

DESARROLLO DE UN MODELO MURINO DE COLONIZACIÓN VAGINAL DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE UTILIZANDO UNA CEPA CHILENA AISLADA DE UN RECIÉN NACIDO CON SEPTICEMIA

DEVELOPMENT OF A MURINE MODEL OF VAGINAL COLONIZATION OF STREPTOCOCCUS AGALACTIAE USING A CHILEAN ISOLATED STRAIN FROM A NEWBORN WITH SEPTICEMIA

✉ Daniel A. Soto¹ | María J. Altamirano^{1,2} | Diego A. Díaz-Dinamarca^{1,2} | Yessica Y. Leyton¹ | Jorge O. Fernández³ | Jaime W. Lagos³ | Pedro I. Alarcón⁴, Oscar F. Lopez⁵ | Alexis M. Kalergis^{2,6} | Abel E. Vasquez¹

✉ 1 Sección de Biotecnología, Departamento de Salud Ambiental. Instituto de Salud Pública de Chile | 2 Millennium Institute of Immunology and Immunotherapy, Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile | 3 Subdepartamento de Genética Molecular. Instituto de Salud Pública de Chile | 4 Sección Bacteriología del Departamento Biomedico. Instituto de Salud Pública de Chile | 5 Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Santo Tomás. Chile | 6 Departamento de Endocrinología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile

✉ Abel E. Vasquez avasquez@ispch.cl

Resumen

Streptococcus agalactiae es una bacteria Gram-positiva asociada con muerte fetal y parto prematuro en mujeres embarazadas. Además, es el principal agente etiológico asociado con la morbilidad y la mortalidad durante los primeros meses de vida. A la fecha, no existen vacunas licenciadas y la interacción patógeno-huésped no se ha descrito por completo. Para la investigación se utilizó una cepa chilena de *Streptococcus agalactiae*, aislada desde un recién nacido cursando con septicemia. Se realizó la caracterización parcial microbiológica y molecular. Esa cepa se usó para desarrollar un modelo de colonización bacteriana del tracto vaginal en el modelo de ratón. Nuestro modelo generó una colonización estable durante al menos 16 días, además, se observó evidencia anatómica de infección bacteriana en el tracto vaginal. También, observamos la presencia de esta bacteria en pulmón, bazo y riñón, por lo que se asocia a bacteremia.

Nuestro modelo de colonización vaginal animal tiene el potencial de ser utilizado en la evaluación de nuevas vacunas, metodologías de diagnóstico y en la comprensión de los mecanismos de patogenicidad de esta bacteria.

Palabras Claves: S. agalactiae; Modelo animal; Colonización; Bacteremia; Tracto vaginal

Abstract

Streptococcus agalactiae is a Gram-positive bacterium associated with fetal death and premature birth in pregnant women. In addition, it is the main etiological agent associated with morbidity and mortality during the first months of life. To the date, no vaccines have been licensed, and the pathogen-host interaction has not been completely described. We used a Chilean strain

of *Streptococcus agalactiae* isolated from newborn with septicemia. We performed the partial microbiological and molecular characterization. That bacterial strain was used to develop a model of bacterial colonization of the vaginal tract in the mouse model. Our model generated a stable colonization for at least 16 days, in addition, anatomical evidence of bacterial infection was observed in the vaginal tract, moreover, the presence of this bacterium in the lung, spleen, and kidney associated to bacteraemia was observed. Our animal vaginal colonization model has the potential to be used in the evaluation of new vaccines, diagnostic methodologies, and advance in understanding the mechanisms of pathogenicity of this bacterium.

Keywords: S. agalactiae; Animal model; colonization; bacteraemia; vaginal tract

Introducción

Streptococcus agalactiae, conocido como *Streptococcus* del grupo B (SGB), también como β -hemolítico, es una bacteria Gram positiva y en base a su polisacárido capsular a la fecha se han descrito 10 serotipos. Es el agente más común de morbilidad y mortalidad neonatal a nivel mundial. La colonización del tracto genital de la mujer embarazada es un factor de riesgo para la infección del recién nacido durante el parto, desafío o del feto por vía ascendente de forma intraplacentaria (1-3). Se ha descrito que la portación de SGB de las mujeres embarazadas a nivel mundial es de un 11–35% (4) y en Chile se ha reportado un 14% (5). Guías clínicas han sido desarrolladas por el Centro de Control de Enfermedades (CDC)

de Estados Unidos para la prevención de la infección del recién nacido durante el parto, indicando que se debe realizar un tamizaje a todas las mujeres embarazadas entre las 35 a 37 semanas, y de ser positivas, una profilaxis con antibióticos debe ser administrada (6). Sin embargo, la colonización del tracto vaginal puede ser constante o intermitente (7), lo que representa un desafío para la detección de SGB al momento del parto.

