** Detection of group B streptococci (GBS) in vaginal swabs using real-time PCR with TaqMan probe hybridization. 2004; 119:221-223
- **Betriu C, Culebras E, Gómez M, Rodríguez-Avial I, Sánchez BA, Agreda M. C, Picazo JJ.** Erythromycin and Clindamycin Resistance and Telithromycin Susceptibility in *Streptococcus agalactiae*. Antimicrob Agents Chemother. 2003 , 47: 1112-1114
- **Bhushan R, Anthony BF, and Frasch CE.** Estimation of Group B Streptococcus Type III Polysaccharide-Specific Antibody Concentrations in Human Sera Is Antigen Dependent Infect Immun. 1998; 66(12): 5848–5853
- **Bingen E, Denamur E, Lambert-Zechovsky N, Aujard Y, Brahimi N, Geslin P, Elion J.** Analysis of DNA restriction fragment length polymorphism extends the evidence for breast milk transmission in *Streptococcus agalactiae* late-onset neonatal infection. J Infect Dis. 1992 Mar; 165(3):569-73.
- **Blanc WA.** Pathways of fetal and early neonatal infection. Viral placentitis, bacterial and fungal chorioamnionitis. J Pediatr. 1961 Oct; 59: 473-96.
- **Blancas D, Santin M, Olmo M, Alcaide F, Carratala J, Gudiol F.** Group B Streptococcal Disease in Nonpregnant Adults: Incidence, Clinical Characteristics, and Outcome. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23: 168–173
- **Block TE, Munson A, Culver K, Vaughan and J. E. Hryciuk.** Comparison of carrot broth- and selective Todd-Hewitt broth-enhanced PCR protocols for real-time detection of *Streptococcus agalactiae* in prenatal vaginal/anorectal specimens. J. Clin. Microbiol. 2008. 46:3615-3620

- **Boyer KM and Gotoff SP.** Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease with selective intrapartum chemoprophylaxis. *New England Journal of Medicine.* 1986; 314: 1665-9.
- **Boyer KM, Gotoff SP.** Strategies for chemoprophylaxis of GBS early onset infection. *Antibiot Chemother.* 1985; 35: 267-280
- **Brimil NE, Barthell U, Heindricks M, Kuhn R, Lutticken R and Spellerberg B.** Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* colonization in Germany. *Int. J. Med. Microbiol.* 2006; 296:39–44.
- **Brown JH.** Double-zone b-hemolytic streptococci. *J. Bacteriol.* 1939; 133-134
- **Butter MNW, de Moor CEE.** *Streptococcus agalactiae* as cause of meningitis in the newborn, and bacteraemia in adults. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1967; 33: 439-450
- **Carazo C.** Influencia de la composición del medio de cultivo sobre la producción de pigmento por *Streptococcus agalactiae*. Tesis doctoral. Universidad de Granada, 1993.
- **Centelles-Serrano MJ, Pérez-Moreno MO, Llovet-Lombarte MI, Cortell-Ortolá M, Jardí-Baiges AM y José Ignacio Buj-González JI.** Impacto de la investigación sistemática de estreptococo del grupo B en orina en la identificación de gestantes colonizadas. 2009. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*;27 (7):394–398.
- **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. 2002. *MMWR Recomm Rep.* 2002 Aug 16;51(RR-11):1-22.
- **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. Revised Guidelines from CDC 2010 Recommendations and Reports, November 19, 2010 / 59(RR10);1-32.

- **Centers for Disease Control. (CDC).** Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. 2010. 2010. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 59 (RR-12): 1-110
- **Coldford JM, Mohle-Boetani J, Vosti KL.** Group B streptococcal bacteraemia in adults: Five years' experience and a review of the literature. *Medicine.* 1995; 74: 176-190.
- **Coll P, Codom MJ, Mirelis B, Ausin V, Prats G.** La susceptibilidad del trimetropim-sulfametoxazol en la diferenciación de estreptococos. *Laboratorio* 1985; 79: 287-292
- **Connellan M, Wallace EM.** Prevention of perinatal group B streptococcal disease: screening practice in public hospitals in Victoria. *MJA.* 2000; 172: 317-320
- **Convert M, Martinetti Lucchini G, Dolina M and Piffaretti JC .** Comparison of LightCycler PCR and culture for detection of group B streptococci from vaginal swabs. *Clin Microbiol Infect.* 2005. 11: 1022–1026
- **Currie AJ, Curtis S, Strunk T, Riley K , Liyanage K, Prescott S, Doherty D, Simmer K, Richmond P, Burgner D.** Preterm Infants Have Deficient Monocyte and Lymphocyte Cytokine Responses to Group B Streptococcus: 2011. *Infect Immun.* 79(4): 1588–1596.
- **Chan KL, Levi K, Towner KJ, Weston VC, Ramsay MM, Kean LH.** Evaluation of the sensitivity of a rapid polymerase chain reaction for detection of group B streptococcus. 2006. *J Obstet Gynaecol.* 26(5):402-6.
- **Chaudhary U, Sabharwal U, Gupta A, et al.** Group B streptococci in IUCD users. *Indian J Med Res.* 1986; 84:358-360
- **Chen KT, Puopolo KM, Eichenwald EC, Onderdonk AB, Lieberman E.** No increase in rates of early-onset neonatal sepsis by antibiotic-resistant group B Streptococcus in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. 2005. *Am J Obstet Gynecol.*;192(4):1167-71.

