

Identificación de serotipos de cepas de *Streptococcus agalactiae* aisladas de la colonización vaginal de mujeres gestantes mediante PCR en tiempo real

Identification of *Streptococcus agalactiae* strains serotypes isolated from the vaginal colonization of pregnant women by real-time PCR

Paloma Avilés^{1,2}, Daniel F. Escobar², Gisselle Barraza, Diego Díaz-Dinamarca², Loredana Arata², Daniel Soto², Janepsy Díaz³, Abel E. Vásquez^{2,4}.

1Universidad Tecnológica Metropolitana. Facultad de Ciencias Naturales, Matemática y del Medio Ambiente. Escuela de Industria Alimentaria y Biotecnología. 2Sección de Biotecnología. Subdepartamento Innovación, Desarrollo, Transferencia Tecnológica y ETESA. Departamento Agencia Nacional de Dispositivos, Innovación y Desarrollo, Instituto de Salud Pública de Chile. 3Departamento Agencia Nacional de Dispositivos, Innovación y Desarrollo, Instituto de Salud Pública de Chile. 4Departamento de Investigación, Postgrado y Educación Continua (DIPEC), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Alba, Santiago, Chile.

Autor para correspondencia: Abel E. Vásquez. avasquez@ispch.cl

RESUMEN

es un agente colonizador vaginal intermitente. En mujeres embarazadas es considerado el principal factor de riesgo de infecciones neonatales graves como meningitis, además de ser el causante de parto prematuro y muerte fetal. se clasifica en 10 serotipos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX) basado en la estructura de sus polisacáridos que componen su cápsula. Actualmente en Chile, la identificación de los serotipos está destinado solo a cepas aisladas de cuadros invasivos a través de métodos serológicos, lo que impide conocer la distribución de los serotipos de los aislados de mujeres gestantes y con ello la correlación con la distribución los serotipos de los aislados de cuadros invasivos. Los métodos para serotipificar las cepas de pueden ser costosas (aglutinación en látex) o laboriosas (serología tradicional), por lo que implementar métodos moleculares de alto desempeño puede ser una alternativa que permita abordar este problema. Por ello, este estudio realizó una evaluación de desempeño de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (PCR de punto final y PCR en tiempo real) para 30 muestras previamente serotipificadas por métodos serológicos obtenidas de cuadros invasivos, observando altos porcentajes de sensibilidad y especificidad en la técnica de PCR en tiempo real. Finalmente, se procedió a serotipificar 17 aislados de de colonización de mujeres gestantes entre las 35-37 semanas de embarazo. Se obtuvo un porcentaje del 100% en los parámetros de diagnóstico para las muestras de aislados de colonización vaginal con las técnicas de PCR en tiempo real. Por esto, se propone a la técnica de PCR en tiempo real como una alternativa de buen desempeño analítico para la identificación de los serotipos de .



Palabras Claves:

S. agalactiae; serotipos; PCR en tiempo Real; gestantes.

Keywords:

S. agalactiae, serotypes, Real Time PCR, pregnancies.

ABSTRACT

is an intermittent vaginal-colonizing agent. In pregnant women, it is a cause of premature delivery and fetal death and the primary risk factor for serious neonatal infections such as meningitis. can be classified into 10 serotypes (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, and IX) based on the structure of the polysaccharides that compose its capsule. In Chile, only strains isolated from invasive cases are identified via serological methods; this situation prevents researchers from determining the distribution of serotypes of isolates from pregnant women and therefore correlations with the distribution of serotypes of isolates from invasive cases. Methods to serotype isolates can be costly (e.g., latex agglutination) or laborious (e.g., traditional serology). Therefore, implementing high-performance molecular methods may be an alternative. This study evaluated the performance of nucleic acid amplification techniques (end-point PCR and real-time PCR) for 30 samples previously serotyped by serological methods obtained from invasive cases. We observed high levels of sensitivity and specificity for real-time PCR. When 17 isolates of from vaginal colonizations of pregnant women between 35 and 37 weeks of pregnancy were serotyped, the diagnostic parameters obtained from the vaginal colonization isolates were 100% consistent with those obtained from real-time PCR. We propose that real-time PCR, with its impressive analytical power, is a viable alternative to serological methods for identifying *S. agalactiae* serotypes.