No existen vacunas licenciadas para SGB y a la fecha, dos vacunas se encuentran en fase clínica, una en base a una mezcla de 5 polisacáridos conjugados a una proteína transportadora (8), y otra en base a una proteína quimérica compuesta por la fusión de dos proteínas relativamente conservadas de esta bacteria (9). El comportamiento de estas vacunas serán evaluadas en el tiempo por las entidades regulatorias mundiales. Por otro lado hay varias interrogantes por entender, como es la interacción entre SGB y el huésped que permitan describir los factores asociados en la colonización del tracto genitouterino e infección del recién nacido. Además, no todas las mujeres que presentan SGB como bacteria comensal en su intestino son infectadas en su tracto vaginal. La descripción de estas interrogantes serán de ayuda para el desarrollo de nuevas estrategias de detección y vacunas, en donde un modelo robusto de colonización vaginal por SGB en modelo animal será de utilidad.

Los primeros antecedentes del desarrollo de un modelo animal de infección vaginal por SGB fueron reportados a principios de la década del ochenta (10) y posteriormente se han descrito varias estrategias que se han concentrado en mantener una colonización estable de SGB en el tracto vaginal en un modelo murino. Un importante aporte al modelo de colonización animal fue la administración previa de un tratamiento hormonal con 17 β -estradiol, lo cual ha permitido una colonización crónica en el tracto vaginal (11-14). Este modelo ha sido útil en el desarrollo de nuevas metodologías de

detección y evaluación preclínica de vacunas contra SGB. Además, existen interrogantes que deben ser abordadas, como son la correlación entre la capacidad de colonización de los diferentes serotipos, complejos clonales e identificar factores asociados a virulencia. Asimismo, un desafío pendiente es simular el ambiente microbiótico y fisiológico entre el tracto vaginal del humano y del ratón (13).

En este trabajo, una cepa de SGB aislada en Chile desde un niño cursando una septicemia fue caracterizada microbiológicamente y molecularmente de forma parcial. Luego, la cepa fue adaptada para el desarrollo de un modelo de colonización en tracto vaginal en ratones hembras consanguíneos C57BL/6J.

Materiales y Métodos

Aislamiento de cepa bacteriana.

En Chile las cepas bacterianas de SGB provenientes de cuadros invasivos son enviadas al Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), en cumplimiento al Decreto Supremo 158 del Ministerio de Salud (15). Una cepa proveniente desde un recién nacido con septicemia, la cual se obtuvo de manera anónima y no a habido acceso a ningún tipo de dato del paciente por parte de los investigadores. Esta cepa se cultivó en agar sangre de cordero al 5% en atmósfera de CO₂ y se identificó como SGB mediante las siguientes pruebas bioquímicas: β -hemólisis en agar sangre de cordero al 5%, tinción de Gram mediante la cual, se observan cocáceas grampositivas dispuestas en pares o cadenas cortas; prueba de catalasa (H₂O₂ 3%) negativa y agrupación de Lancefield mediante Látex de aglutinación comercial para grupo B (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) positiva. Las pruebas de CAMP, hidrólisis del hipurato de sodio y producción de pigmento en agar Granada, fueron positivas; se utilizaron adicionalmente para confirmar la presencia de SGB. La serotipificación se realizó mediante antiseros comerciales (Denka Seiken co., Japón) los cuales están dirigidos contra sitios específicos de los polisacáridos capsulares de

SGB.

Análisis de DNA genómico bacteriano mediante Tipificación de secuencias multilocus de y secuenciación de genes de RNA ribosomales 16S.

Se utilizó la técnica de tipificación de secuencias multilocus; conocida por su sigla en inglés como MLST. El ADN genómico de SGB fue purificado mediante un kit comercial (blood&tissue, Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. El análisis de MLST fue realizado como se describe en Jones et al., 2003 (16). La identificación bacteriana fue realizada mediante el análisis del ARN ribosomal 16S, utilizando los partidores universales 20F y 1500R como se describe en Weisburg et al., 1991 (17). Los productos de PCR fueron purificados mediante el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen). Las secuencias de los genes fueron determinadas directamente usando el kit de amplificación BigDye 3.1 y un equipo de secuenciamiento ABIS PRISM 3130 (Applied Biosystems). La designación de los alelos y de las Secuencias Tipos (ST) en el MLST fue determinado en la plataforma PubMLST (<http://pubmlst.org/sagalactiae/>). Las secuencias de ARN ribosomal 16S fueron comparadas con aquellas disponibles en Genbank, EMBL (<http://www.ebi.ac.uk>) y el Ribosomal Database Project.

