

Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



**Caracterización microbiológica y funcional de una cepa
mutante de *Streptococcus agalactiae knockout* para el gen
*sip***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magíster en Bioquímica por:**

DANIEL FERNANDO ESCOBAR ARAYA

Director de tesis: Dr. Carlos A. Santiviago

Co-director de tesis: Dr. Abel E. Vásquez Veloso

Santiago – CHILE

Octubre de 2022

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

DANIEL FERNANDO ESCOBAR ARAYA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Carlos A. Santiviago _____

Co-director de Tesis:

Dr. Abel E. Vásquez Veloso _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Sergio Lobos Camus _____

Dr. Sergio Álvarez _____

Dr. Juan Carlos Salazar _____

Dedicada a Dios, mis hijos y seres queridos.

Agradecimientos

Agradezco por sobre todo a Dios, quien ha estado a mi lado para sostenerme, guiarme y otorgarme las herramientas necesarias para vivir de mejor manera en este mundo.

A mis hijos Luciano y Rafaella por ser la luz de mi vida, y a nuestro Ángel que está en los cielos.

A Cecilia, mi madre, hermanos y familiares, y a todos aquellos que ya no están entre nosotros, pero que descansan en un lugar mejor.

A mis amigos y hermanos; Héctor, Daniel, César, Carolina, Sebastián, Nicole, Juan, Ronald, Daniela, Camila, Bianca y Pedro.

A mis mentoras María Soledad Prat y Aurora Maldonado.

A mis directores de tesis, los doctores Abel Vásquez Veloso y Carlos A. Santiviago, por todo su apoyo y conocimiento entregado.

A la Sección Biotecnología del Instituto de Salud Pública de Chile. A todos sus integrantes, a los históricos y a los recientemente incorporados: Diego, América, Pablo, Loredana, Daniel, Gisselle y Ricardo.

Al Dr. Adam Ratner por su valiosa ayuda y generosidad en la entrega desinteresada del vector pMBsacB que él y su grupo desarrollaron.

Financiamiento

Esta tesis fue desarrollada en la Sección Biotecnología, la cual está inserta en el Departamento Agencia Nacional de Dispositivos Médicos, Innovación y Desarrollo del Instituto de Salud Pública de Chile (ISPCH). Contó con el financiamiento del ISPCH, a través del presupuesto asignado al proceso de Investigación Aplicada y de la Beca N° 79200027 para la realización de Magíster – Convocatoria Sector Públicos Nacional del 2020 – de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID).

Índice general

Agradecimientos	IV
Financiamiento	V
Índice general	VI
Índice de figuras	IX
Índice de tablas	X
Abreviaturas	XI
Resumen	XII
Summary	XIV
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Streptococcus agalactiae</i>	1
1.2 Epidemiología de <i>Streptococcus agalactiae</i>	2
1.3 Mecanismos de patogenicidad.....	4
1.3.1 Factores de virulencia.....	5
1.3.1.1 Proteínas de unión a fibrinógeno.....	6
1.3.1.2 Glicoproteínas con repeticiones ricas en serina.....	7
1.3.1.3 Proteína de unión a laminina.....	7
1.3.1.4 Proteína de superficie de unión al plasminógeno.....	7
1.3.1.5 Pilus.....	8
1.3.1.6 Proteína de unión a fibronectina.....	8
1.3.1.7 Adhesina bacteriana inmunogénica.....	9
1.3.2 Proteína Inmunogénica de Superficie.....	11
1.4 Estrategias de mutagénesis en <i>Streptococcus agalactiae</i>	12
1.4.1 Vector pMBsacB.....	13
II. HIPÓTESIS	15
III. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo general.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1 Diseño y construcción <i>in silico</i> de la secuencia de recombinación.....	16
4.1.1 Selección del genoma completo de referencia.....	16
4.1.2 Ensamblaje <i>in silico</i> de la secuencia de recombinación.....	16