- **Christie R, Atkins NE, Munch-Petersen E.** A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1944; 22: 197-200.
- **Daniels J, Gray J, Pattison H, Gray R, Hills R, Khan K and on behalf of the GBS Collaborative Group.** Intrapartum tests for group B streptococcus: accuracy and acceptability of screening..*BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology.* 2011; 118: 257–265.
- **Davies HD, Miller MA, Faro S, Gregson D, Kehl SC and Jordan JA.** Multicenter Study of Rapid molecular–Based Assay for the diagnosis of Group B *Streptococcus* Colonization in Pregnant Women. *Clinical Infections Diseases.* 2004; 39: 1129-35.
- **De la Rosa M, Carazo C, Peis JI, De cueto M, García V.** Pigment enhancing effect of folate antagonist on group B streptococci. *Progrem. Abstr. XI Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal diseases, Siena (Italia), 1990. Abstr. 172.*
- **De la Rosa M, Pérez M, Carazo C, Pareja L, Orts A, Cantudo P.** Medios de cultivo para la detección e identificación de *Streptococcus agalactiae*. *Microbiología SEM,* 1994; 10; 181-186.
- **De la Rosa M, Pérez M, Carazo C, Pareja L, Peis JI, Hernández F,** New Granada Médium for detection and identification of Group B Streotococci. *Journal of Clinical Microbiology* 1992; 30: 1019-1021.
- **De la Rosa M, Villareal R, Vega D, Miranda C, Martínez-Brocal A,** Granada medium for detection and identification of Group B Streptococci. *Journal of Clinical Microbiology.* 1983; 18: 779-7785.
- **Denning DW, Bressack M, Troup NJ, et al.** Infant with two relapses of group B streptococcal sepsis documented by DNA restricción enzyme analysis. *Pediatr Infect dis J.*1988; 7:729-732
- **Desa DJ, Trevenen CL.** Intrauteine infections with group B b-haemolytic streptococci. *Br J Obst Gynaecol.* 1984; 91: 237-239

- **Deveikis A, Schauf V, Mizen M, Riff.** Antimicrobial Therapy of experimental group B streptococcal infection in mice. *Antimicrob Agentes Chemother.* 1977; 11: 817-820
- **Dillon HC Jr, Gray E, Pass MA, Gray BM.** Anorectal and vaginal carriage of group B streptococci during pregnancy. *J Infect Dis.* 1982; 145: 794-799.
- **Dillon HC Jr, Khare S, Gray BM.** Group B Streptococcal carriage and disease: A 6-years prospective study. *J Pediatr.* 1987; 110: 31-36
- **Dimitriev A, Suvorov A, Shen AD, Ynag YH.** Clinical diagnosis of group B streptococci by *spcB* gene based PCR. *Indian J Med Res;* 2004; 119; 233-236
- **Domingo P, Barquet N, Alvarez M Coll P, Nava J, Garau J.** Group B streptococcal meningitis in adults: report of twelve cases and review. *Clin Infect Dis* 1997; 25(5): 1180-1187
- **Dunne WM Jr, Holland-Staley CA.** Comparison of NNA Agar Culture and Selective Broth Culture for Detection of Group B Streptococcal Colonization in Women *J Clin Microbiol.* 1998; 36(8): 2298–2300.
- **Easmon CSF, Hastings MGJ, Deeley J, Bloxham B, Rivers RPA, Marwood R.** The effect of intrapartum chemoprophylaxis on the vertical transmission of group B streptococci. *Br J Obstet Gynecol.* 1983; 90: 633-635
- **Edwards MS, Baker CJ.** Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis.* 2005;41(6):839-847
- **Edwards M and Baker C.** *Streptococcus agalactiae.* En: Mandell G, Bennett J, Dolin R, editors. *Principes and practice if infectious diseases, Seventh Edition.* Churchill Livingstone Elsevier. Philadelphia. 2010
- **Edwards MS, Nizet V, and Baker.** En: Remington and Jerome O. Klein. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn. Sith Edition.* Elsevier Saunders Philadelphia. 2006.

- **Edwards RK, Jamie WE, Sterner D, Gentry S, Counts K, Duff P. m** Intrapartum antibiotic prophylaxis and early-onset neonatal sepsis patterns.2003.Infect Dis Obstet Gynecol;11(4):221-6.
- **Eickhoff TC, Klein JO, Daly AL.** Neonatal sepsis and other infections due to group B Beta-hemolytic streptococci. 1964. N Engl J Med. 271:1221-1228
- **Elbaradie SM, Mahmoud M, Farid M.** Maternal and neonatal screening for Group B streptococci by SCP B gene based PCR: A preliminary study. 2009.Indian J Med Microbiol.2009;27:17-21.
- **Fallon R. J.**The rapid recognition of Lancefield group B haemolytic streptococci. Journal of clinical Pathology. 1974; 24: 902-5
- **Farley MM, Harvey RC, Stull T Smith D Schuchat A, Wenger JD.** A population basd assment of invasive disease due to group B Streptococcus nonpregnant adults. New Eng J Med 1993; 328 (25): 1807-1811
- **Farley MM.** Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. Clin Infect Dis. 2001; 33:556-561.
- **Farrag OA, Gawad AA, Antar S.** Group B beta-haemolytic streptococcal colonization in women using intrauterine contraceptive devices. Contracepcion.1985; 31:595-602
- **Feng-Ying C. Lin, Leonard E. Weisman, James Troendle, Karen Adams.** Prematurity Is the Major Risk Factorfor Late-Onset Group B Streptococcus Disease at Hospital. 2003. J Infect Dis. (2003) 188 (2): 267-271
- **Fenton LJ, Harper MH.** Evaluation of colistin and nalidixic acid in Todd-Hwwit broth for selective isolation of group B streptococci. J Clin Microbiol 1979; 9:167-169
- **Fenton LJ, Harper MH.** Evaluation of colistin and nalidixic acid in Todd-Hewitt broth for selective isolation of group B streptococci. J Clin Microbiol 1979;9:167-9.