Animales.

Este estudio se realizó en triplicado en forma independiente. Se utilizaron 18 ratones hembras C57BL/6J de 6 a 8 semanas de edad, procedentes del bioterio del Instituto de Salud Pública de Chile. Todos los procedimientos fueron realizados bajo la supervisión de un Médico Veterinario y en base a la Guía para el cuidado y Uso de Animales de experimentación NRC, 8ª Edición del 2011. Los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del ISPCH. Los animales fueron alojados en cajas de mantención convencional, con enriquecimiento ambiental y temperatura constante de 22 C°(+/- 1°) con ciclos de 12 horas luz y 12 horas noches, con agua y alimento (dieta

prolab RMH 3000 labDiet) ad libitum. Previo a la infección bacteriana, los animales fueron tratados de acuerdo a lo descrito en la literatura (13) con algunas modificaciones. Brevemente, los animales recibieron tratamientos farmacológicos, gentamicina 100 mg/Kg subcutánea cada 24 horas por 5 días. Al cuarto y al duodécimo día, recibieron 0,1 mg de 17 β-estradiol, resuspendido en aceite de castor vía intramuscular. Al quinto día se realizó la inoculación con SGB como se describe a continuación.

Inoculación de tracto vaginal con SGB.

La cepa bacteriana de SGB fue incubada en medio Todd Hewitt suplementado con ácido nalidíxico (15 mg/L) y gentamicina (8 mg/L). La incubación se realizó a 37°C en agitación con 220 rpm hasta que alcanzó una Densidad Óptica de 0.6 a 600nm (DO600=0.6). Las bacterias fueron centrifugadas a 10.000 g por 3 minutos a 4°C y el sedimento bacteriano fue resuspendido en un tercio del volumen inicial en gelatina al 10%. La cepa bacteriana utilizada en este estudio fue adaptada para permanecer en el tracto vaginal, por lo cual se realizaron al menos 6 ciclos de inoculación y recuperación de la bacteria mediante lavados vaginales en los animales. Esta cepa bacteriana fue caracterizada parcialmente por técnicas microbiológicas y moleculares.

La infección del tracto vaginal se realizó al quinto día con una dosis de 10⁷ UFC de SGB resuspendidas en 100 µL de gelatina al 10%. Para dicho procedimiento los animales fueron anestesiados con dosis de Ketamina-Xilacina intraperitoneal. Los animales fueron pesados diariamente utilizando una balanza granataria.

Análisis de SGB en tracto vaginal.

La presencia de SGB en el tracto vaginal de los animales fue analizada, previa anestesia, mediante hisopado vaginal. Se utilizaron tómulas de alginato (TnT-SS Stuart Swab Slim, LabLinsan) las cuales se giraron por 10 ciclos. Las tómulas fueron lavadas con 300 µL de medio Todd Hewitt suplementado con ácido nalidíxico (15 mg/L) y gentamicina (8 mg/L), realizando diluciones seriadas las cuales fueron sembradas en placas de agar sangre,

suplementadas con tripticasa de soya. En forma paralela, se utilizaron placas de agar granada y fueron incubadas por 24 horas en una estufa de cultivo con 5% de CO₂ a 37°C. Las colonias bacterianas que presentaron β-hemolisis fueron confirmadas por TEST de CAMP y aglutinación con látex para el Grupo B.

Eutanasia y Necropsia.

Los animales fueron eutanasiados por sobredosis de Ketamina-Xilacina. Posteriormente, se realizó necropsia y extracción de órganos de acuerdo a lo descrito en Scudamore, 2014 (18).

Análisis de la presencia de SGB en riñón, bazo y pulmón.

Los órganos fueron analizados posterior a la eutanasia del día 16, posterior a la colonización. Los órganos extraídos fueron homogenizados a través de un cell strainer de 40 μm en PBS-BSA al 5% y la presencia de SGB fue analizada en placas de agar sangre de cordero al 5%.

Análisis microscópico de presencia de SGB en tracto vaginal.

Las muestras del tracto vaginal de los ejemplares

(tipo Minot, Slee Mainz, modelo CUT 4055) en láminas de 4 μm de espesor, para ser montadas en portaobjetos con una aplicación previa de albumina. De cada muestra se separaron 2 cortes los cuales fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina. Las tinciones se realizaron bajo la técnica estándar y observadas en un microscopio óptico (Leica, modelo DM LS2) y fueron fotografiadas digitalmente.