Copyright © 2023. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de la [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). El uso, distribución o reproducción en otros foros esta permitido, siempre que el/los Autor/es y el/los dueño/s de los derechos de autor sean acreditados y que la publicación original sea citada, en concordancia con la práctica académica aceptada. No usar, distribuir o reproducir si no se cumplen con estos términos.

Conflicto de interés. Los autores declaran no tener conflicto de interés

Financiamiento. No se reportan fuentes de financiamiento.

INTRODUCCIÓN

Streptococcus agalactiae es uno de los principales agentes causantes de meningitis en recién nacidos a nivel mundial, además de infecciones neonatales graves como sepsis, osteomielitis aguda y crónica (1). El principal factor de riesgo para la sepsis y meningitis neonatal es la colonización vaginal en mujeres embarazadas, por transferencia vertical de la bacteria desde la madre al neonato durante el paso por el canal de parto (2). Una revisión reciente ha reportado que a nivel mundial entre el 10 – 40 % de las mujeres embarazadas son portadores de *S. agalactiae* (3). Mientras que, en Chile, a través de un estudio piloto de prevalencia de colonización en mujeres embarazadas que controlaban su embarazo en una clínica privada de la Región Metropolitana, se determinó que un 14% de las mujeres estudiadas estaba colonizada por *S. agalactiae* en el tracto vaginal (4).

presenta en su superficie polisacáridos capsulares (CPS) con alto contenido de ácido siálico (5). Los CPS corresponden a uno de los factores de virulencia más importantes debido a la capacidad de evasión inmune a través del mimetismo con los epítopes de carbohidratos del hospedero, generando persistencia y supervivencia de (6). Actualmente, debido a sus diferencias estructurales y antigénicas, se han podido reconocer 10 serotipos de *S. agalactiae* designados como Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX (7,8). La distribución y predominio de los serotipos varían según la región geográfica (9), ejemplo de esto son los serotipos IV y V que presenta una mayor prevalencia en los Emiratos Árabes unidos y Egipto, respectivamente (10). Mientras que los serotipos VI, VII y VIII representan el 20% de prevalencia en el Sudeste Asiático (11). Una revisión reciente estimó que el 98% de los aislamientos de mujeres embarazadas a nivel mundial corresponden a los serotipos Ia, Ib, II, III y V (12).

En Chile, entre los años 2014-2018, se identificaron los serotipos de cepas de *S. agalactiae* aislados de cuadros invasivos, los cuales demostraron una distribución similar a la distribución mundial de serotipos. En ese contexto, el serotipo III es el de mayor prevalencia entre las cepas analizadas con un 43,03%, seguido de los serotipos Ia con un 21,08% y el serotipo Ib con un 14,05%. En los últimos años, se han podido identificar la presencia

de los serotipos VI, VII y VIII (13).

El decreto supremo N° 7 del 2020 (14) establece que todos los laboratorios asistenciales públicos y privados del país, deben derivar las cepas aisladas de cuadros invasivos de *S. agalactiae* al Instituto de Salud Pública (ISP) para su identificación microbiológica y para estudios de caracterización. La identificación de los distintos serotipos se realiza mediante métodos de serología como la aglutinación con antiseros comerciales; o mediante la técnica molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando partidores específicos para cada serotipo (15). Dado que en la actualidad la identificación de los serotipos de *S. agalactiae* son destinados solo a muestras de cuadros invasivos, se desconoce la distribución de los serotipos de aislados de colonización vaginal, y con ello la correlación entre las distribuciones de los serotipos en aislados de cuadros invasivos y los hisopados vaginales de mujeres gestantes. Por lo anterior, se requiere la implementación de una metodología alternativa a los métodos serológicos, que resulte menos laboriosa, que sea rápida, precisa y menos costosa para la determinación de serotipos de *S. agalactiae* en aislados de colonización vaginal.

En este estudio se implementó una metodología basada en PCR en tiempo real como estrategia para la identificación de los serotipos de *S. agalactiae* en aislados de mujeres gestantes como alternativa a los métodos serológicos. Cabe destacar que producto de la pandemia por COVID-19, los recintos de salud se encontrarían con los ambientes de laboratorio propicios y con los equipos necesarios para la implementación de métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos, por lo que el acceso y la experiencia del personal sería la óptima.