4.1.3	Síntesis de la secuencia de recombinación.....	17
4.1.4	Obtención de un vector para recombinación homóloga	17
4.2	Obtención de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 de <i>S. agalactiae</i> mutante <i>sip</i>	18
4.2.1	Cepa BIOTEC.ISPCH/2015 de <i>S. agalactiae</i>	18
4.2.2	Obtención de <i>Escherichia coli</i> DH5 α quimiocompetentes	18
4.2.3	Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α con vector pMBSacB.....	18
4.2.4	Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α con vector pUC57-MutSIP	19
4.2.5	Purificación de ADN plasmidial	19
4.2.6	Subclonamiento.....	20
4.2.7	Transformación de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 de <i>S. agalactiae</i>	21
4.2.8	Mutagénesis.....	22
4.2.8.1	Generación del primer entrecruzamiento	23
4.2.8.2	Ensayo de sensibilidad a sacarosa.....	23
4.2.8.3	Generación del segundo entrecruzamiento.....	24
4.3	Caracterización molecular y microbiológica de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 de <i>S. agalactiae</i> mutante <i>sip</i>	24
4.3.1	Identificación de la proteína Sip.....	24
4.3.1.1	Ensayo de flujo lateral para detección de la proteína Sip.....	24
4.3.1.2	<i>Western blot</i>	25
4.3.2	Caracterización genética.....	26
4.3.2.1	PCR convencional	26
4.3.2.2	Secuenciación masiva	27
4.3.3	Caracterización microbiológica.....	27
4.3.3.1	Test de CAMP.....	27
4.3.3.2	Susceptibilidad antimicrobiana	28
4.3.3.2.1	Susceptibilidad por método de difusión en agar	28
4.3.3.2.2	Susceptibilidad por método de difusión-dilución (epsilometría)	29
4.3.3.3	Aglutinación en látex	29
4.3.3.4	Cinética de crecimiento.....	29
4.4	Evaluación de la capacidad de adherencia e invasión de la cepa mutante <i>sip</i> en la línea celular HeLa.....	30
4.4.1	Ensayo de adherencia celular en modelo <i>in vitro</i> en la línea celular HeLa.....	30
4.4.2	Ensayo de invasión celular en modelo <i>in vitro</i> en la línea celular HeLa.....	31
4.5	Análisis estadísticos	32

V.	RESULTADOS.....	33
5.1	Obtención de la secuencia de recombinación.....	33
5.1.1	Obtención de los brazos de homología del gen <i>sip</i>	33
5.1.2	Construcción <i>in silico</i> de la secuencia de recombinación	34
5.1.3	Síntesis de la secuencia de recombinación.....	35
5.1.4	Validación <i>in vitro</i> de las secuencia de recombinación.....	35
5.2	Mutagénesis dirigida al locus del gen <i>sip</i>	37
5.2.1	Verificación de identidad de los vectores pMBsacB y pUC57-MutSIP, y subclonamiento.....	37
5.2.2	Transformación de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 de <i>S. agalactiae</i>	39
5.2.3	Mutagénesis: primer entrecruzamiento	39
5.2.4	Mutagénesis: segundo entrecruzamiento.....	42
5.3	Caracterización molecular.....	43
5.3.1	Verificación de la ausencia de expresión de la proteína Sip en la cepa mutante	43
5.3.2	Caracterización genética.....	44
5.3.2.1	Visualización de productos de PCR.....	44
5.3.2.2	Análisis de genomas.....	45
5.4	Caracterización microbiológica.....	50
5.5	Evaluación del rol de la proteína Sip en la adherencia e invasión de células eucariontes <i>in vitro</i>	52
VI.	DISCUSIÓN.....	54
VII.	CONCLUSIONES.....	61
VIII.	REFERENCIAS	62
IX.	ANEXOS	70

