

CLONAL DETECTION OF *Streptococcus agalactiae* Lehmann AND Neumann PARENTAL STRAINS BY RANDOM AMPLIFICATION OF POLYMORPHIC DNA



DETECCIÓN CLONAL DE CEPAS PARENTALES DE *Streptococcus agalactiae* Lehmann y Neumann POR AMPLIFICACIÓN ALEATORIA DE ADN POLIMÓRFICO

Cortese, I.J.^{1,2}, Novosak M.G.^{1,2}, Oviedo P.N.², Cannistraci Giolito R.E.³, Laczeski M.E.^{1,2}

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae (GBS) causes invasive infections in newborns, being the most frequent the maternal transmission. Epidemiological studies use molecular techniques that assess genetic diversity, including random amplification of polymorphic DNA (RAPD) that is found to be accessible, sensitive and uses arbitrary primers to amplify polymorphic segments of DNA by PCR. The objective was to determine the clonal relationship between GBS strains recovered from mothers and their respective newborns. Four pairs of GBS isolates obtained from vaginal-rectal swabs of mothers and blood cultures of their newborns were studied with RAPD. Primers OPS11, OPB17 and OPB18 were used to select one with the ability to discriminate between non-genetically related strains. The Hunter-Gaston formula that establishes the discrimination index (D) was used; when $D > 0.90$, it is considered that the isolates belong to different clones. The amplification profiles for the eight isolates, using each primer independently, allowed to calculate a $D=1$ for OPS11, and $D=0.84$ for OPB17 and OPB18. Therefore, OPS11 was selected for the study of the clonal relationship of the isolates, and similar amplification profiles were found by RAPD for each mother-newborn pair of GBS isolates. Different amplification profiles were observed between pairs of mother-newborn strains, which reveals the discrimination between unrelated strains, confirmed by pulsating field electrophoresis (PFGE). These results indicated vertical transmission for each studied case and robustness of the OPS11 primer. Appropriate conditions of the RAPD trial were found, which is useful for epidemiological studies.

Key words: *Streptococcus agalactiae*, neonatal disease, molecular epidemiology, RAPD technique, vertical transmission

RESUMEN

Streptococcus agalactiae (SGB) produce infecciones invasivas en neonatos siendo la transmisión materna la más frecuente. Estudios epidemiológicos utilizan técnicas moleculares que evalúan la diversidad genética, entre ellas la de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) que resulta ser accesible, sensible y utiliza cebadores arbitrarios para amplificar segmentos polimórficos de ADN mediante PCR. El objetivo fue determinar la relación clonal entre aislamientos de SGB recuperados de madres y sus respectivos recién nacidos. Se estudiaron por RAPD cuatro parejas de aislamientos de SGB obtenidos de hisopados vagino-rectales de madres y de hemocultivos de sus neonatos. Se utilizaron los cebadores OPS11, OPB17 y OPB18 para seleccionar uno con capacidad de discriminar entre cepas no relacionadas genéticamente. Se utilizó la fórmula de Hunter-Gaston que establece el índice de discriminación (D), cuando $D > 0,90$ se considera que los aislamientos pertenecen a clones diferentes. Los perfiles de amplificación para los ocho aislamientos, empleando independientemente cada cebador, permitieron calcular un $D=1$ para OPS11, y $D=0,84$ para OPB17 y OPB18. Por lo tanto, OPS11 fue seleccionado para el estudio de la relación clonal de los aislamientos, encontrándose perfiles de amplificación similares por RAPD para cada par de cepas madre-recién nacido. Se observaron diferentes perfiles de amplificación entre los pares de cepas madre-recién nacido, lo que revela la discriminación entre cepas no relacionadas, resultados confirmados por electroforesis en campo pulsante (PFGE). Estos resultados indican transmisión vertical para cada caso estudiado y robustez del cebador OPS11. Se encontraron condiciones apropiadas del ensayo de RAPD, lo que es útil para estudios epidemiológicos.

Palabras clave: *Streptococcus agalactiae*, enfermedad neonatal, epidemiología molecular, técnica RAPD, transmisión vertical.

¹Laboratorio de Biotecnología Molecular, Instituto de Biotecnología Misiones "Dra. María Ebe Recca" (InBioMis), CONICET, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales/FCEQyN, Universidad Nacional de Misiones/UNaM, Ruta 12 Km 7,5 (CP 3304), Posadas, Misiones, Argentina.

²Cátedra de Bacteriología, Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales/FCEQyN, Universidad Nacional de Misiones/UNaM, Avenida Mariano Moreno 1375 (CP 3300), Posadas, Misiones, Argentina.

³Cátedra de Bacteriología y Virología Médicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Córdoba, Escuela Práctica, Santa Rosa 1095 (CP 5000), Córdoba, Argentina.

Corresponding author:
Margarita Ester Laczeski
melaczeski@fceqyn.unam.edu.ar

 ORCID 0000-0002-8303-7874

Cite this article as:

Cortese, I.J., Novosak M.G., Oviedo P.N., Cannistraci Giolito R.E., Laczeski M.E. 2022. CLONAL DETECTION OF *Streptococcus agalactiae* Lehmann y Neumann PARENTAL STRAINS BY RANDOM AMPLIFICATION OF POLYMORPHIC DNA. BAG. Journal of Basic and Applied Genetics XXXIII (1): 37–44.