MATERIALES Y MÉTODO

El material de referencia utilizado para la implementación de las metodologías basadas en PCR, fueron aislados de *S. agalactiae* provenientes cuadros invasivos y serotificados previamente por métodos serológicos. Posteriormente, se determinó el desempeño analítico de tres técnicas moleculares (PCR convencional, PCR en tiempo real con SYBR Green y PCR en tiempo real con Sonda para serotipo). Finalmente, 17 aislados de *S. agalactiae* provenientes de colonización vaginal, sin identificación de serotipos fueron testeadas

por PCR en tiempo real (con detección por SYBR Green y con sonda de hidrólisis) usando un PCR convencional como método comparador y determinación de porcentaje de acuerdo positivo y porcentaje de acuerdo negativo (Figura 1).

Obtención de muestras

Para la evaluación analítica del desempeño de las metodologías moleculares, se incluyeron 30

serotipo por PCR en tiempo real.

Extracción de ADN bacteriano

Los aislados fueron inoculadas en caldo Tood-Hewitt a 37°C por 3 horas con agitación constante a 220 rpm. A partir de 1 ml de los cultivos bacterianos, se procedió a realizar la extracción de ácidos nucleicos en la plataforma semiautomatizada NucliSENS® easyMAG® (Biomérieux), de acuerdo