Índice de figuras

Figura 1. Agrupación filogenética de las especies de <i>Streptococcus</i>	1
Figura 2. Incidencia de la EOD y la LOD en Estados Unidos entre 1990-2008.....	3
Figura 3. Estructura primaria de la proteína Sip	11
Figura 4. Esquema del vector pMBSacB.....	14
Figura 5. Esquema de la construcción <i>in silico</i> de la secuencia de recombinación	17
Figura 6. Mapa del vector pUC57-Mini.....	17
Figura 7. Diseño <i>in silico</i> de la secuencia de recombinación.....	34
Figura 8. Esquema del vector pUC57-MutSIP.....	35
Figura 9. Validación <i>in vitro</i> de las secuencias flanqueantes del gen <i>sip</i>	36
Figura 10. Digestión analítica de los vectores pMBSacB y pUC57-MutSIP	37
Figura 11. Digestión analítica del vector pMBSacB-MutSIP.....	38
Figura 12. Confirmación de la transformación de la cepa <i>S. agalactiae</i> BIOTEC.ISPCH/2015 con pMBSacB-MutSIP	39
Figura 13. Confirmación del primer entrecruzamiento.....	40
Figura 14. Ensayo de sensibilidad a sacarosa de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 con la inserción del vector pMBSacB-MutSIP	41
Figura 15. Visualización de los productos de amplificación del locus con el alelo mutante y silvestre	43
Figura 16. Detección de la proteína Sip mediante inmunoensayos.....	44
Figura 17. Confirmación de la mutagénesis por PCR.....	45
Figura 18. Alineamiento múltiple de genomas completos.....	47
Figura 19. Alineamiento múltiple del locus del gen <i>sip</i>	50
Figura 20. Cinética de crecimiento de las cepas BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre y mutante <i>sip</i>	50
Figura 21. Secreción del factor CAMP.....	51
Figura 22. Ensayos de adherencia e invasión celular.....	53

Índice de tablas

Tabla 1. Resumen de las principales proteínas de <i>S. agalactiae</i> relacionadas a la adherencia e invasión celular	10
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este estudio	27
Tabla 3. Ranking de los 10 mejores alineamientos con la secuencia del gen <i>sip</i>	33
Tabla 4. Reporte del control de calidad de los ensamblajes mediante el programa <i>Quast</i>	46
Tabla 5. Perfil de resistencia de las cepas <i>S. agalactiae</i> BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre y mutante <i>sip</i>	51

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Infusión de cerebro y corazón
CC	Complejo clonal
CDC	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EOD	Enfermedad de inicio temprano
HRP	Peroxidasa de rábano
ISPOCH	Instituto de Salud Pública de Chile
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LOD	Enfermedad de inicio tardío
LPXTG	Leucina-Prolina-Cualquiera-Threonina-Glicina
Mb	Megabases
MEM	Medio Esencial Mínimo
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MOI	Multiplicidad de infección
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
nt	Nucleótidos
OD _{600nm}	Densidad óptica a 600 nanómetros
OE-PCR	<i>overlap extention PCR</i>
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PBS	Suero fisiológico tamponado con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG-6000	Polietilenglicol-6000
PI	<i>Pilus island</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
Sip	Proteína inmunogénica de superficie
ST	Secuencia tipo
TBS	Suero fisiológico tamponado con Tris
TH	Todd-Hewitt
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
V	Volts