Received: 03/29/2021

Revised version received: 07/13/2021

Accepted: 09/22/2021

General Editor: Elsa Camadro

DOI: 10.35407/bag.2022.33.01.04

ISSN online version: 1852–6233

Available online at
www.sag.org.ar/jbag

INTRODUCCIÓN

Streptococcus agalactiae (*Streptococcus* del grupo B, SGB) es un microorganismo que coloniza el tracto gastrointestinal y genitourinario humano (Barcaite *et al.*, 2014). Su colonización puede ser transitoria, intermitente o crónica, y los factores que influyen en su persistencia aún son desconocidos (Patras *et al.*, 2015; Sarrión-Sos *et al.*, 2018).

La enfermedad invasiva por SGB se identificó por primera vez en adultos y neonatos en la década de 1960 (Raabe y Shane, 2019). La vía de transmisión al feto o al recién nacido ocurre a partir de la colonización recto-vaginal materna (Russell *et al.*, 2017). En mujeres embarazadas colonizadas, las bacterias pueden ascender desde el tracto genitourinario hacia el útero o la vejiga. En el útero, pueden afectar las membranas fetales y causar corioamnionitis, lo que puede provocar parto prematuro, aborto espontáneo o la muerte fetal intrauterina. Alternativamente, la bacteria puede invadir el tracto respiratorio del recién nacido mediante la aspiración del líquido amniótico o por su pasaje por el canal de parto y causar neumonía. También puede destruir el revestimiento alveolar utilizando factores de virulencia y llegar al torrente sanguíneo, desencadenando bacteriemia y sepsis. Una vez en sangre, las bacterias pueden cruzar la barrera hematoencefálica y migrar al líquido cefalorraquídeo (LCR) produciendo meningitis (Hanna y Noor, 2020). Las tasas de transmisión del SGB madre-recién nacido varían en todo el mundo, sin embargo, los informes describen tasas de alrededor de 0,53 por 1.000 nacidos vivos (Do Nascimento *et al.*, 2019).

Se describieron dos formas de enfermedad invasiva por SGB en niños en función de la edad de presentación: la enfermedad de inicio temprano (*early onset disease*; EOD) que ocurre durante los primeros seis días de vida, y la enfermedad de inicio tardío (*late onset disease*; LOD) que se desarrolla entre los siete y 90 días después del nacimiento, se manifiesta con meningitis y bacteriemia y es de transmisión materna o intranosocomial (Manrique Martín *et al.*, 2020).

La EOD, la más severa y de mayor importancia clínica, surge de la transmisión vertical de una madre colonizada a su recién nacido durante o inmediatamente antes del nacimiento, con signos clínicos que ocurren dentro de las 24-48 h en más del 90% de los casos (Collin *et al.*, 2019). Los factores de riesgo para la EOD incluyen colonización vaginal o rectal materna, bacteriuria por SGB durante el embarazo, trabajo de parto prolongado, rotura prematura de membranas, bajo peso al nacer, prematuridad, fiebre intraparto y enfermedad sistémica materna por SGB (Nanayakkara *et al.*, 2018; Raabe y Shane, 2019). Por otro lado, las manifestaciones típicas de la EOD incluyen dificultad respiratoria como apnea o taquipnea, respiración entrecortada, cianosis, letargo,

mala alimentación, distensión abdominal, palidez, ictericia, taquicardia e hipotensión. La bacteriemia es la forma más común de EOD producida por SGB, manifestada en el 80% de los casos, mientras que la neumonía y meningitis son menos comunes y representan el 15% y 5% a 10%, respectivamente (Raabe y Shane, 2019; Hanna y Noor, 2020).

La gravedad de la EOD está determinada en gran medida por factores de virulencia necesarios para la interacción célula huésped-bacteria (Herbert *et al.*, 2004); uno de ellos, la cápsula polisacárida, permite la clasificación de SGB en los serotipos Ia, Ib, II a IX (Hanna y Noor, 2020). Algunos serotipos se asocian con clones más virulentos y, por lo tanto, con una propensión a la enfermedad invasiva por SGB, por ejemplo, el III, que se asocia con frecuencia con el complejo clonal hipervirulento y representa el 43% de la EOD y el 73% de la LOD, y el IV, que causa el 97% de las infecciones severas en neonatos (Raabe y Shane, 2019; Russell *et al.*, 2017). A partir de 1996 el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, 1996; CDC, 2002; CDC, 2010) publicó directrices para la prevención de la enfermedad perinatal, a partir de la búsqueda de SGB en toda mujer embarazada entre 35 y 37 semanas de gestación. Teniendo en cuenta la importancia de implementar acciones y decisiones de salud pública, en nuestro país, desde abril del año 2008, se encuentra vigente la Ley Nacional N° 26.369 (2008) que establece la obligatoriedad de la búsqueda de portación de SGB en toda mujer con edad gestacional entre 35 y 37 semanas, presenten o no condiciones de riesgo.