- **Fernández M, Hickman ME, Baker CJ.** Antimicrobial susceptibilities of group B streptococci isolated between 1992 and 1996 from patients with bacteraemia or meningitis. *Antimicrob Agents Chemoter.* 1998; 42: 1517-1519
- **Ferrieri P.** GBS enzymes, hemolysin, toxins and others products. *Antibiot Chemother.* 1985a; 35: 57-70.
- **Fluegge K, Siedler A, Heinrich B, Schulte-Moenting J, Moennig MJ, Bartels DB, Dammann O, von Kries R, Berner R; German Pediatric Surveillance Unit Study Group.** Incidence and clinical presentation of invasive neonatal group B streptococcal infections in Germany. 2006 Jun; 117(6):e1139-45. Epub 2006 May 8.
- **Fry R.** Fatal Infections by haemolytic Streptococcus group B. *Lancet* 1938; 1: 199-201.
- **Gavino M , Wang E .** A comparison of a new rapid real-time polymerase chain reaction system to traditional culture in determining group B streptococcus colonization. 2007. *Am J Obstet Gynecol* 197(4):388.e1-4 (2007)
- **Glantz JC, Kedley KE.** Concepts and controversies in the management of group B streptococcus during pregnancy. *Birth* 1998;25:45-53
- **Glaser, P, Rusniok, C, Buchrieser, C, Chevalier, F, Frangeul, L, Msadek, T, Zouine, M, Couvé, E, Lalioui, L, Poyart, C, Trieu-Cuot, P, Kunst, F.** Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Mol Microbiol* 45: 1499–1513
- **Goins WP, Talbot TR, Schaffner W, Edwards KM, Craig AS, Schrag SJ, Van Dyke MK, Griffin MR.** Adherence to perinatal group B streptococcal prevention guidelines. *Obstet Gynecol.* 2010 Jun; 115(6):1217-24.
- **Golden SM, Stamilio DM, Faux BM, De la Cruz, Shoemaker CT, Blackmon CL, Stassen SD, Clark VM, Smith JW, Jonson OL.** Evaluation of real-time fluorescent PCR assay for rapid detection of Group B Streptococci in neonatal blood. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004; 48:229-241

- **Goodrich JS, Miller MB.** Comparison of culture and 2 real-time polymerase chain reaction assays to detect group B Streptococcus during antepartum screening. 2007 *Diagn Microbiol Infect Dis.* ;59(1):17-22. Epub 2007 May 16.
- **Gray BM, Pass MA, Dillon HC.** Laboratory and field evaluation of selective media for isolation of group B streptococci. *J Clin Microbio.* 1979; 9:466-470
- **Green M, Dashefsky B, Wald ER, et al.** Comparison of two antigen assays for rapid intrapartum detection of vaginal group B streptococcal colonization. *J Clin Microbiol.* 1993; 31:78-83
- **Green PA, Singh KV, Murray BE, Baker CJ.** Recurrent group B streptococcal infections in infants: clinical and microbiologic aspects. *J Pediatr.* 1994 Dec;125(6 Pt 1):931-8.
- **Greenspoon, JS, Wilcox JG, Kirschbaum TH.** Group B Streptococcus: The Effectiveness of Screening and Chemoprophylaxis. 1991. *Obstetrical & Gynecological Survey.* 46(8):499-508
- **Gunn BA.** SXT and Taxo A disks for presumptive identification of group A and B streptococci in throat cultures. *J. Clin. Microbiol.* 1976; 4: 192-193
- **Gupta C, and Briski L. E.** Comparison of two Culture media and Three Sampling Techniques for Sensitive and Rapid Screening of Vaginal Colonization by Group B Streptococcus in Pregnant Women. *Journal of Clinical Microbiology.* 2004. 42: 3975-3977.
- **Haberland CA, Benitz W, Sanders GD, Pietzch JB, Yamada S, Nguyen, L and Garber AM.** Perinatal Screening for Group B Streptococci: Cost- Benefit Analysis of Rapid Polymerase Chain Reaction. 2002. *Pediatrics.* 110: 471-480
- **Hafner E, Stemme W, Rosen A, et al.** Group B streptococci during pregnancy: a comparison of two screening and treatment protocols. *Am J Obstet Gynecol.* 1998; 179: 677-681