Resumen

Streptococcus agalactiae (*Streptococcus* Grupo B), es el principal agente causante de sepsis y meningitis bacteriana en recién nacidos. Dentro de la especie se describen 10 serotipos (Ia, Ib, II al IX) basados en el antígeno capsular de su superficie. La portación de esta bacteria en los tractos gastrointestinales y genitourinario femenino constituyen el principal factor de riesgo para la enfermedad invasora por *S. agalactiae* en los recién nacidos. Adicionalmente, esta bacteria puede provocar parto prematuro o muerte fetal cuando la infección asciende desde la vagina hasta a alcanzar el feto. Por lo anterior, se están desarrollando prototipos de vacunas dirigidas a las gestantes que permitan disminuir la enfermedad de inicio tardío, para lo cual distintos blancos están siendo utilizados. Uno de esos blancos es la proteína inmunogénica de superficie (Sip), la cual está presente en todos los serotipos de *S. agalactiae*. La proteína Sip es un buen inmunógeno y adyuvante, de acuerdo a estudios realizados a nivel preclínico en la Sección Biotecnología del Instituto de Salud Pública de Chile (ISPCH). Además, el gen que la codifica ha demostrado ser un excelente blanco para la detección de la especie mediante PCR en tiempo real, dado su alto porcentaje de similitud en su composición nucleotídica entre las diferentes cepas, evidenciada por su alta sensibilidad y especificidad, como resultado de la validación analítica. A la fecha, la función y la estructura de la proteína Sip es desconocida. Desde la secuencia primaria, se ha determinado que tiene un péptido señal de secreción y un motivo de LysM en el extremo N-terminal, lo cual le permite a la proteína anclarse al peptidoglicano de la pared celular y con ello permanecer en la superficie de la bacteria. Datos aún no publicados por la Sección Biotecnología del ISPCH han demostrado aumento en los niveles de transcritos del gen *sip* en modelo murino de colonización vaginal. Por lo anterior, en este proyecto se evaluó su potencial rol en la adherencia y/o invasión de células eucariontes *in vitro*.

Para evaluar el rol de la proteína Sip en los mecanismos de adherencia e invasión celular, primeramente, se diseñó *in silico* un *cassette* de recombinación basado en un genoma referencia de *S. agalactiae* (GenBank LS483387.1). El *cassette* de recombinación estuvo compuesto por las regiones flanqueantes al marco de lectura abierto (ORF) del gen *sip*; 1000 pb río arriba y 1001 pb río abajo del ORF del gen. Ambas secuencias se unieron al ORF del gen *cat*, codificante para la proteína cloranfenicol acetiltransferasa, cuya expresión confiere

resistencia a Cloranfenicol. La secuencia diseñada y posteriormente sintetizada, fue subclonada en el vector suicida pMBSacB, utilizando los sitios de restricción *XhoI* y *NotI*. Se transformó la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 de *S. agalactiae* con el vector pMBSacB-MutSIP (*cassette* de recombinación subclonado en el vector pBMSacB) y, mediante ensayos de crecimiento en medios de cultivo a temperaturas permisivas y no permisivas para la replicación del vector, se generó la recombinación homóloga, intercambiando por completo el ORF del gen *sip* por el ORF del gen *cat*. La cepa BIOTEC.ISPCH/2015 de *S. agalactiae* mutante *sip*, fue confirmada mediante secuenciación masiva, evidenciando la ausencia de la secuencia del ORF del gen *sip* a lo largo del genoma. Además, se realizaron inmunoensayos (*western blot* y ensayos de flujo lateral) con anticuerpos monoclonales y policlonales anti-rSip, que confirmaron la ausencia de la expresión de Sip en la cepa mutante. Luego, se caracterizó microbiológicamente la cepa mutante *sip* en términos de su perfil de resistencia a los antimicrobianos, capacidad de expresión del factor CAMP y cinética de crecimiento. Finalmente, el rol de la proteína Sip en mecanismos de adherencia e invasión celular, fue evaluado en un modelo de línea celular HeLa.

De acuerdo a lo observado, el número de bacterias recuperadas de los ensayos de adherencia, entre las cepas BIOTEC.ISPCH/2015 de *S. agalactiae* silvestre y mutante, mostró una diferencia entre ambas estadísticamente significativa, evidenciando que la cepa mutante *sip* modificó, por disminución, su fenotipo de adherencia respecto de la cepa silvestre. De los ensayos de invasión celular, se observó una tendencia de mayor recuperación de bacterias desde la cepa silvestre respecto de la cepa mutante *sip*, pero sin una diferencia estadísticamente significativa.