En las últimas tres décadas se han desarrollado técnicas moleculares orientadas al estudio de la diversidad genética entre microorganismos estrechamente relacionados, entre ellas polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (Chatellier *et al.*, 1996), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (Manning, 2003), electroforesis enzimática multilocus (Quentin *et al.*, 1995), ribotipado (Huet *et al.*, 1993) y amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) (Toresani *et al.*, 2001). Si bien se ha demostrado que PFGE es una técnica precisa y fiable, utilizada como método estándar en laboratorios de mediana y alta complejidad (Åberg *et al.*, 2019), su aplicación es compleja, costosa y requiere de mucho tiempo en comparación con la facilidad y velocidad de ejecución de las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En este sentido la técnica RAPD es accesible y sensible, por lo que su aplicación en estudios de variabilidad es especialmente útil para realizar análisis intraespecíficos. Esta técnica se realiza con pequeñas cantidades de ADN y con cebadores sintéticos cortos con una secuencia al azar de aproximadamente 9-10 bases de longitud, cuya selección es un paso

crítico. Estos marcadores tienen la ventaja de amplificar regiones del genoma que pueden ser transcriptas como así también regiones no codificantes (Rolim *et al.*, 2011). La amplificación de fragmentos se produce debido a las diferencias en la distancia entre los sitios de unión del cebador produciendo perfiles de bandas específicos para una cepa determinada (Idil y Bilkay, 2014).

En este contexto, si bien la pesquisa de colonización materna y la instauración de la profilaxis intraparto (PIP) con antimicrobianos a toda embarazada colonizada es obligatoria, la mortalidad del recién nacido es aún elevada, principalmente en partos pre-término o con factores de riesgo subyacentes. Por ello, el desafío actual está orientado a desarrollar nuevos métodos de diagnóstico y nuevas estrategias de prevención que incluyan el desarrollo de vacunas a fin de prevenir la incidencia de este microorganismo en el recién nacido (Chen *et al.*, 2013; Szymusik *et al.*, 2014).

Además, resulta importante para la región y el país, realizar estudios epidemiológicos ligados a la portación materna de SGB y su transmisión al recién nacido, y a la posible transmisión horizontal en centros de salud. Por ello, el objetivo de esta investigación fue determinar la relación clonal entre aislamientos de SGB recuperados de madres colonizadas y sus respectivos recién nacidos de dos hospitales argentinos por la técnica RAPD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bacterias

Se trabajó con cuatro aislamientos de SGB recuperados de mujeres luego del parto (estas pacientes habían llegado a los centros de salud sin realización previa de búsqueda de portación materna de SGB durante el embarazo) y cuatro aislamientos recuperados de sus respectivos recién nacidos con enfermedad invasiva por SGB, entre los años 2011 y 2016. Tres pares de aislamientos madre-hijo fueron del Hospital Escuela de Agudos “Dr. Ramón Madariaga” de Posadas, Misiones y el par restante del Hospital Materno Provincial “Dr. Raul F. Lucini” de Córdoba, Córdoba. Los seis aislamientos de Posadas se identificaron como E4669 madre y O4663 recién nacido; E2949 madre y O2963 recién nacido; E6149 madre y O6150 recién nacido (además, para la técnica de PCR se incluyó el aislamiento O6151 recién nacido recuperado de LCR del mismo paciente) y los dos de Córdoba como 6 madre y 7 recién nacido.

Las muestras maternas se tomaron con hisopo estéril del tercio anterior de vagina y de la zona ano-rectal. Se conservaron en medio de transporte Stuart (Venturi Transystem Stuart, Copan, Italia S.p.A) hasta la siembra en 1-2 mL de caldo Todd-Hewitt suplementado con colistina (10 µg mL⁻¹, Britania, Argentina) y ácido nalidíxico (15 µg mL⁻¹, Britania, Argentina) y se incubaron a 37° C durante 24 h. Luego se sembraron

con técnica para aislamiento en placas de agar con sangre ovina al 5% (Rafaela, Argentina). Las placas se incubaron en atmósfera microaeróbica a 37° C durante 24 h. La identificación bacteriana se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales y serología de grupo (aglutinación con partículas de látex, Phadebact Strep B Test-ETC International-Bactus AB, Suecia). El serotipo se determinó por técnica de aglutinación Statens Serum Institute (Strep-B. Latex, Copenhagen, Dinamarca). Ambas técnicas se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante.

De los recién nacidos se tomaron muestras de hemocultivos y LCR siguiendo las recomendaciones internacionales. La siembra e identificación bioquímica de los aislamientos neonatales de SGB se realizó con las mismas técnicas utilizadas para los aislamientos maternos. En la Tabla 1 se detallan las características de los aislamientos de SGB recuperados de los recién nacidos.

Todos los aislamientos se conservaron en leche descremada al 20% a -80° C en el Ceparío de la Cátedra de Bacteriología, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, hasta ser utilizados en esta investigación.

Extracción de ADN

Los aislamientos de SGB se cultivaron en caldo Todd-Hewitt (Britania, Argentina) y se incubaron a 37° C durante 24 h. La extracción de ADN bacteriano se realizó con el protocolo de Sambrook modificado (Cariaga Martínez y Zapata, 2007).

Selección de cebadores

Se realizó un análisis comparativo de los patrones de bandas generados para los aislamientos a partir de la técnica RAPD utilizando tres cebadores previamente diseñados para SGB (Martínez *et al.*, 2000) (Tabla 2). Se evaluó la utilidad de cada cebador para detectar aislamientos genéticamente no relacionados con el Índice de Simpson (D), calculado a partir de la siguiente fórmula (Hunter y Gaston, 1998).