- **Hamada S, Vearncombe M, McGeer A, Shah PS.** Neonatal group B streptococcal disease: incidence, presentation, and mortality. 2008 *J Matern Fetal Neonatal*;21(1):53-7.
- **Harburg TD, Leonard HA, Kimbroug RC III, et al.** Group B streptococcal meningitis appearing as acute deafness in adult. *Arch Neurol.* 1984; 41:214-216
- **Harrison LH, Ali A, Dwyer DM, et al.** Relapsing invasive group B streptococcal infection in adults. *Ann Intern Med.* 1995; 123:421-427
- **Hastings MJG, Easmon CSF, Neill J, Bloxham B, Rivers RPA.** Group B streptococcal colonisation and the outcome of pregnancy. 1986. *J Infect*; 12: 23–29.
- **Heath PT, Nik Yusoff NK, Baker CJ.** Neonatal meningitis. 2003. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* May;88(3):F173–F178.
- **Heath PT, Balfour G, Weisner AM, Efstratiou A, Lamagni TL, Tighe H, O'Connell LA, Cafferkey M, Verlander NQ, Nicoll A, McCartney AC; PHLS Group B Streptococcus Working Group.** Group B streptococcal disease in UK and Irish infants younger than 90 days. 2004. *Lancet.* 24;363(9405):292-4.
- **Heath PT, Balfour GF, Tighe H, Verlander NQ, Lamagni TL, Efstratiou A; HPA GBS Working Group.** Group B streptococcal disease in infants: a case control study. 2009. *Arch Dis Child.*;94(9):674-80. Epub 2009 May 19.
- **Henning KJ, Hall EL, Dwyer DM, et al.** Invasive group B streptococcal disease in Maryland nursing home residents. *J Infect Dis.* 2001; 183:1138-1142.
- **Henrichsen J.** The bacteriology of GBS. *Antibiot Chemother* 1985; 35: 53-56
- **Hiller JE, McDonald H M, Darbyshire P, Crowther CA.** Antenatal screening for Group B Streptococcus: A diagnostic cohort study. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2005, 5: 12.
- **Hillier.** En: Penelope J. Hitchcock Sexually transmitted diseases and adverse outcomes of pregnancy. 1999. ASM Press

- **Hodd M, Janney A, Dameron G.** Beta-hemolytic *Streptococcus* group b associated with problems of perinatal period. 1961. J Obstet Gynecol 82: 809-818.
- **Hoogkamp-Korstanje JA, Gerards LJ, Cats BP.** Maternal carriage and neonatal acquisition of group B streptococci. 1982 J Infect Dis. 145 (6): 800-803.
- **Ippolito DL, James WA, Tinnemore D, Huang RR, Dehart MJ, Williams J, Wingerd MA, Demons ST.** Group B streptococcus serotype prevalence in reproductive-age women at a tertiary care military medical center relative to global serotype distribution. 2010. BMC Infect Dis. 24;10:336.
- **Islam AK.** Primary carrier sites of group B streptococci in pregnant women correlated with serotype distributions and maternal parity. J Clin Pathol 1981;34:78-81
- **Islam AKMS.** Rapid recognition of group B streptococci. Lancet. 1977; i:256-257
- **Jauréguy F, Carton M, Teboul J, Butel MJ, Panel P, Ghnassia JC, Doucet-Populaire F.** Risk factors and screening strategy for group B streptococcal colonization in pregnant women: results of a prospective study]. 2003. J Gynecol Obstet Biol Reprod. 32(2):132-8.
- **Johri AK, Paoletti LC, Glaser P, Dua M, Sharma PK, Grandi G, Rappuoli R.** Group B Streptococcus: global incidence and vaccine development. 2006. Nat Rev Microbiol. 4(12):932-42.
- **Jones N, Bohnsack F, Takahashi S, Oliver K A, Chan MS, Kunst F, Glaser P, Rusiok C, Crook DWM, Hading RM, Bisharat N, Spratt G.** Multilocus Sequence typing System for Group B *Streptococcus*. J Clin Microbiol. 2003; 41:2530-2536
- **Jordan HT, Farley MM, Craig A, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, Lynfield R, Thomas A, Zansky S, Gershman K, Albanese BA, Schaffner W, Schrag SJ; Active Bacterial Core Surveillance (ABCs)/Emerging Infections Program Network, CDC.** Revisiting the need for vaccine prevention of late-

onset neonatal group B streptococcal disease: a multistate, population-based analysis. 2008 Dec *Pediatr Infect Dis J*.;27(12):1057-64.

- **Kadanali A, Altoparlak Ü. and Kadanali S.** Maternal carriage and neonatal colonisation of group B streptococcus in eastern Turkey: prevalence, risk factors and antimicrobial resistance. 2005. *International Journal of Clinical Practice*, 59: 437–440.
- **Kasper DL and Baker CJ.** Electron Microscopic Definition of Surface Antigens of Group B Streptococcus. *J Infect Dis*. 1979. 139 (2): 147-151
- **Kaufman D, Fairchild KD.** Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low-birth-weight infants. *Clin Microbiol Rev*. 2004 Jul;17(3):638-80.
- **Ke D, Ménard C, Picard J, Boissinot M, Roy PH and Bergeron MG.** Development of Conventional and Real- Time PCR Assays for the detection of Group B Streptococci. *Clinical Chemistry*. 2000. 46: 324-331
- **Koenig JM, Keenan WJ.** Group B streptococcus and early-onset sepsis in the era of maternal prophylaxis. 2009. *Pediatr Clin North Am.*; 56(3):689-708.
- **Kontnick CM, Edberg SC.** Direct detection of group B streptococci from vaginal specimens compared with quantitative culture. *J Clin microbial*. 1990; 28: 336-339
- **Kovavisarach E, Jarupisarnlert P, Kanjanaharuetai S.** The Accuracy of Late Antenatal Screening Cultures in Predicting Intrapartum Group B Streptococcal Colonization. *J Med Assoc Thai* 2008; 91 (12): 1796-800
- **Lancefield RC, Hare R.** The serological differentiation of pathogenic and non pathogenic strains of haemolytic streptococci from parturient women. 1935. *J Exp Med* 61: 335-349
- **Landis JR, Koch GG.** The measurement of observer agreement for categorical data. 1977. *Biometrics* 33:159-174.