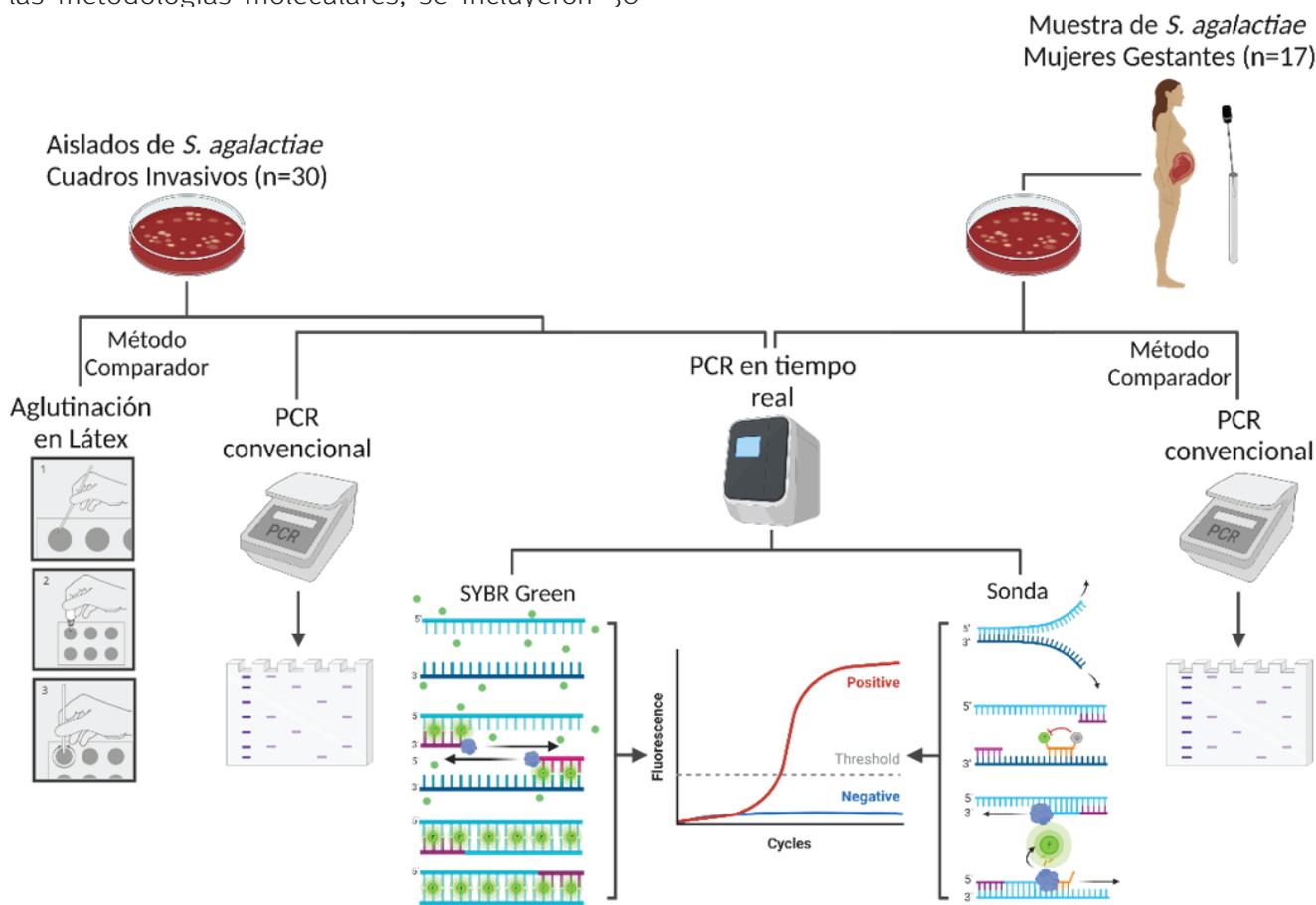


Figura 1. Diseño experimental. Implementación del método basado en PCR en tiempo real con detección por el intercalante SYBR Green® y sonda de hidrólisis (Taqman®) para aislados de *S. agalactiae* de cuadros invasivos y para muestras de mujeres gestantes.

aislados obtenidos de muestras de pacientes que cursaron cuadros invasivos por *S. agalactiae*. Las cepas fueron identificadas y serotipificadas por el Laboratorio de Referencia en Bacteriología del ISP. La distribución de los serotipos de los aislados fue: Ia (n= 4), Ib (n= 3), II (n= 4), III (n= 3), IV (n= 4), V (n= 4), VI (n= 2), VII (n= 4) y VIII (n= 2). No se dispone del serotipo IX en el cepario del ISP. Adicionalmente, se obtuvieron 17 aislados de *S. agalactiae* obtenidos de muestras de hisopado vaginal-rectal de mujeres gestantes entre las 35-37 semanas de embarazo para determinación del

con las instrucciones del fabricante. El eluido fue mantenido bajo condiciones de congelamiento a -20°C hasta su uso.

Determinación de serotipo por PCR de punto final

Las corridas de PCR se realizaron con el kit OneTaq DNA Polymerase (New England Biolabs, (16) en una mezcla con 0,5 µL (10 µM) de los cebadores descritos en Poyart et al., 2007 (17), elaborando la mezcla según las instrucciones del fabricante y 10-100 ng de ADN por reacción. El perfil térmico

incluyó una etapa de denaturación inicial a 94 °C por 5 minutos, luego 10 ciclos con 30 segundos a 94 °C, 50 °C por 3 minutos y 72 °C por 1 minuto, para finalmente continuar con 40 ciclos que incluyeron denaturación a 94 °C por 30 segundos, hibridación a 60 °C por 1 minuto y finalmente extensión a 72 °C por 2 minutos y 30 segundos utilizando el termociclador Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU).

Determinación de serotipo por PCR en tiempo real con detección por intercalante de ADN

La mezcla de reacción se preparó con el kit Brilliant II SYBR Green QPCR master mix (Agilent Technologies) (18) con 2 µL (10 µM) de los cebadores descritos en la Tabla 1, se elaboró la mezcla con las instrucciones del fabricante y 10-100 pg de ADN por reacción. Las condiciones de reacción se compusieron de una fase de denaturación inicial a

95 °C por 10 minutos para luego continuar con 35 ciclos que consistieron en 95°C por 15 segundos y 60 °C por 1 minuto, utilizando el termociclador Quant Studio 5 (Thermo Fisher Scientific).

Determinación de serotipo por PCR en tiempo real con sonda de hidrólisis

La mezcla de reacción se preparó con el kit Brilliant II QPCR master mix (Agilent Technologies) (19) con 0,2 µL (10 µM) de los cebadores y 1 µL (10 µM) de Sonda para el serotipo la descritos en la Tabla 1, se elaboró la mezcla con las instrucciones del fabricante y 10-100 pg de ADN por reacción. Las condiciones de reacción se compusieron de una fase de denaturación inicial a 95 °C por 10 minutos para luego continuar con 35 ciclos que consistieron en 95°C por 15 segundos y 60 °C por 1 minuto, utilizando el termociclador Quant Studio 5 (Thermo Fisher Scientific).

Tabla 1. Secuencias de partidores y sonda la para la identificación de serotipos de *S. agalactiae*. Tabla

de elaboración propia basada en Breeding K y cols. 2016 (20).