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j (n_j - 1)$$

Donde N es el número total de los aislamientos en la población de la muestra, S es el número total de patrones de RAPD obtenidos y n_j es el número de aislamientos pertenecientes al tipo j-ésimo. Un índice superior a 0,90 permite la interpretación de resultados de tipificación fiables (Hunter y Gaston, 1998; Martínez *et al.*, 2000; Shadbad *et al.*, 2020).

Tabla 1. Datos de los aislamientos de *Streptococcus agalactiae* recuperados de recién nacidos con enfermedad invasiva de inicio temprano. Posadas-Córdoba, 2011-2016.

Código del aislamiento	Modo de nacimiento	Origen	Edad (días)	Sitio de aislamiento de SGB	Fecha de muestra
7	Parto	Córdoba	2	LCR*	03/03/2014
06150**	Parto	Posadas	1	Hemocultivos	16/03/2011
06151**	Parto	Posadas	1	LCR	16/03/2011
02963	Parto	Posadas	2	Hemocultivos	05/06/2013
04663	Parto	Posadas	1	Hemocultivos	14/04/2016

*LCR (líquido cefalorraquídeo) **Aislamientos recuperados del mismo paciente

Tabla 2. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para la técnica RAPD.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador 5' - 3'	Referencia bibliográfica
OPS11	AGTCGGGTGG	Martinez <i>et al.</i> , 2000
OPB17	AGGGAACGAG	Martinez <i>et al.</i> , 2000
OPB18	CCACAGCAGT	Martinez <i>et al.</i> , 2000

Generación de patrones RAPD

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 µL compuesto por solución tampón para PCR 1X (10X: 100 mM Tris-HCl pH 9, 500 mM KCl, 1% Triton® X-100), 100 mM dNTPs, 0,4 µM de cebador (Tabla 2), 2,5 mM MgCl₂, 50 ng µL⁻¹ de ADN molde y 2,5 U de ADN polimerasa Taq (Inbio Highway, Argentina).

Se utilizó un solo cebador en cada reacción de PCR. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Multigene TM II (Labnet internacional Inc., EE. UU.). El perfil de ciclado consistió en: pre-desnaturalización a 94° C durante 5 min, 40 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94° C durante 1 min, hibridación a 36° C durante 1 min, extensión a 72° C durante 1 min) y extensión a 72° C durante 5 min. Los productos de amplificación se revelaron en gel de agarosa al 1,2% (p/v) teñido con GelRed® (Sigma-Aldrich, Alemania).

La electroforesis se realizó en una cuba electroforética (Subsistema de electroforesis 70 Labnet International) a 100 V durante 3 h y las bandas se visualizaron usando un transiluminador UV (Modelo MUV 21-312-220).

Análisis de patrones de bandas obtenidos por RAPD y construcción del Dendrograma

En base a la distancia de migración, el tamaño de las diferentes bandas fue medido y extrapolado al correspondiente marcador de peso molecular mediante el programa *Graphpad Prism*.

Los dendrogramas se generaron con el programa estadístico para Excel, *XLSTAT* utilizando el método de grupos de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA). Se consideró que los aislamientos que tenían una similitud >75% en el índice de Dice con una

tolerancia de 3,5 tenían el mismo origen, lo que indicaría una posible transmisión entre la madre y el recién nacido.

Electroforesis en gel de campo pulsante

Los pares de cepas madre-recién nacido fueron enviadas al Servicio de Antimicrobianos de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) “Dr. Carlos Malbrán” para evaluar su relación clonal mediante PFGE. De acuerdo con el informe recibido, el ADN total se digirió con las enzimas de restricción *SmaI* y *ApaI* y se trabajó de acuerdo con el protocolo propuesto por Faccone *et al.* (2010) utilizando un equipo CHEF-DRIII.

RESULTADOS

Se detectó el serotipo III en tres pares de aislamientos madre-recién nacido, y el serotipo Ia en uno de ellos.

El cebador OPS11 mostró un perfil de amplificación nítido y un valor D igual a 1, mientras que los cebadores OPB17 y OPB18 mostraron patrones de bandas no concluyentes y un valor D de 0,84. En la Figura 1 se muestran los perfiles de bandas obtenidos a partir de la técnica RAPD utilizando los tres cebadores. En base a los patrones de bandas observados y a los valores obtenidos para D, se seleccionó el cebador OPS11 para el análisis de los pares de cepas madre-recién nacido, y para su posterior comparación con los resultados generados por la técnica PFGE.