- **Lefevre J-C, Lepagneur J-P, Bauriand R, et al.** Clinical and microbiologic features of urethritis in men in Toulouse, France. *Sex Trans Dis.* 1991; 18:76-79
- **Lerner PI, Gopalakrhna KV, Wolinky E, McHenry MC, Tan JS, Rosenthal M.** Group B *Streptococcus* (*S.agalactiae*) bacteraemia en adults: Analilysis of 32 cases and review of the literature. *Medicina (Baltimore)* 1977; 56: 457-474
- **Levine EM, Ghai V, Barton JJ, Strom CM.** Intrapartum antibiotic prophylaxis increases the incidence of gram-negative neonatal sepsis. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1999; 7(4): 210–213
- **Lim DV, Morales WJ, Walsh AF and Kazanis D.** Reduction of morbidity and mortality rates of neonatal group B streptococcal disease through early diagnosis and chemoprophylaxis. 1986. *J Clin Microbiol*, 23 pp. 489–492. |
- **Lin FY, Weisman LE, Azimi P, Young AE, Chang K, Cielo M, Moyer P, Troendle JF, Schneerson R, Robbins JB.** Assessment of intrapartum antibiotic prophylaxis for the prevention of early-onset group B Streptococcal disease. *Pediatr Infect Dis J.* 2011 Sep;30(9):759-63.
- **Lin FY, Brenner RA, Johnson YR, Johnson YR, Azimi PH, Philips JB, Joan A, Clark RP, Weisman LE, Rhoads GG, Kong F, Clemens JD.** The effectiveness of risk-based intrapartum chemoprophylaxis for the prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 184:1204-1210.
- **López Sastre J, Fernández Colomer B, Coto Cotallo GD.** Neonatal sepsis of vertical transmission. An epidemiological study from the «Grupo de Hospitales Castrillo». Neonatal Sepsis of Vertical Transmission. An epidemiological study from the “Grupo de Hospitales Castrillo”. 2009. *Early Hum Dev.*; 85:S100.
- **MacFaddin JF.** Biochemical test for identification of medical bacteria. In 2nd ed. Williams and Wilkins. Baltimore, 1980: 18-36

- **MacFarquhar JK, Jones TF, Woron AM, Kainer MA, Whitney CG, Beall B, Schrag SJ, Schaffner W.** Outbreak of late-onset group B Streptococcus in a neonatal intensive care unit. 2010. *Am J Infect Control.*; 38(4):283-8. Epub 2009
- **Madzivhandila M, Adrian PV, Cutland CL, Kuwanda L, Madhi SA.** Distribution of pilus islands of group B streptococcus associated with maternal colonization and invasive disease in South Africa. *J Med Microbiol.* 2012 Oct 11.
- **Madoff LC, Paoletti LC, Tai KJ, et al.** Maternal immunization of mice with group B streptococcal type III polysaccharide C protein conjugate elicits protective antibody to multiple serotypes. *J Clin Invest.* 1994; 94: 286-292
- **Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG.** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1998; 95: 3140-3145
- **Manning SD, Tallman P, Baker CJ, et al.** Determinants of co-colonization with group B streptococcus among heterosexual college couples. *Epidemiology.* 2002;13:533-539
- **Martins ER, Andreu A, Correia P, Juncosa T, Bosch J, Ramirez M, Melo-Cristino J., Microbiologist Group for the Study of Vertical Transmission Infections from the Catalan Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases.** Group B streptococci causing neonatal infections in Barcelona are a stable clonal population: 18-year surveillance. 2011. *J Clin Microbiol.* Aug;49(8):2911-8. 2011.
- **McKenna DS, Matson S and Northern I.** Maternal group B streptococcal (GBS) genital tract colonization at term in women who have asymptomatic GBS bacteriuria. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2003;11:203–207
- **Meiri-Bendek I, Lipkin E, Friedman A, Leitner G, Sarn S, Friedman S and Kashi Y.** A PCR-Based Method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in Milk. *J Dairy Sci.* 2002; 85:1717-1723

- **Melin, P.** Neonatal group B streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies. 2011. *Clinical Microbiology and Infection*, 17: 1294–1303.
- **Mercer BM, Taylor MC, Fricke JL, et al.** The accuracy and patient preference for selfcollected group B streptococcus cultures. *Am J Obstet Gynecol.* 1995.; 173:1325-1328
- **Meyn LA, Krohn MA, Hillier SL.** Rectal colonization by group B Streptococcus as a predictor of vaginal colonization. 2009. *American journal of obstetrics and gynaecology.* 201(9):76.e1-76.e7
- **Milligan TW, Doran RI, Straus DC, Mattingly SJ.** Growth and amino acid requirements of various strains of group B streptococci. *J Clin Microbiol.* 1978; 7:28-33
- **Minkoff HL, Sierra MF, Pringle GF, Schwarz RH.** Vaginal colonization with Group B beta-hemolytic streptococcus as a risk factor for post-caesarean section febrile morbidity. 1982. *Am J Obstet Gynecol.* Apr 15;142(8):992-5
- **Miranda C., Navarrete T.** Semmelweis y su aporte científico a la medicina: Un lavado de manos salva vidas. *Rev Chilena Infectol.* 2008 Feb;25(1):54-7. Epub 2008 Feb 8.
- **Moller M, Thomsen AC, Borch K, Dinesen K, Zdravkovic M.** Rupture of fetal membranes and premature delivery associated with group B streptococci in urine of pregnant women. *Lancet.* 1984 Jul. 14;2(8394):69-70.
- **Montibello SE, Guelfand LI, Machaín M G, Carrión N A, Ferreira MD, Pidone JC, Ceregido ME, Kaufman SC, Soloaga RN .** Optimización de metodologías de cribaje para la búsqueda de Streptococcus agalactiae en embarazadas. 2011. *Rev. argent. microbiol.* [revista en Internet].
- **Moylett EH, Fernández M, Rench MA, Hickman ME, Baker CJ.** A 5-year review of recurrent group B streptococcal disease: lessons from twin infants. 2000. *Clin Infect Dis.* Feb;30(2):282-7.