Análisis Estadístico.

En este estudio se utilizó el método estadístico ANOVA Multifactorial, utilizando el programa computacional Statgraphics Centurion XVI.

Resultados

Análisis microbiológico y molecular de cepa chilena de SGB.

La cepa clínica de SGB fue analizada microbiológicamente mediante pruebas fenotípicas de acuerdo a lo descrito en la metodología. La presencia de colonias β-hemolíticas, aglutinación en látex del grupo B de Lancefield, prueba de CAMP y colonias bacterianas anaranjadas en placas de agar granada fueron observadas en este

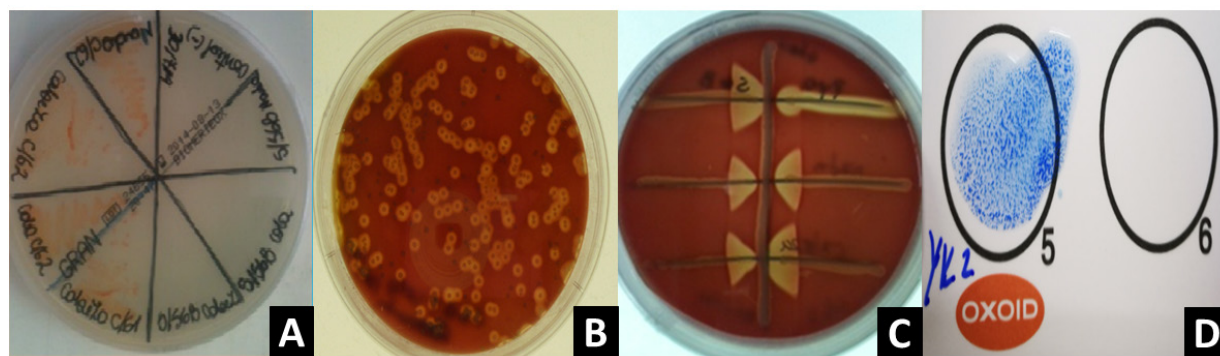


Figura 1. Análisis microbiológico y serológico de la cepa aislada de SGB. (A) placas de agar sangre y en (B) placas de agar granada generando colonias β-hemolíticas. La identidad de la cepa aislada fue corroborada mediante (C) la prueba de CAMP y (D) la aglutinación con antisuero contra el Grupo B de Lancefield

eutanasiados fueron fijados en formalina tamponada al 10%, posteriormente fueron trasladadas al laboratorio de histopatología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Santo Tomás. Posteriormente fueron procesadas según lo descrito en Alzola, 2001 (19), en un procesador de tejidos (Leica, modelo TP1020). Las muestras fueron cortadas con un micrótopo

aislamiento (Figura 1). Además, por serología se determinó que pertenece al serotipo III de SGB.

El análisis molecular de esta bacteria se realizó desde su ADN genómico, el cual fue purificado de acuerdo a lo descrito en metodología. Mediante MLST determinamos que esta cepa bacteriana pertenece al Complejo clonal 17 (ST17), el cual es reconocido como una cepa asociada a infecciones

invasivas y frecuentemente descrita en septicemia en recién nacidos. La secuencia de los genes de ARN ribosomales corroboraron la identidad de esta bacteria. La secuencia de ADN que da cuenta de su identidad fue ingresada al Centro Nacional para la Información Biotecnológica, conocida por su sigla en inglés de NCBI, quien asignó el código KU736792 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KU736792.1/>)

Gelatina al 10%. El tercer grupo fue sometido a tratamiento farmacológico e inoculado con SGB de acuerdo a lo descrito en la metodología. Este procedimiento experimental esquematizado en la Figura 2, permitió que SGB permaneciera en el tracto vaginal por al menos 16 días posterior a la inoculación bacteriana y no se observaron diferencias significativas en el recuento bacteriano de SGB (Figura 3).

Grupo 1: Control Ambiental.
 Grupo 2: Control Gelatina 10%.
 Grupo 3: Control Infección SGB.