Partidor/sonda	Secuencia (5'-3')	Gen Diana	Tamaño del Amplicón (pb)
Ia-F	GTTTAAAAATCCTGATTTTGATAGAATTTTAGCAGCTTTTAAC		
Ia-R	CTGATATTTTGAATATTATTATGCAAACAATAAATATGTTCCCCCTA	<i>cpsH</i>	207
Ia-P	6-FAM-TCGTTGATT/ZEN/ATCGGTATAGTATCATTG GCT-IAbFQ		
Ib-F	GTATTAATTCGTTATTTAGAAAGTCCAGAATTTTATAGAGTCATTGC		
Ib-R	GGCATAATAATATAGAAATCCTAAACAAGACAAAATAATTGCATTAAC	<i>cpsH</i>	195
II-F	CACATATATATTAAGTTCACCCTAGAGATAACATTGACTACTCTAATC		
II-R	CTAATGCCGTGGAAAAATATGTAATCCCAACATCAAATT	<i>cpsK</i>	151
III-F	GGAATTGTTCTTTATTTTCTGCCT		
III-R	ACTATACCAAAAGTTGAGAATAATAACAATACTCCAATGA	<i>cpsI</i>	170
IV-F	GAAGAAAATATATATTTGCCATACAGTATATCATCTCCTTATTACAATTATC		
IV-R	CATAGAATACCTTCTTTATTGGTACGTTTACATAAATCATCAATATTAAC	<i>cpsK</i>	159
V-F	CAAAATTCATGAGAGAATGTTGTATTTTTTGAGGCAATTC		
V-R	CAATCATCTCCACATATATCTATTCCACCAAATACTTC	<i>cpsO</i>	153
VI-F	GACAGTCTATTACGAAAGTATAAGAGCGATT		
VI-R	AGCTTGTAGATTATCCTGTTTTGTTGATAGCTTCTCTATATAG	<i>cpsH</i>	219
VII-F	GAGGGCTTACCTCACGACAGGAGAAGTAAAAAATAAAAG		
VII-R	GCTGCGTTAATAACAATACTGACTTTGGAGC	<i>cpsK</i>	160
VIII-F	GACTAATGGTTAAGTATGCTAATCTGCTAATTTGTGATAGTAA		
VIII-R	CTTGTCCTTAAAATTGTGTTTTGACTTTGTCAGATCAGTC	<i>cpsR</i>	152
IX-F	CATTGAGCAAAGAGAAAACAGTATATGTCAAAGGGC		
IX-R	ATGTTCAAGGATAAAATCTCTATTATGTTGCATTGCTTCA	<i>cpsO</i>	128

Análisis estadístico

Se utilizó el software MedCalc (https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php) para calcular los parámetros diagnósticos de sensibilidad y especificidad a partir de los datos obtenidos de las técnicas moleculares para aislados de cuadros invasivos previamente caracterizados por métodos serológicos (21). Para comparar los resultados entre las metodologías moleculares, se calcularon los porcentajes de acuerdo positivo y negativo

entre las técnicas.

RESULTADOS

Identificación de serotipos de *S. agalactiae* por de PCR en tiempo real

Utilizando los aislados de cuadros invasivos previamente serotificadas, se calcularon los parámetros de detección de sensibilidad y especificidad para cada uno de los serotipos para evaluar el desempeño de las técnicas moleculares

Tabla 2. Evaluación en términos de parámetros de detección del ensayo de PCR convencional, PCR en tiempo real con SYBR Green para cada serotipo y PCR en tiempo real con sonda de hidrólisis.