- **Morinis J, Shah J, Murthy P, Fulford M.** Horizontal transmission of group B streptococcus in a neonatal intensive care unit. 2011. *Paediatr Child Health*. Jun;16(6):e48-50.

- **Muñoz P, Llancaqueo A, Rodríguez-Creixems M, Peláez T, Martín L, Bouza E.** Group B *Streptococcus* bacteraemia in Nonpregnant Adults. *Arch Intern Med*. 1997; 157 (2): 213-216

- **Mustafa MM, Mckracken GH.** Perinatal bacterial diseases. En Feigin RD, Cherry JD, eds. *Pediatric infectious diseases*, 3^a ed. Filadelfia: WB Saunders, 1992; 891-924

- **Natarajan, G., Y. R. Johnson, F. Zhang, K. M. Chen, and M. J. Worsham.** Real-time polymerase chain reaction for the rapid detection of group B streptococcal colonization in neonates. 2006. *Pediatrics* **118**:14-22

- **Navas MC, García-Burquillo A, de Miguel S, Muñoz L, González C.** Evaluación de la aplicación del protocolo de prevención de la sepsis neonatal precoz por estreptococo del grupo B en el Hospital "Doce de Octubre" de Madrid. 2005. *Matronas Prof*.6(4):13-18

- **Nolla JM, Gómez-Vaquero c, Corbella X, et al.** Group B streptococcus (*Streptococcus agalactiae*) pyogenic arthritis in nonpregnant adults. *Medicine*. 2003; 82:119-128

- **Noya FJD, Rench MA, Metzger TG, et al.** Unusual occurrence of an epidemic of type Ib/c group B streptococcal sepsis in a neonatal intensive care unit. *J Infect Dis*. 1987. 155: 1135-1144.

- **Pacifici GM.** Placental transfer of antibiotics administered to the mother: a review.20006. *Int J Clin Pharm Ther* 2006; 44:57--63.

- **Paoletti LC, Madoff LC.** Vaccines to prevent neonatal GBS infection. *Seminars in Neonatology* 2002; 7:315-323

- **Pass MA, Gray BM, Dillon HC Jr.** Puerperal and perinatal infections with group B streptococci. *Am J Obstet Gynecol*. 1982 May 15;143(2):147-52

- **Perkins MD, Mirret S, Reller LB.** Rapid bacterial antigen detection is not clinical useful. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:1486-1491
- **Persson K, Kvist Christensen K, Forsgren A, Jörgensen C, Persson PH.** Asymptomatic bacteriuria during pregnancy with special reference to group B streptococci. *Scand J Infect Dis* 1985. 17: 185-199
- **Persson KM-S, Bjerre B, Elfström L, et al.** Faecal carriage of group B streptococci. *Eur J Clin Microbiol.* 1986; 5:156-159
- **Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, Craig AS, Schaffner W, Zansky SM, Gershman K, Stefonek KR, Albanese BA, Zell ER, Schuchat A, Schrag SJ; Active Bacterial Core surveillance/Emerging Infections Program Network.** Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA.* 2008 May 7;299(17):2056-65.
- **Philipson A, Sabath LD, Charles D.** Erythromycin and clindamycin absorption and elimination in pregnant women. 1976. *Clin Pharmacol Ther.* Jan;19(1):68-77
- **Picard FJ, Bergeron MG.** Laboratory detection of group B Streptococcus for prevention of perinatal disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004; 23 (9): 665-671
- **Pischel KD, Weisman MH, Cone RO.** Unique features of group B streptococcal arthritis in adults. *Arch Intern Med.* 1985; 145:97-102
- **Plummer H.** Serological and biochemical study of haemolytic streptococci. *J Immunol* 1941; 42: 91-107
- **Rallu FP, Barriga C, Scrivo V, Martel-Laferriere V, and Laferriere C.** Sensitivities of antigen detection and PCR assays greatly increased compared to that of the standard culture method for screening for group B streptococcus carriage in pregnant women. 2006. *J. Clin. Microbiol.* **44**:725-728