La obtención de una cepa de *S. agalactiae* mutante *sip* representa un avance en el entendimiento del rol de la proteína Sip para esta especie. Los resultados sugieren que la función de la proteína Sip estaría relacionada con la adherencia de la bacteria en células eucariotes.

Summary

Microbiological and functional characterization of a *Streptococcus agalactiae* mutant strain for the *sip* gene

Streptococcus agalactiae (Group B *Streptococcus*) is a leading cause of sepsis and meningitis in newborns. According to capsular polysaccharide antigen, 10 distinct serotypes have been described (Ia, Ib, II–IX). The asymptomatic presentation in the gastrointestinal and female genitourinary tracts in pregnant women constitutes the main risk factor for invasive *S. agalactiae* disease in newborns. Additionally, this bacterium causes preterm labor or fetal death when the infection ascends from the vaginal tract to fetus. To date, prototypes of vaccines aimed at pregnant women are being developed to reduce late-onset disease using different targets as candidates. The surface immunogenic protein (Sip), present on all serotypes of *S. agalactiae*, has demonstrated to be a suitable vaccine target in a murine model. The Sip protein is an excellent immunogen and adjuvant according to studies carried out in preclinical models at Biotechnology Section in the Health Public Institute of Chile (ISPCH). In addition, the gene encoding the Sip protein has proven to be a good target for the detection of *S. agalactiae* by real-time polymerase chain reaction (PCR) because of the high percentage of similarity and nucleotide composition among the different strains. Moreover, high sensitivity and specificity were observed in an analytical validation. To date, the function and structure of the Sip protein is unknown. Based on the primary sequence, it has been determined that the protein has a secretion peptide and a LysM motif at the N-terminal, which allow it to anchor to the peptidoglycan of the bacterial cell wall and remain on the bacterial surface. Unpublished data by the Biotechnology Section of ISPCH has shown an increase in levels of *sip* gene transcripts in a murine model of vaginal colonization.

To evaluate the role of the Sip protein in cell adherence and invasion mechanisms, a recombination cassette based on a reference genome of *S. agalactiae* (GenBank LS483387.1) was first designed *in silico*. The recombination cassette was composed of the *sip* gene open reading frame (ORF) flanking regions, 1000 bp upstream and 1001 bp downstream of the *sip* gene ORF. Both sequences were linked to the ORF of the *cat* gene and coded for the chloramphenicol acetyltransferase protein, whose expression confers resistance to chloramphenicol. The designed and subsequently synthesized sequence was subcloned into

the pMBsacB suicide vector using the *XhoI* and *NotI* restriction sites. The BIOTEC.ISPCH/2015 strain of *S. agalactiae* was transformed with pMBsacB-MutSIP (recombination cassette subcloned in pBMsacB vector) and based on growth assays in culture media at temperatures permissive and non-permissive to vector replication, homologous recombination was generated that completely exchanged the ORF of the *sip* gene for the ORF of the *cat* gene. The BIOTEC.ISPCH/2015 strain of *S. agalactiae* mutant *sip* was confirmed by massive sequencing, demonstrating the absence of the ORF sequence of *sip* gene along the genome. In addition, immunoassays (western blot and lateral flow assays) were performed with monoclonal and polyclonal antibodies (anti-rSip protein), which confirmed the absence of Sip expression in the mutant strain. The *sip* mutant strain was then microbiologically characterized in terms of its antimicrobial resistance profile, CAMP factor expression capacity, and growth kinetics. Finally, the role of the Sip protein in cell adhesion and invasion mechanisms was evaluated in a HeLa cell line model.

The number of bacteria recovered from the adherence assays showed a difference of 4,7 fold between the wild-type and mutant *sip* strains of *S. agalactiae*, which was estimated as a statistically significant difference. Demonstrating that the *sip* mutant strain modified its adherence phenotype with respect to the wild-type strain. Based on cell invasion assays, a trend of higher bacterial recovery from the wild-type strain relative to the *sip* mutant strain was observed but without presenting a statistically significant difference.