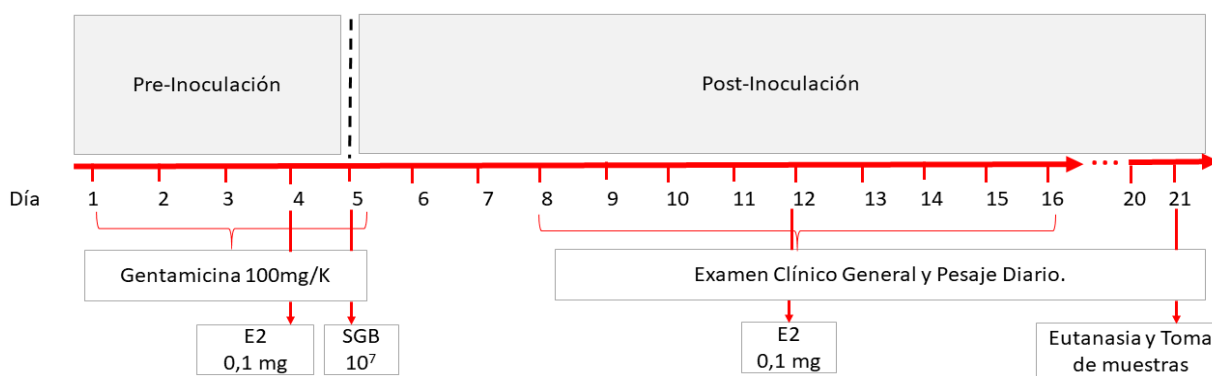


Figura 2. Representación esquemática de la inoculación utilizada en el experimento con ratones C57BL/6J. Los ratones (seis por grupo) fueron inoculados con la cepa clínica de SGB (100µL), y Gelatina (100µL). Como grupo control, utilizamos un grupo de ratones ambientales, sin inoculación. El tratamiento pre-inoculación tiene una duración de 5 días. Los animales recibieron una dosis diaria de gentamicina (100 mg/K), al día 4 un tratamiento con 17 β-estradiol (E2), y una inoculación final al día 5 con SGB (107 UFC). Los animales fueron muestreados hasta el día 16 posterior a la inoculación, en donde se procedió a la toma de muestras y eutanasia.

Modelo de infección vaginal con SGB.

Se formaron 3 grupos experimentales de 6 ratones cada uno. Un grupo se denominó control ambiental y correspondió a animales que no recibieron tratamientos farmacológicos y no fueron inoculados con SGB. El Segundo Grupo experimental correspondió a ratones que recibieron tratamiento farmacológico pero sin inoculación bacteriana, solo recibieron

La variación del peso de los animales en experimentación en este estudio fue evaluado, observándose una disminución significativa del peso de los animales inoculados con SGB (Figura 4), lo cual se relaciona a una alteración fisiológica de los animales asociado a la inoculación con SGB.

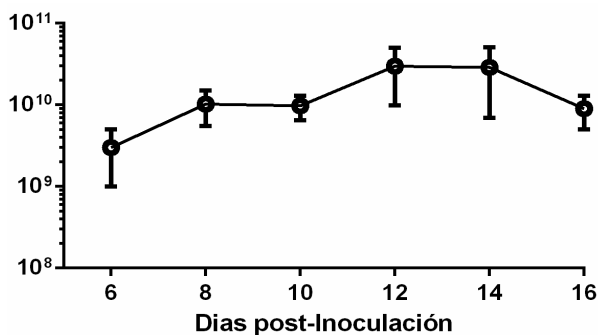


Figura 3. Análisis del recuento de SGB en tracto vaginal de las ratonas C57BL/6j. El recuento de SGB en tracto vaginal fue registrado cada dos días hasta el día 16 posterior a la inoculación. Los hisopados vaginales fueron analizados en placas de agar sangre.

Al día 16 posterior a la inoculación, los animales fueron eutanasiados y se extrajeron pulmones, bazo, riñón y tracto vaginal de acuerdo a lo descrito en metodología. La necropsia de los animales inoculados con SGB, reveló un aumento de fluidos al interior del tracto útero-vaginal y una alteración anatómica evidente de la zona, la cual se asocia al proceso colonización de esta bacteria (imágenes no mostradas). Además, observamos la presencia de SGB en riñón y bazo en abundante cantidad y en menor grado en pulmón (Tabla 1), lo que nos sugiere un traspaso de la bacteria a la sangre desde el tracto vaginal, produciendo una bacteriemia que afectó los órganos descritos. No

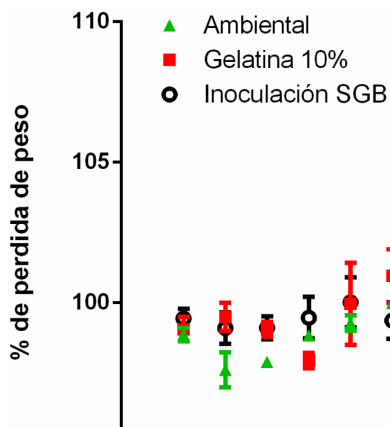


Figura 4. La inoculación de SGB en tracto vaginal en ratones C57BL/6J genera una disminución del peso corporal. Evaluación de peso de animales durante el desarrollo del esquema experimental. El peso de los animales fue registrado en forma diaria durante los 16 del modelo de colonización. El peso fue calculado como porcentaje respecto al peso inicial (100%). El control de colonización fue comparado con el grupo gelatina (10%) y un control ambiental.

hay muerte relacionada a la inoculación y posterior colonización de los animales en este estudio.