- **Ramos E, Gaudier FL, Hearing LR, et al.** Group B streptococcus colonization in pregnant diabetic women. *Obst Gynecol.* 1997; 89: 257-260
- **Regan J. A., Klebanoff M. A. and Nugent R. P.** Vaginal Infections and Prematurity Study Group. The epidemiology of Group B streptococcal colonization in pregnancy. *Obstetric Gynecology.* 1991; 77: 604-10.
- **Regan J. A., Klebanoff M. A., Nugent R. P, Eschenbach DA, Blankwelder WC, Lou Y.** Colonization with group B streptococci in pregnancy and adverse outcome. *Am J Obst Gynecol.* 1996; 174: 1354-1360
- **Réglier-Poupet H, Quesne G, Le Théo E, Dommergues M, Berche P, Trieu-Cuot P, Poyart C.** Prospective evaluation of a real-time PCR assay for detection of group B streptococci in vaginal swabs from pregnant women. 2005. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*;24(5):355-7.
- **Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP.** Update on detection of bacteraemia and fungemia. *Clin Microbiol Rev.* 1997 Jul; 10(3):444-65.
- **Riefler J III, Molavi A, Swartz D, et al.** Necrotizing fasciitis in adults due to group B streptococcus. *Arch Int Med.* 1988; 148: 727-729
- **Rodríguez RJ.** En: *Guía 10.0 SPSS para el Análisis de Datos*, capítulo 12: Análisis de variables categóricas. Octubre, 2004 p. 39 y 41..Disponible en: <http://www.uca.es/serv/sai/manuales/spss/Pantalla/12contin.pdf>
- **Rodríguez-Granger J, Alvargonzalez JC, Berardi A, Berner R, Kunze M, Hufnagel M, Melin P, Decheva A, Orefici G, Poyart C, Telford J, Efstratiou A, Killian M, Krizova P, Baldassarri L, Spellerberg B, Puertas A, Rosa-Fraile M.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 Feb 8.
- **Rolland K, Marois C, Siquier V, Cattier B, Quentin R.** Genetic Features of *Streptococcus agalactiae* Strains Causing Severe Neonatal infections, as Revealed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and *hylB* Gene Anlysis. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:1892-1898

- **Rosa-Fraile M, Rodríguez-Granger J, Cueto-López M, et al. Use of Granada medium to detect group B streptococcal colonization in pregnant women.** 1999. *J Clin Microbiol*; 37:2674--7.
- **Rufo, K.; Whiley, R. and Beighton, D.:** Streptococcus. In: Murray, P.; Baron, E.; Tenover, F and Tenover, R. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th. ed. ASM Press. Washington DC; 283-296, 1999.
- **Sambola A, Miro JM, Tornos MP, Almirante B, Moreno-Torrío A, Gurgui M, Martínez E, Del Río A, Azqueta M, Marco F, Gatell JM.** Streptococcus agalactiae infective endocarditis: analysis of 30 cases and review of the literature, 1962-1998. 2002. *Clin Infect Dis.* 2002 Jun. 15;34(12):1576-84. Epub 2002 May 24.
- **Sánchez Pérez, María José.** (Tesis doctoral). Desarrollo y aplicación de un programa de screening y profilaxis intraparto para prevención de la infección neonatal por Streptococcus Agalactiae / María José Sánchez Pérez ; [director Alfonso Ruiz-Bravo López] Granada : [s.n.], 1996. Disponible en facultad de Medicina. Universidad de Granada.
- **Schauf V, Deveikis A Riff L , et al.** antibiotic-killing kinetics of group B streptococci. *J Pediatr.* 1976; 89:194-198
- **Schrag A, Phil D, Zell R, Stat M, Lynnfield MD, Roome PHD, Arnold K. E, Allen MD, Graig MD, Lee H, Harrison MD, Reingold MD, Stefonek K, Smith G, Gamble M and Schuchat A.** A population- based comparison of strategies to prevent early-onset group B Streptococcal disease in neonates. *The New England Journal of Medicine.* 2002; 347: 233-9
- **Schrag A, Phil D, Zywichi M, Farley M, Reingold MDM, Lee H, Harrison MD, Lefkowitz LB, Hadler JL, Danila R, Cieslak PR, Stefonek K and Schuchat A.** Group B Streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *The New England Journal of Medicine.* 2000; 347: 15-20
- **Schrag SJ, Arnold KE, Mohle-Boetani JC, Lynfield R, Zell ER, Stefonek K, Noga H, Craig AS, Thomson Sanza L, Smith G, Schuchat.** Prenatal

screening for infectious diseases and opportunities for prevention. 2003. *Obstet Gynecol.* Oct; 102(4):753-60.

- **Schuchat A, Oxtoby M, Cochi S et al.** Population based risk-factors for neonatal group B streptococcal disease: results of a cohort study in metropolitan Atlanta. *J Pediatr.*1990. 162: 672-677

- **Schuchat A.** Group B *Streptococcus*. *Lancet.* 1999; 353:51-56

- **Schwartz B, Schuchat A, Oxtoby MJ, Cochi SL, Hightower A Broome CV.** Invasive group B Streptococcal disease en adults. A population-based study in metropolitan Atlanta. *JAMA* 1991; 266: 1112-1114

SEIMC. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Microbiología de la infección perinatal. Editor: Editor: Juan J. Picazo. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>

- **Shet A, Ferrieri P.** Neonatal and maternal group B streptococcal infections: a comprehensive review. *Ind J Med Res.* 2004; 120, 3: 141-150

- **Skoll MA, Mercer BM and Baselski V.** Evaluation of two rapid group B streptococcal antigen test in labor and delivery patients. *Obstetric Gynecology.* 1991; 77: 322-26.

- **Small CB, Slater NL, Lowy FD, et al.** Group B streptococcal arthritis in adults. *Am J Med.* 1984; 76:367-375

- **Spellerberg B.** Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. *Microbes Infec.* 2000. 2: 1733–1742.