Obtaining a *sip* mutant strain of *S. agalactiae* represents a breakthrough in the understanding of the role of the Sip protein for this species. The results suggest that the function of the Sip protein could be related to bacterial adhesion in eukaryotic cells.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 *Streptococcus agalactiae*

Dentro del género *Streptococcus* se han descrito y reconocido más de 100 especies, y en la última década más de 10 nuevas especies fueron incorporadas (1). Éstas pueden clasificarse en hemolíticas y no hemolíticas, y en ambos grupos hay especies de relevancia clínica por su capacidad de causar infecciones en los seres humanos, como *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* Grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* Grupo B), *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (*Streptococcus* Grupo C y G), *Streptococcus pneumoniae*, Grupo *Streptococcus mitis*, Grupo *Streptococcus anginosus*, Grupo *Streptococcus salivarius*, Grupo *Streptococcus mutans* y Grupo *Streptococcus bovis*, entre otros aislados con menor frecuencia desde humanos (1). Una reconstrucción evolutiva basada en la comparación de las secuencias del gen que codifica el ARN ribosomal 16S (16S ARNr) muestra la ubicación en un árbol filogenético de algunas especies seleccionadas de los grupos antes mencionados (**Figura 1**).

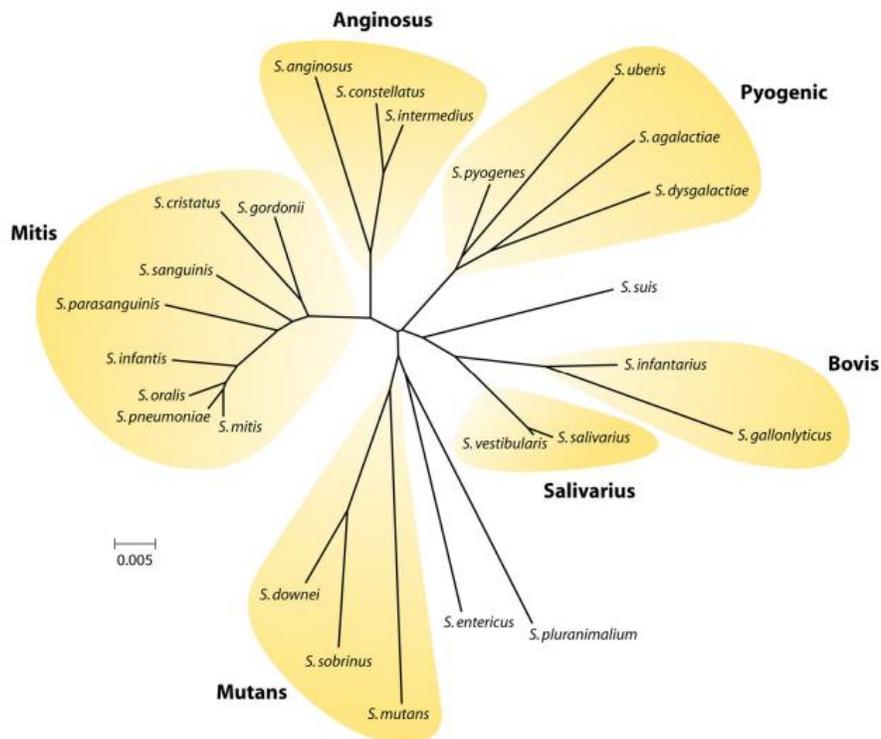


Figura 1. Agrupación filogenética de las especies de *Streptococcus*. Árbol filogenético basado en la secuenciación del gen 16S ARNr. Imagen tomada desde Nobbs y cols., 2009 (2).