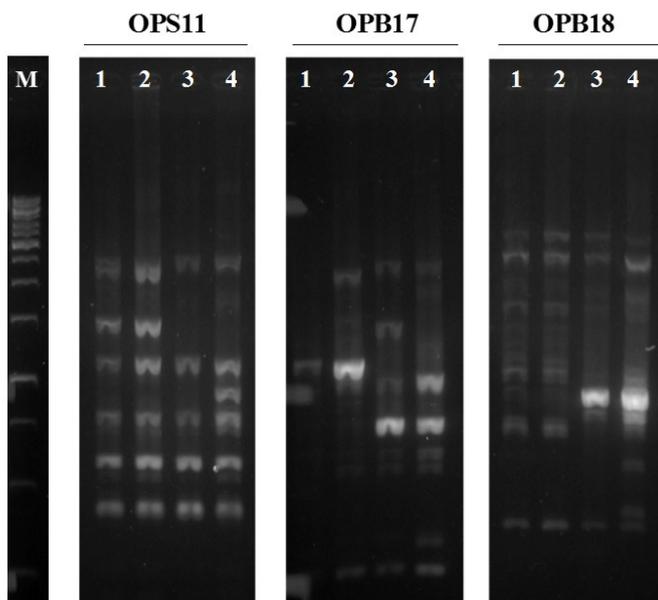


Figura 1. Perfiles de bandas electroforéticas obtenidos por la técnica RAPD utilizando los cebadores OPS11, OPB17 y OPB18.

El cebador OPS11 permitió caracterizar individualmente a cada cepa estudiada. El análisis genómico de los aislados de SGB reveló cuatro perfiles de bandas diferentes indicando la presencia de cuatro clones, lo que demuestra una relación entre el aislamiento materno y la infección del recién nacido en los cuatro casos. Por otro lado, no se evidenció una relación epidemiológica entre las cepas de diferentes pares de madre-recién nacido, a pesar de pertenecer al mismo serotipo (Figura 2).

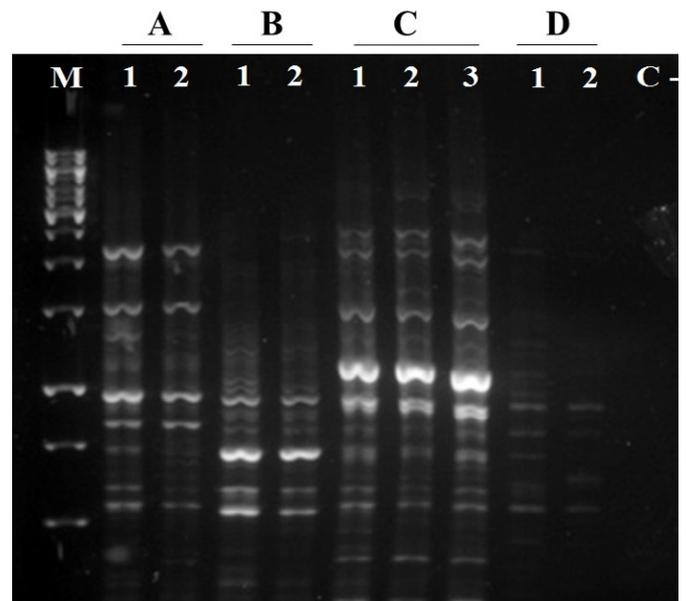


Figura 2. Perfiles de bandas electroforéticas obtenidos por la técnica RAPD utilizando el cebador OPS11, comparación entre los aislamientos de *Streptococcus agalactiae* obtenidos de madre-recién nacido: (A) E4669 madre y O4663 recién nacido; (B) E2949 madre y O2963 recién nacido; (C) E6149 madre y O6150 recién nacido; O6151 recién nacido y (D) 6 madre y 7 recién nacido.

El informe de PFGE del Servicio de Antimicrobianos de la Administración Nacional de Laboratorios y Servicios de Salud (ANLIS) “Dr. Carlos Malbrán”, fue el siguiente: La restricción con *ApaI*, sólo permitió tipificar las cepas 6 madre y 7 recién nacido que dieron perfiles indistinguibles entre sí. Los seis aislamientos restantes resultaron no con *ApaI* en tres oportunidades. Usando *SmaI*, los aislamientos 6 madre y 7 recién nacido presentaron un perfil de restricción similar con dos bandas de diferencia, lo que implicaría que corresponden a subtipos de un mismo clon. Los seis aislamientos restantes E4669 madre y O4663 recién nacido; E2949 madre y O2963 recién nacido; E6149 madre y O6150 recién nacido, que no pudieron tipificarse con *ApaI*, al hacer la restricción con *SmaI* se pudieron diferenciar en tres tipos clonales. Cada uno de estos tipos clonales corresponde a una dupla madre e hijo, indistinguibles entre sí.

Los resultados obtenidos por PFGE permiten determinar que en todos los casos los pares de aislamientos madre-recién nacido estuvieron genéticamente relacionados entre sí, respaldando los resultados generados previamente con la técnica RAPD utilizando el cebador OPS11.

DISCUSIÓN

La diversidad genética entre cepas de SGB estrechamente relacionadas ha sido estudiada a partir de diferentes técnicas moleculares. Algunas metodologías como PFGE implican pasos que consumen mucho tiempo, reactivos costosos y equipos sofisticados, por lo que está restringida a laboratorios de referencia donde es aplicada como técnica estándar (Hansen *et al.*, 2004). Sin embargo la técnica RAPD, entre otras, ha sido utilizada en los últimos 30 años para determinar la relación entre los aislamientos de SGB (Shadbad *et al.*, 2020; Taniyama *et al.*, 2020). Se ha aplicado ampliamente para el análisis epidemiológico y se demostró su utilidad para el análisis genético rápido de cepas de SGB siendo capaz de detectar heterogeneidad genómica dentro de serotipos específicos (Brandolini *et al.*, 2014).