El análisis microscópico (Figura 5) realizado de acuerdo a lo descrito en metodología, nos permitió observar la ausencia de SGB en células del tracto vaginal en el grupo control que solo fue inoculado con gelatina al 10% (Figura 5A). A diferencia con lo anterior, se observaron diplococos y cadenas cortas Gram positivos a nivel de mucosa vaginal en los animales inoculados (Figura 5B). Finalmente, observamos infiltración de macrófagos y polimorfonucleares neutrófilos en el tracto reproductor (Figura 5C), lo cual tiene relación con lo observado en la necropsia de los animales.

Discusión y Conclusión.

SGB está asociado a la muerte fetal y parto prematuro en la mujer embarazada, generando septicemia y meningitis en el recién nacido. A la fecha la colonización por SGB es un problema de Salud Pública mundial, donde la optimización en el proceso de detección, disponer vacunas licenciadas y comprender la interacción patógeno-

huésped permanecen como desafíos pendientes (20). El disponer de un modelo robusto de colonización animal que permita avanzar en estos desafíos sería fundamental.

En Chile se ha reportado una portación del 14,4% entre el año 2010–2012 (5), pero esta cifra no necesariamente representa la realidad de nuestra población, debido a que este trabajo fue realizado en un centro clínico privado y en Chile la mayor parte de la población de las mujeres

controlan su embarazo en los Centros de Atención Familiar y sus hijos nacen en Hospitales públicos. Además, se ha descrito que la portación de SGB tiene una relación con la etnia, obesidad, higiene, y estratos socioeconómicos bajos (21,22), por lo que aún está pendiente un estudio representativo de la población chilena y en varios países sudamericanos (23).

Con respecto a la cepa utilizada en el desarrollo de nuestro trabajo, se ha establecido que el serotipo III, se subdivide en 4 subserotipos (1, 2, 3 y 4), y que el más común es el subserotipo 2 que se distingue por ser un clon hipervirulento

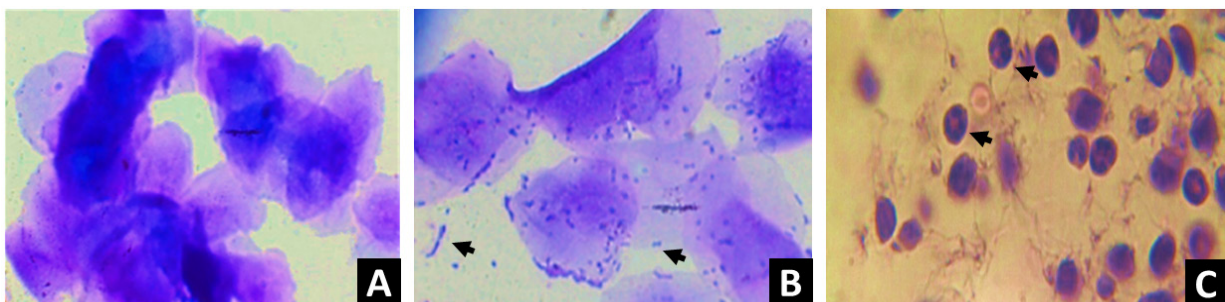


Figura 5. Análisis Citológico del tracto vaginal de ratones C57BL/6J inoculados con SGB. Células epiteliales del tracto vaginal, teñidas con Diff-Quik y observadas en microscopio óptico con un objetivo 100X se analizó la presencia de SGB. En el grupo control inoculados con gelatina al 10% no se observan bacterias (A), a diferencia del grupo inoculados con SGB, se observa la presencia de bacterias formando conglomerados de diplococos o forma libre alrededor de las células epiteliales, indicadas con flechas (B). Además, corte microscópico de mucosa de tracto vaginal fue teñido con hematoxilina-eosina y analizadas mediante microscopio óptico con un objetivo 40X, observándose infiltración de macrófagos y neutrófilos (C), indicadas con flechas

(ST17), el cual está fuertemente asociado a enfermedad invasiva neonatal (24,25,16). Nosotros adaptamos una cepa de SGB aislada en Chile, a permanecer en el tracto vaginal de un ratón C57BL/6J. Esta cepa resultó ser del serotipo III y ST 17, su secuencia fue depositada en el NCBI bajo el código KU736792.