Serotipo	Resultado PCR convencional		Resultado PCR en tiempo real (SYBR Green)		Resultado PCR en tiempo real (Sonda)*	
	Sensibilidad [IC 95%]	Especificidad [IC 95%]	Sensibilidad [IC 95%]	Especificidad [IC 95%]	Sensibilidad [IC 95%]	Especificidad [IC 95%]
Ia	75,00% [19,41% a 99,37%]	100,00% [86,77% a 100,00%]	100,00% [39,76% a 100,00%]	100,00% [86,77% a 100,00%]	100,00% [39,76% a 100,00%]	100,00% [86,77% a 100,00%]
Ib	66,67% [9,43% a 99,16%]	100,00% [87,23% a 100,00%]	100,00% [15,81% a 100,00%]	96,43% [81,65% a 99,91%]		
II	25,00% [0,63% a 80,59%]	100,00% [86,77% a 100,00%]	66,67% [9,43% a 99,16%]	96,30% [81,03% a 99,91%]		
III	66,67% [9,43% a 99,16%]	100,00% [87,23% a 100,00%]	100,00% [29,24% a 100,00%]	100,00% [87,23% a 100,00%]		
IV	0,00% [0,00% a 70,76%]	96,30% [81,03% a 99,91%]	66,67% [9,43% a 99,16%]	96,30% [81,03% a 99,91%]		
V	50,00% [6,76% a 93,24%]	100,00% [86,77% a 100,00%]	66,67% [9,43% a 99,16%]	96,30% [81,03% a 99,91%]		
VI	100,00% [15,81% a 100,00%]	100,00% [87,66% a 100,00%]	100,00% [15,81% a 100,00%]	100,00% [87,66% a 100,00%]		
VII	0,00% [0,00% a 60,24%]	100,00% [86,77% a 100,00%]	0,00% [0,00% a 84,19%]	92,86% [76,50% a 99,12%]		
VIII	100,00% [15,81% a 100,00%]	100,00% [87,66% a 100,00%]	50,00% [1,26% a 98,74%]	100,00% [87,66% a 100,00%]		

IC 95%: intervalo de confianza del 95%. *Solo serotipo Ia.

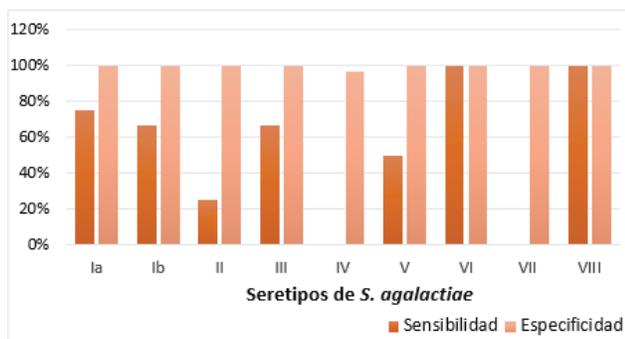


Figura 2. Porcentajes de sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR convencional frente a los aislados de cuadros invasivos.

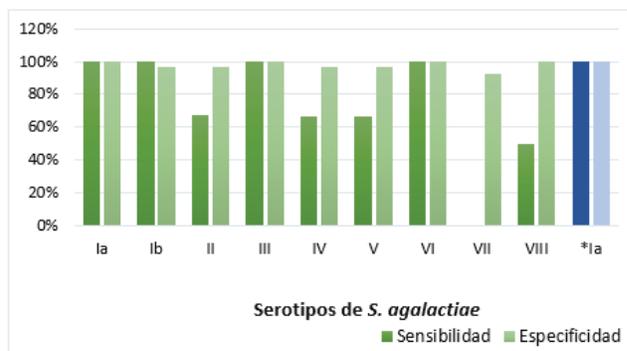


Figura 3. Sensibilidad y Especificidad de PCR en tiempo real con SYBR Green® frente a aislados de cuadros invasivos. *PCR en tiempo real con sonda de hidrólisis para serotipo Ia (Azul: Sensibilidad; celeste: Especificidad).

en la determinación de los serotipos de *S. agalactiae* (Tabla 2 y Figuras 2 y 3).

Estos resultados demuestran que las técnicas moleculares basadas en PCR en tiempo real presentan un mayor porcentaje de concordancia con los métodos serológicos, expresado en los parámetros diagnósticos de sensibilidad y especificidad. Con estos resultados, se procedió a realizar la serotipificación de los aislados

de hisopados vaginales de mujeres gestantes mediante PCR en tiempo real.

Determinación de serotipo en aislados de mujeres gestantes.

En base al desempeño analítico que presentaron las diferentes técnicas moleculares para los aislados de cuadros invasivos, se validó la técnica de PCR en tiempo real para la identificación de los

Tabla 3. Evaluación en términos de parámetros diagnósticos del ensayo de PCR en tiempo real con SYBR Green para serotipo Ia y II y PCR en tiempo real con sonda para serotipo Ia de muestras de gestantes.