Estudios similares a nuestro trabajo fueron realizados por Brandolini *et al.* (2014) sobre casos de transmisión de SGB a través de la ingestión de leche materna. Para su investigación utilizaron la técnica RAPD para el análisis genético de hemocultivos, muestras de LCR y de leche materna. Los resultados revelaron cuatro perfiles de bandas diferentes que indicaron la presencia de cuatro clones, lo que demostró una relación entre la leche materna y la infección de los lactantes en los cuatro casos. Además, observaron que los patrones de bandas de SGB fueron idénticos dentro de cada conjunto de cepas, es decir, entre los aislamientos de hemocultivo y LCR neonatal y de la leche materna, lo que indicó la presencia del mismo clon. Por otro lado, los aislamientos obtenidos de cada par madre-recién nacido mostraron patrones de bandas claramente diferentes, descartando una correlación epidemiológica al igual que en el presente trabajo. De manera similar, Nanayakkara *et al.*, (2018), analizaron aislamientos obtenidos de madre-recién nacido mediante la técnica RAPD, el análisis reveló la presencia de una misma cepa de SGB en el 2,5% de los casos, indicando una transferencia entre la madre y el recién nacido.

Las investigaciones realizadas por Nanayakkara *et al.*, (2018) y Brandolini *et al.* (2014) apoyan los resultados obtenidos en el presente trabajo donde se detectaron cuatro patrones de bandas diferentes correspondientes a los cuatro pares de aislamientos madre-recién nacido analizadas. Este resultado apoya la idea que la colonización por SGB del recién nacido durante su paso por el canal de parto es la principal causa de EOD.

Por otra parte, un estudio realizado con PFGE por Hansen *et al.*, (2004) en aislamientos de SGB demostró que la cepa colonizadora era homogénea y estable en cada mujer embarazada estudiada. Los resultados indicaron que prácticamente todas las mujeres fueron colonizadas por un solo clon de SGB y en solo unas pocas, se encontraron dos clones diferentes simultáneamente. Para la aplicación de PFGE utilizaron las enzimas de restricción *ApaI*, *XhoI* y *NotI*, que no arrojaron resultados satisfactorios, y las enzimas *SmaI* o *SalI*, con las que se obtuvieron patrones de bandas de buena calidad. De la misma manera, en el presente trabajo la enzima de restricción *ApaI* solo logró distinguir uno de los pares de clones, mientras que *SmaI* permitió diferenciar cuatro tipos clonales correspondientes a cada par de cepas madre-recién nacido. Los resultados obtenidos por Hansen *et al.*, (2004) refuerzan la idea de que los recién nacidos se infectan con el mismo clon que coloniza a sus madres, a partir de la transmisión vertical de SGB.

De manera similar Hirai *et al.*, (2020) aplicaron la técnica PFGE para la caracterización de cepas invasivas de SGB aisladas de recién nacidos y adultos que desarrollaron la enfermedad. Para ello, al igual que en el presente trabajo, utilizaron la enzima de restricción *SmaI*. A partir de los patrones de bandas generados identificaron clones de SGB asociados a iguales serotipos, genotipos de resistencia y susceptibilidad a antibióticos, concluyendo la existencia de una transmisión horizontal en la comunidad durante 10 años.

El presente trabajo concuerda con otros investigadores en que RAPD es una técnica rápida, fácil y económica de realizar en comparación con los procedimientos alternativos para el análisis de ADN. Además, consideramos que la técnica de RAPD es suficientemente robusta para ser aplicada como una técnica analítica de ADN para investigaciones epidemiológicas de rutina (Martinez *et al.*, 2000; Brandolini *et al.*, 2014; Nanayakkara *et al.*, 2018). Si bien, Martinez *et al.* (2000) sugieren que la tipificación RAPD generada por la combinación de cebadores OPS11, OPB17 y OPB18 aumenta la capacidad de la metodología para detectar la variabilidad entre aislamientos, a partir de los valores obtenidos para D y los patrones de bandas observados en el presente trabajo, sostenemos que la aplicación individual del cebador OPS11 es capaz de diferenciar los pares de cepas madre-recién nacido.

Como se expuso anteriormente, la técnica de PFGE continúa siendo la técnica *gold* estándar elegida para estudios epidemiológicos, por lo que también fue incluida en nuestro análisis (Åberg *et al.*, 2019). En este sentido, la obtención de resultados similares por medio de las técnicas RAPD y PFGE aplicadas en el presente trabajo, nos permite proponer a la técnica RAPD como una alternativa para su aplicación en laboratorios de baja y mediana complejidad.

Finalmente, cabe destacar la importancia y trascendencia desde un enfoque clínico-epidemiológico de estos aislamientos parentales debido a la escasez de situaciones diagnósticas que permiten recuperar SGB en simultáneo tanto de la madre como de su recién nacido. Esto se debe fundamentalmente a que a partir de la implementación de la búsqueda obligatoria de SGB por Ley Nacional N° 26.369 en toda mujer embarazada entre 35-37 semanas de gestación, si se detecta colonización materna se implementa la PIP y se previene la infección neonatal. Por lo tanto, los cuatro aislamientos parentales recuperados en este estudio son valiosos y representativos para evaluar la transmisión vertical.