- **Stoll BJ, Gordon T, Korones SB, et al.** Early onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development National Research Network. *J Pediatr.* 1996; 129:72-80.

- **Straka M, De la Cruz W, Backmon C, Johnson O, Stassen S, Streitman D, Golden S, Stamilio D.** Rapid detection of group B *streptococcus* and

Escherichia coli in amniotic fluid using real fluorescent PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004; 50: 7-13

- **Sutton GP, Smirz LR, Clark DH, et al.** Group B streptococcal necrotizing fasciitis arising from episiotomy. *Obst Gynecol.*1985; 66: 733-736
- **Tamayo J, Gómez-Garcés JL, Alós JI.** Evaluation of Granada Plate for Detection of *Streptococcus agalactiae* in Urine Specimens from Pregnant Women. *J Clin Microbiol.* 2004; 48:2834-3836
- **Tang WM, Ho PL, Yau WP, et al.** Report of 2 fatal cases of adult necrotizing fasciitis and toxic shock syndrome caused by *Streptococcus agalactiae*. *Clin Infect Dis.* 2000; 31:e15-17
- **Thinkphamrop J, Limpongsanurak S, Festin M., Daly S, Scuchat, A, Lumbiganon P, Zell, E, Chipato T, Win, AA, Perilla, MJ, Tolosa J. and Whitney C.** Infections in International Pregnancy Study: Performance of the Optical Immunoassay Test for Detection of Group B Streptococcus. *Journal of Clinical Microbiology.*2003. 41: 5288- 5290)
- **Towers CV, Rumney PJ, Asrat A, Preslicka C, Ghamsary M and Nageotte MP.** The accuracy of late third-trimester antenatal screening for group B streptococcus in predicting colonization at delivery. 2010.*Am J Perinat* 27(10):785-90
- **Tseng PI, Kandall SR.** Group B streptococcal disease in neonates and infants. *N Y State J Med.* 1974; 74:2169-2173
- **Tuppurainem N, Hallman M.** Prevention of neonatal group B streptococcal disease: intrapartum detection and chemoprophylaxis of heavy colonized parturient. *Obstet Gynecol.* 1989; 73: 583-587
- **Uh Y, Kim HY, Jang IH, Hwang GY, Yoon KJ.** Correlation of Serotypes and Genotypes of Macrolide-Resistant *Streptococcus agalactiae*. *Yonsei Med J.* 2005 Aug;46(4):480-483. Published online 2005 August 31

- **Uhl JR, Vetter EA, Boldt KL, Johnson BW, Ramin K. D, Adams MJ, Ferrieri P, Reischl U and Cockerill III, F. R.** Journal of Clinical Microbiology. 2005. 43: 4046-4051

- **Valkenburg-van den Berg AW, Sprij AJ, Oostvogel PM, Mutsaers JAM, Renes WB, Rosendaal FR, Dörr PJ.** Prevalence of colonisation with group B Streptococci in pregnantwomen of a multi-ethnic population in The Netherlands. 2006.European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 124:178–183

- **Vergnano S, Embleton N, Collinson A, Menson E, Russell AB, Heath P.** Missed opportunities for preventing group B streptococcus infection. 2010. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.;95(1):F72-3. Epub 2009 May 12.

- **Velaphi S, Siegel JD, Wendel GD Jr, Cushion N, Eid WM, Sanchez PJ.** Early-onset group B streptococcal infection after a combined maternal and neonatal group B streptococcal chemoprophylaxis strategy. Pediatrics. 2003;111:541–54726.

- **Wagner B, Wagner M, Kubin V.** Immunoelectron microscopic study of the location of group –specific and protein type-specific antigens of group B streptococci. 1980. J Gen Microbiol. 118:95-105

- **Waitkins S. A.** evaluation of the rapid methods of identifying group B streptococci. Journal of Clinical Patholog. 1980; 33: 302-5

- **Wang EEL, Hammerberg O, Lyn P, Peng H, Hunter D, Richarson H.** Rapid detection of group B streptococcal carriage in parturient women using starch serum medium. Clin Invest Med 1988; 11: 52-56

- **Weisner, A. M., A. P. Johnson, T. L. Lamagni, E. Arnold, M. Warner, P. T. Heath, and A. Efstratiou.** Characterization of group B streptococci recovered from infants with invasive disease in England and Wales. 2004. Clin. Infect. Dis. 38:1203-1208.

- **Wessels MR, Paoletti LC, Kasper DL, et al.** Immunogenicity in animals of a polysaccharide-protein conjugate vaccine against type III group B *Streptococcus*. J Clin Invest. 1990; 86: 1428-1433
 - **Winn, Washington C, Koneman, Elmer W.** Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 6th edition. 2006
 - **Wood EG, Dillon HC Jr.** A prospective study of group B streptococcal bacteriuria in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1981; 140:515-520
 - **Yancey MK, Armer T, Clark P and Duff P.** Assessment of rapid identification test for genital carriage of group b streptococci. Obstetric Gynecology. 1992; 80: 1038-47
 - **Yancey MK, Schuchat A, Brown LK, Ventura VL and Markenson GR.** The accuracy of late antenatal screening cultures predicting genital group B streptococcal colonization at delivery. Obstetric Gynaecology. 1996; 88: 811-815
- Yow MD, Leeds LJ, Thompson PK, Mason EO Jr, Clark DJ, Beachler CW**
The natural history of group B streptococcal colonization on the pregnant woman and her offspring: I. Colonization studies. Am J Obstet Gynecol. 1980; 137:34-38