Serotipo	PCR en tiempo real (SYBR Green)		PCR en tiempo real (sonda de hidrólisis)	
	% Acuerdo positivo	% Acuerdo negativo	% Acuerdo positivo	% Acuerdo negativo
	[IC 95%]	[IC 95%]	[IC 95%]	[IC 95%]
Ia	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
	[36,06% a 100,00%]	[7,82% a 100,00%]	[63,06% a 100,00%]	[47,82% a 100,00%]
II	100,00%	100,00%		
	[47,82% a 100,00%]	[63,06% a 100,00%]		

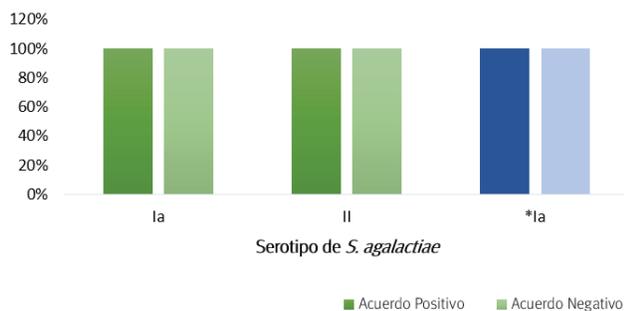


Figura 4. Porcentajes de Acuerdo Positivo y Acuerdo Negativo para PCR en tiempo real con SYBR Green para aislados de mujeres gestantes. *PCR en tiempo real con sonda de hidrólisis para serotipo Ia (Azul: Acuerdo Positivo; celeste: Acuerdo Negativo).

serotipos de *S. agalactiae*, por lo que se procedió a realizar el mismo análisis estadístico para 17 muestras de aislados de colonización vaginal, cuyos resultados están contenidos en la Tabla 3 y Figura 4.

DISCUSIÓN

S. agalactiae es el principal causante de infecciones neonatales graves como meningitis, sepsis y bronconeumonía a nivel mundial (1). Actualmente en Chile, la caracterización de los diferentes serotipos de *S. agalactiae* mediante métodos serológicos son destinadas solo

a aislados de cuadros invasivos. La técnica molecular basada en PCR en tiempo demostró alta concordancia con los métodos de referencia en la identificación de los serotipos. La metodología de PCR en tiempo real se basa en la amplificación de regiones específicas de los genes que codifican para las enzimas responsables de la síntesis de la capsula de *S. agalactiae*. A partir de los aislados de cuadros invasivos previamente serotificados, se calcularon la sensibilidad y especificidad para las técnicas moleculares de PCR de punto final, PCR en tiempo real con SYBR Green y sonda de hidrólisis (Tabla 2) (Figura 2 y 3). Demostrando que la metodología basada en PCR en tiempo real presenta un desempeño similar a los métodos serológicos. Los 17 aislados de *S. agalactiae* provenientes de mujeres gestantes analizados por métodos moleculares representan un estudio preliminar que puede ser escalado a un número mayor de cepas para evaluar su desempeño siendo comparados con métodos serológicos. Sin embargo, estos resultados comprueban que es factible técnicamente la migración de la técnica molecular de PCR convencional a PCR en tiempo real, como herramienta complementaria para la identificación de los serotipos de *S. agalactiae* en muestras obtenidas de mujeres gestantes.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen a todos los miembros del Departamento ANDID por la gestión realizada para llevar a cabo los proyectos de I+D. Además, los autores de este estudio agradecen a todo el personal del Laboratorio de Referencia en Bacteriología, perteneciente al Subdepartamento de Enfermedades Infecciosas del Instituto de Salud Pública de Chile, por su importante colaboración a través del aporte de muestras que fueron utilizadas.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Instituto de Salud Pública de Chile, a través del presupuesto anual destinado a investigación aplicada al Departamento ANDID.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Raabe VN, Shane AL. Group B Streptococcus (*Streptococcus agalactiae*). Microbiol Spectr. 2019 Apr 12;7(2).
2. Lawn JE, Bianchi-Jassir F, Russell NJ, Kohli-Lynch M, Tann

CJ, Hall J, et al. Group B Streptococcal Disease Worldwide for Pregnant Women, Stillbirths, and Children: Why, What, and How to Undertake Estimates? Clinical Infectious Diseases. 2017 Nov 6;65(suppl_2):S89–99.