Este es el primer estudio en la región y en el país que ha optimizado la técnica RAPD para su aplicación en el estudio de SGB dentro de centros de salud y universidades de Argentina y países vecinos como Paraguay y Brasil. A futuro se espera que esta técnica sea reproducida en otros laboratorios para la obtención de un mayor número de datos epidemiológicos que permitan estudios más complejos sobre dispersión clonal de cepas de SGB en embarazadas e infecciones invasivas en recién nacidos.

CONCLUSIONES

Se seleccionó el cebador OPS11 por su robustez y capacidad para discriminar cepas de SGB no relacionadas a partir de la técnica RAPD.

Se confirmó la transmisión vertical y la relación clonal de SGB de las madres estudiadas a sus respectivos recién nacidos, por técnica de RAPD y por PFGE, que es la técnica de referencia, encontrando perfiles de bandas idénticos para cada par de aislamientos madre-recién nacido.

Se encontraron condiciones apropiadas para la técnica RAPD, que resulta de utilidad para realizar estudios epidemiológicos ligados a la portación materna de SGB y su transmisión al recién nacido, así como a la eventual transmisión horizontal de esta bacteria en centros de salud.

ASPECTOS ÉTICOS-REGULATORIOS

Este trabajo fue aprobado por el Comité Científico del Hospital Central “Dr. Ramón Madariaga” de la ciudad de Posadas, Misiones y por el Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud de los Hospitales Materno Provincial, Materno Neonatal y Misericordia de la ciudad de Córdoba, Córdoba.

Se obtuvo consentimiento informado por escrito para cada paciente y datos médicos confidenciales según protocolo de estudio: C10 “Prevalencia de colonización vaginal y rectal de *Streptococcus* betahemolítico grupo B (SGB o *Streptococcus agalactiae*) en mujeres embarazadas de 35-37 semanas de gestación”. Este estudio sólo

revisó a pacientes humanos, ningún animal participó en ningún aspecto del estudio.

Los autores afirman que conocen las normas bioéticas vigentes en la Argentina y en la Declaración de Helsinki y sus enmiendas.

AGRADECIMIENTOS

A los integrantes de la Cátedra de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones, especialmente a su ex Profesora Titular la Mgter. Marta Vergara por ser pionera en este tema en la provincia de Misiones. A la Mgter. Viviana Villalba, Jefa del Servicio de Bacteriología del Laboratorio del Hospital Escuela de Agudos “Dr. Ramón Madariaga” por su colaboración en el aislamiento e identificación de las cepas de *Streptococcus agalactiae* recuperadas de neonatos. A la Dra. Adriana Limansky, Profesora Asociada de Bacteriología del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, por su asesoramiento en la puesta a punto y ejecución de la técnica de RAPD.

REFERENCIAS

- Åberg E., Ottosson A., Granlund M., Saeedi B., Stamm C., Brune T., Tammelin A., Johansson S. (2019) Harboring group B streptococci in a neonatal intensive care unit led to an outbreak among preterm infants. *Acta Paediatr.* 108(1): 58-61.
- Barcaite E., Bartusevicius A., Tameliene R., Kliucinskas M., Maleckiene L., Nadisauskiene R. (2014) Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 87: 260-271.
- Brandolini M., Corbella M., Cambieri P., Barbarini D., Sasseria D., Stronati M., Marone P. (2014) Late-onset neonatal group B streptococcal disease associated with breast milk transmission: molecular typing using RAPD-PCR. *Early Hum. Dev.* 90: S84-S86.
- Cariaga Martinez A.E., Zapata P.D. (2007) Protocolos de Extracción de ADN. En: *El Laboratorio de Biología Molecular Universitaria de Misiones*. Editorial Universitaria, Misiones, Argentina, pp. 23-39.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (1996) Guía del CDC para quimioprofilaxis intraparto. *MMWR Recomm. Rep.* 45: 16-17.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2002) Prevention of perinatal group B streptococcal disease. *MMWR Recomm. Rep.* 51: 1-22.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2010) Prevention of perinatal group B: revised guidelines from CDC. *MMWR Recomm. Rep.* 59 (RR-10):1-31.
- Chatellier S., Huet H., Kenzi S., Rosenau A., Geslin P., Quentin R. (1996) Genetic diversity of rRNA operons of unrelated *Streptococcus agalactiae* strains isolated from cerebrospinal fluid of newborns suffering from meningitis. *J. Clin. Microbiol.* 34:2741-7.
- Chen V.L., Avci F.Y., Kasper D.L. (2013) A maternal vaccine against group B *Streptococcus*: past, present, and future. *Vaccine.* 31: 13-19.