El desarrollo de un modelo animal de infección del tracto vaginal con SGB ha sido un constante desafío; desde el año 1982 a la fecha se han descritos diferentes estudios que utilizan un modelo animal (10) y la incorporación de 17 β -estradiol (11) ha sido un gran aporte a este desafío. En el mundo se han utilizado cepas ATCC y cepas de SGB provenientes de cepas clínicas que difieren a las de nuestro trabajo en la caracterización de la cepa y tipo de ratón consanguíneo en el cual ha ensayado (13). Nosotros adaptamos nuestra cepa bacteriana a permanecer en el tracto vaginal mediante pasajes sucesivos de inoculación y recuperación. El efecto sobre la virulencia de esta bacteria debe ser evaluada. Además, los animales recibieron un tratamiento con gentamicina previo al tratamiento con 17 β -estradiol, lo cual es diferente a lo reportado a la fecha. El efecto de este tratamiento puede ser importante para establecer un modelo de colonización prolongado por SGB, lo cual debe ser estudiado. La cepa de SGB permaneció al menos 16 días en el tracto vaginal y el recuento de SGB obtenido fue constante, sin observar variaciones significativas en el recuento bacteriano. Además, nuestras condiciones experimentales nos permitieron observar SGB en pulmón, bazo y riñón, lo cual necesariamente se asocia a una bacteremia.

Nuestro trabajo es el primer reporte de una cepa de SGB proveniente desde una cepa clínica en Chile, que ha sido utilizada en el desarrollo de un modelo animal de colonización vaginal, lo cual nos permitirá evaluar nuevas metodologías de detección, prototipos de vacunas, y estudiar la interacción patógeno-huésped asociado a la infección por SGB.

Agradecimientos

Nuestros agradecimientos a D. Luis Sepúlveda

y a la Sra. Cecilia Soto por su ayuda y capacitación en el uso y cuidado de los animales de laboratorio. Además, a Luis Rodríguez MV, por su apoyo en los análisis estadísticos y finalmente a la Sra. América Abarca por su apoyo técnico y humano en el desarrollo de este trabajo.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Instituto de Salud Pública de Chile y al Instituto Milenio de Inmunología e Inmunoterapia (P IMII P09/016-F) del Dr. Alexis Kalergis.

Bibliografía

1. Edmond KM, Kortsalioudaki C, Scott S, Schrag SJ, Zaidi AK, Cousens S, et al. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *The Lancet*. 2012; 379 (9815): 547-556. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61651-6.
2. 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; 65(suppl_2): S100-S111. doi: 10.1093/cid/cix658.
3. Kobayashi M, Vekemans J, Baker CJ, Ratner, AJ, Le Doare K, Schrag, SJ. Group B Streptococcus vaccine development: present status and future considerations, with emphasis on perspectives for low and middle income countries [version 1; referees: 2 approved] F1000Research. 2016; 5:2355. doi: 10.12688/f1000research.9363.1
4. Seale, A. C., Blencowe, H., Bianchi-Jassir, F., Embleton, N., Bassat, Q., Ordi, J., ... & Lawn, J. E. Stillbirth with group B Streptococcus disease worldwide: systematic review and meta-analyses. *Clinical infectious diseases*. 2017; 65(suppl_2): S125-S132. doi: 10.1093/cid/cix585.
5. Abarzúa F, Argomedo C, Meissner A, Díaz T, Garrido P, Fariña S, Chahin C. Prevalencia de portación vaginal-anal de Streptococcus agalactiae en el tercer trimestre de gestación y susceptibilidad a macrólidos y lincosamidas, en mujeres embarazadas de Clínica Alemana Temuco, Chile. *Revista chilena de infectología*. 2014; 31(3): 305-308. doi: 10.4067/S0716-10182014000300009.
6. Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: Revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep*. 2010; 59:1-36.
7. Brzywczy-Wloch M, Pabian W, Majewska E, Zuk M G, Kielbik J, Gosiewski T, Bulanda MG. Dynamics of colonization with group B streptococci in relation to normal flora in women during subsequent trimesters of pregnancy. *New Microbiol*. 2014; 37 (3): 307-319. doi: 10.1111/1574-6968.12292
8. Lin SM, Zhi Y, Ahn KB, Lim S, Seo HS. Status of group B streptococcal vaccine development. *Clinical and*

Experimental Vaccine Research. 2018; 7(1): 76-81. doi: 10.7774/cevr.2018.7.1.76

9. Li S, Wen G, Cao X, Guo D, Yao Z, Wu CA, Ye X. Molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* in a mother-baby prospective cohort study: Implication for vaccine development and insights into vertical transmission. *Vaccine*. 2018; 36(15): 1941-1948. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.02.109.