3. Vekemans J, Moorthy V, Friede M, Alderson MR, Sobanjo-Ter Meulen A, Baker CJ, et al. Maternal immunization against Group B Streptococcus: World Health Organization research and development technological roadmap and preferred product characteristics. Vaccine. 2019 Nov;37(50):7391–3.

4. Marcelo A. Farías, Alexis A. Rodríguez, Diego Diaz-Dinamarca, Daniel A. Soto, Diego Bastias, Mauricio A. Quezada, et al. Portación de *Streptococcus agalactiae* en mujeres embarazadas atendidas en el Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica de Chile durante 2011-2017. 2018;

5. Kardos S, Tóthpál A, Laub K, Kristóf K, Ostorházi E, Rozgonyi F, et al. High prevalence of group B Streptococcus ST17 hypervirulent clone among non-pregnant patients from a Hungarian venereology clinic. BMC Infect Dis. 2019 Dec 28;19(1):1009.

6. Lemire P, Houde M, Lecours MP, Fittipaldi N, Segura M. Role of capsular polysaccharide in Group B Streptococcus interactions with dendritic cells. Microbes Infect. 2012 Oct;14(12):1064–76.

7. Doran KS, Nizet V. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. Mol Microbiol. 2004 Aug 12;54(1):23–31.

8. Slotved HC, Kong F, Lambertsen L, Sauer S, Gilbert GL. Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype. J Clin Microbiol. 2007 Sep;45(9):2929–36.

9. Russell NJ, Seale AC, O'Driscoll M, O'Sullivan C, Bianchi-Jassir F, Gonzalez-Guarin J, et al. Maternal Colonization With Group B Streptococcus and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. Clinical Infectious Diseases. 2017 Nov 6;65(suppl_2):S100–11.

10. Amin A, Abdulrazzaq YM, Uduman S. Group B Streptococcal Serotype Distribution of Isolates from Colonized Pregnant Women at the Time of Delivery in United Arab Emirates. Journal of Infection. 2002 Jul;45(1):42–6.

11. Matsubara K, Katayama K, Baba K, Nigami H, Harigaya H, Sugiyama M. Seroepidemiologic Studies of Serotype VIII Group B Streptococcus in Japan. J Infect Dis. 2002 Sep 15;186(6):855–8.

12. Madrid L, Seale AC, Kohli-Lynch M, Edmond KM, Lawn JE, Heath PT, et al. Infant Group B Streptococcal Disease Incidence and Serotypes Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. Clinical Infectious Diseases. 2017 Nov 6;65(suppl_2):S160–72.

13. Instituto de Salud Pública de Chile. Vigilancia de labo-

ratorio enfermedad invasora *Streptococcus agalactiae*, Chile 2014 - 2018. 2019.

14. Publicación F, Santiago N 7. Decreto 7 Aprueba el reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria y su vigilancia ministerio de salud; subsecretaría de salud pública aprueba el reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria y su vigilancia. Vol. 7. 2019.

15. Roberto Bravo M. Instrucciones para la vigilancia nacional de laboratorio para *Streptococcus agalactiae* procedente de infecciones invasoras. 2014;

16. New England Biolabs. PCR Protocol for OneTaq® DNA Polymerase (Mo480) V.1.

17. Poyart C, Tazi A, Réglie-Poupet H, Billoët A, Tavares N, Raymond J, et al. Multiplex PCR Assay for Rapid and Accurate Capsular Typing of Group B Streptococci. J Clin Microbiol. 2007 Jun;45(6):1985–8.

18. Brilliant II SYBR ® Green QPCR Master Mix Instruction Manual Limited product warranty ordering information and technical serviceS Email [Internet]. Available from: www.genomics.agilent.com

19. Brilliant II QPCR Master Mix Instruction Manual Limited product warranty ordering information and technical services Email [Internet]. Available from: www.genomics.agilent.com

20. Breeding KM, Ragipani B, Lee KUD, Malik M, Randis TM, Ratner AJ. Real-time PCR-based serotyping of *Streptococcus agalactiae*. Sci Rep. 2016 Dec 2;6(1):38523.

21. Trevethan R. Sensitivity, Specificity, and Predictive Values: Foundations, Plabilities, and Pitfalls in Research and Practice. Front Public Health. 2017 Nov 20;5.