- Collin S.M., Lamb P., Jauneikaite E., Le Doare K., Creti R., Berardi A., Heath P.T., Sriskandan S., Lamagni T. (2019) Hospital clusters of invasive Group B Streptococcal disease: A systematic review. *J. Infect.* 79(6): 521-527.
- Do Nascimento C.S., dos Santos N.F., Ferreir R.C., Taddei C.R. (2019) *Streptococcus agalactiae* in pregnant women in Brazil: prevalence, serotypes, and antibiotic resistance. *Braz. J. Microbiol.* 50(4): 943-952.
- Faccone D., Lalonardi F., Abel S., Machain M., Errecalde L., Littvik A., Kauffman S., Galas M., WHONET-Argentina Group; Corso A. (2010) Multiple-Clones of *Streptococcus agalactiae* harbouring *lnuB* gene. *J Infect Dev Ctries.* 4(9):580-2.
- Hanna M., Noor A. *Streptococcus* Group B. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553143/> (Acceso: mayo de 2020).
- Hansen S.M., Ulbjerg N., Kilian M., Sørensen U.B. (2004) Dynamics of *Streptococcus agalactiae* colonization in women during and after pregnancy and in their infants. *J. Clin. Microbiol.* 42(1): 83-9.
- Herbert M.A., Beveridge C.J., Saunders N.J. (2004) Bacterial virulence factors in neonatal sepsis: group B *Streptococcus*. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17: 225-9.
- Hirai N., Kasahara K., Nakano R., Ogawa Y., Suzuki Y., Ogawa M., Hishiya N., Nakano A., Ichimura S., Yano H. Yoshikawa, M. (2020) Clinical characteristics and molecular epidemiology of invasive *Streptococcus agalactiae* infections between 2007 and 2016 in Nara, Japan. *Plos one.* 15(10), e0240590.
- Huet H., Martin C., Geslin P., Grimont F., Quentin R. (1993) Ribotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from vaginas of asymptomatic women. *Res. Microbiol.* 144: 457-65.
- Hunter P.R., Gaston M.A. (1998) Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26(11): 2465-6.
- Idil N., Bilkay I.S. (2014) Application of RAPD-PCR for determining the clonality of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from different hospitals. *Braz Arch. Biol. Technol.* 57(4): 548-553.
- Ley Nacional N° 26.369. (2008) Examen obligatorio de detección del estreptococo Grupo B agalactiae a todas las embarazadas. *Boletín Oficial* N° 31399. Argentina.
- Manning S.D. (2003) Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*). *Front. Biosci.* 1:1-18.
- Manrique Martín G., García-Martín A., Rincón-López E., Saavedra-Lozano J. (2020) *Streptococcus agalactiae*: causa de artritis séptica inusual a partir de los 3 meses de edad. Caso clínico. *Arch. Argent. Pediatr.* 118(4): e392-e395.
- Martinez G., Harel J., Higgins R., Lacouture S., Daignault D., Gottschalk M. (2000) Characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates of bovine and human origin by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* 38(1): 71-8.
- Nanayakkara D., Liyanapathirana V., Kandauda C., Gihan C. Ekanayake A., Adasooriya D. (2018) Maternal vaginal colonization with selected potential pathogens of neonatal sepsis in the era of antimicrobial resistance, a single center experience from Sri Lanka. *BMC Infect. Dis.* 18(1): 351.
- Patras K.A., Rösler B., Thoman M.L., Doran K.S. (2015) Characterization of host immunity during persistent vaginal colonization by Group B *Streptococcus*. *Mucosal Immunol.* 8(6): 1339-48.
- Quentin R., Huet H., Wang F.S., Geslin P., Goudeau A, Selander R.K. (1995) Characterization of *Streptococcus agalactiae* strains by multilocus enzyme genotype and serotype: identification of multiple virulent clone families that cause invasive neonatal disease. *J. Clin. Microbiol.* 33(10):2576-81.
- Raabe V.N., Shane A.L. (2019) Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*). *Microbiol. Spectr.* 7: 10.1128.
- Rolim L.D.N., Cavalcante M.A.D.Q., Urben A.F., Buso G.S.C. (2011) Use of RAPD molecular markers on differentiation of Brazilian and Chinese *Ganoderma lucidum* strains. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 54(2): 273-281.
- Russell N.J., Seale A.C., O'Driscoll M., O'Sullivan C., et al. (2017) Maternal colonization with group B *Streptococcus* and serotype distribution worldwide: systematic review and meta-analyses. *Clin. Infect. Dis.* 65(S2): S100-111.
- Sarrión-Sos N., Morell-García M., Martínez-Sebastián L., Centeno-Rubiano J.M., Montesinos-Sanchis E., Orta-Sibú N. (2018) Síndrome celulitis-adenitis, una forma infrecuente de presentación de la sepsis neonatal tardía: A propósito de dos casos. *Arch Argent Pediatr.* 769-772.
- Shadbad M.A., Kafil H.S., Rezaee M.A., Farzami M.R., Dehkharghani A.D., Sadeghi J., Gholizadeh P., Khodaei F., Aghazadeh M. (2020) *Streptococcus agalactiae* clinical isolates in Northwest Iran: antibiotic susceptibility, molecular typing, and biofilm formation. *GMS Hyg. Infect. Control.* 15.
- Szymusik I., Kosińska-Kaczyńska K., Pietrzak B., Wielgoś M. (2014) Do we need a different approach to GBS screening? *Ginekol. Pol.* 85: 456-60.
- Taniyama D., Maruki T., Maeda T., Yoshida H., Takahashi T. (2020) Repetitive cellulitis caused by *Streptococcus agalactiae* isolates with different genotypic and phenotypic features in a patient having upper extremity with lymphedema after mastectomy and axillary lymph node dissection. *IDCases.* e00793.
- Toresani I., Limansky A., Bogado I., Guardati M.C., Viale A., Sutich E.G. (2001) Phenotypic and genotypic study of *Streptococcus agalactiae* in vagina of pregnant women in Argentina. *Medicina-B Aires.* 61(3):295-300.