10. Cox F. Prevention of group B streptococcal colonization with topically applied lipoteichoic acid in a maternal-newborn mouse model. *Pediatric research*. 1982; 16(10): 816.

11. Carey AJ, Tan CK, Mirza S, Irving-Rodgers H, Webb RI, Lam A, Ulett GC. Infection and cellular defense dynamics in a novel 17 β -estradiol murine model of chronic human group B streptococcus genital tract colonization reveal a role for hemolysin in persistence and neutrophil accumulation. *The Journal of Immunology*. 2014; 192(4): 1718-1731. doi: 10.4049/jimmunol.1202811

12. Randis TM, Gelber SE, Hooven TA, Abellar RG, Akabas LH, et al. Group B *Streptococcus* β -hemolysin/cytolysin breaches maternal-fetal barriers to cause preterm birth and intrauterine fetal demise in vivo. *The Journal of infectious diseases*. 2014; 210(2): 265-273. doi: 10.1093/infdis/jiu067

13. Patras KA, Doran KS. A Murine Model of Group B *Streptococcus* Vaginal Colonization. *Journal of visualized experiments*. 2016; (117): e54708. doi:10.3791/54708

14. Díaz-Dinamarca DA, Jerias JL., Soto DA, Soto JA, Díaz NV, Leyton YY, et al. The Optimisation of the Expression of Recombinant Surface Immunogenic Protein of Group B *Streptococcus* in *Escherichia coli* by Response Surface Methodology Improves Humoral Immunity. *Molecular biotechnology*. 2018; 60(3): 215-225. doi: 10.1007/s12033-018-0065

15. Ministerio de Salud de Chile. Reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria. Decreto Supremo 158/04. Vol Decreto Supremo 158/04. Santiago de Chile; 2005. Visto en <http://bcn.cl/1v4s8>

16. Jones N, ohnsack JF, Takahashi S, Oliver KA, Chan MS, Kunst F, et al. Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 2530-2536. PMID: 12791877

17. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*. 1991; 173(2): 697-703. doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991.

18. Scudamore CL, Busk N, Vowell K. A simplified necropsy technique for mice: making the most of unscheduled deaths. *Laboratory animals*. 2014; 48(4): 342-344. doi: 10.1177/0023677214536555

19. Alzola R. Curso de Histología, Embriología y Teratología, Guía de estudio: técnicas histológicas (1ªEd) Argentina: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Departamento de Ciencias Biológicas 2001.

20. Vekemans J, Moorthy V, Friede M, Alderson MR,

Sobanjo-Ter Meulen A, et al. Maternal immunization against Group B streptococcus: World Health Organization research and development technological roadmap and preferred product characteristics. *Vaccine*. 2018. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.09.087

21. Stapleton RD, Kahn JM, Evans LE, Critchlow CW, Gardella CM. Risk factors for group B streptococcal genitourinary tract colonization in pregnant women. *Obstet Gynecol*. 2005; 106(6): 1246-52. doi:10.1097/01.AOG.0000187893.52488.4b

22. Akoh CC, Pressman EK, Cooper E, Queenan RA, Pillittere J, O'Brien KO. Prevalence and risk factors for infections in a pregnant adolescent population. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2017; 30(1): 71-5. doi:10.1016/j.jpag.2016.08.001.

23. 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; 65(suppl_2): S89-S99. doi: 10.1093/cid/cix653

24. Kong F, Martin D, James G, Gilbert GL. Towards a genotyping system for *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus): use of mobile genetic elements in Australasian invasive isolates. *Journal of medical microbiology*. 2003; 52(4): 337-344. doi: 10.1099/jmm.0.05067-0

25. Bisharat N, Crook DW, Leigh J, Harding RM, Ward PN, Coffey TJ, et al. Hyperinvasive neonatal group B streptococcus has arisen from a bovine ancestor. *Journal of clinical microbiology*. 2004; 42(5): 2161-2167. doi: 10.1128/JCM.42.5.2161-2167.2004.