Entre las especies con relevancia clínica y epidemiológica, se encuentra *S. agalactiae*. Esta especie fue identificada por primera vez como la causa de la mastitis bovina a finales del siglo XIX y desde 1979 fue reportado como agente causal de infecciones neonatales invasoras (1–3). *S. agalactiae* es una bacteria cocácea Gram positivo, capsulada, anaerobia facultativa y β -hemolítica en placas de agar base suplementado con sangre de cordero (1). Esta bacteria pertenece al grupo B de Lancefield y de esta clasificación surge su nombre alternativo (*Streptococcus* Grupo B), ya que es la única especie del género que se agrupa en esta categoría por presentar el antígeno B en su pared celular (3). *S. agalactiae* se subdivide en diez serotipos distintos (Ia, Ib y II al IX), cada uno antigénicamente y estructuralmente único en base a los polisacáridos capsulares que el microorganismo presenta en altos niveles en su superficie (1,2,4). De éstos, los serotipos Ia, Ib, II, III y V son aislados con mayor frecuencia desde humanos (5,6). Además, de acuerdo a análisis realizados por *Multilocus Sequencing Typing* (MLST), se han determinado las secuencias tipo (ST) a las cuales corresponden la mayor parte de los aislados clínicos: ST1, ST17, ST19 y ST23 (5). Dentro del grupo de complejos clonales (CC) identificados más frecuentemente por MLST (CC1, CC10, CC23, CC19 y CC17), específicamente en el CC17 se ha demostrado que el ST17 (serotipo III) está asociado con infecciones neonatales invasivas, especialmente meningitis, por lo que se le ha denominado el clon hipervirulento (7–9).

1.2 Epidemiología de *Streptococcus agalactiae*

S. agalactiae es reconocido como un patógeno importante que causa sepsis y meningitis en los recién nacidos. Se estima que en 2015 hubo 319.000 casos infantiles con cuadros invasivos provocados por *S. agalactiae* a nivel mundial (10). Estas infecciones neonatales pueden manifestarse de dos formas clínicas diferentes: la enfermedad neonatal de inicio temprano (EOD, por sus siglas en inglés), que se caracteriza por sepsis, neumonía y meningitis dentro de los primeros 6 días de vida; y la enfermedad de inicio tardío (LOD, por sus siglas en inglés), que se asocia con meningitis y sepsis dentro de los 7 y 89 días de edad (1,11). El factor de riesgo más importante para el desarrollo de la enfermedad invasora neonatal es la colonización por *S. agalactiae* del tracto gastrointestinal y urogenital de la madre. En ese contexto, se ha reportado una portación entre el 10 y el 30% de las mujeres embarazadas a nivel mundial, de acuerdo a la guía *Prevention of perinatal group B*

streptococcal disease publicada por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos en la revisión de 2010 (1,12). Por otro lado, el Colegio Real de Obstetras y Ginecólogos del Reino Unido, cifra una portación entre el 20 y el 40% en su guía *Prevention of Early-onset Neonatal Group B Streptococcal Disease* de 2017 (13). En Chile, se estimó una prevalencia de colonización vagino-rectal de un 14% en mujeres embarazadas mediante un estudio piloto realizado en hospitales universitarios y clínicas privadas (14,15).

Las recomendaciones oficiales de los CDC para la prevención de las infecciones neonatales por *S. agalactiae* fueron primeramente publicadas en 1996 y luego revisadas en 2002 y 2010 (12). Estas guías resultaron en una baja sustancial de la EOD por *S. agalactiae* al incorporar la administración de antibióticos como profilaxis intraparto y el tamizaje universal de las gestantes entre las semanas 35 y 37 del embarazo, observándose una disminución de 1,8 casos/1.000 nacidos vivos a principios de la década de 1990 a 0,26 casos/1.000 nacidos vivos en 2010 (12) (**Figura 2**). Sin embargo, la profilaxis intraparto no tuvo impacto en la LOD por *S. agalactiae*, continuando con ello como un problema de salud pública por su morbilidad y mortalidad neonatal (12).

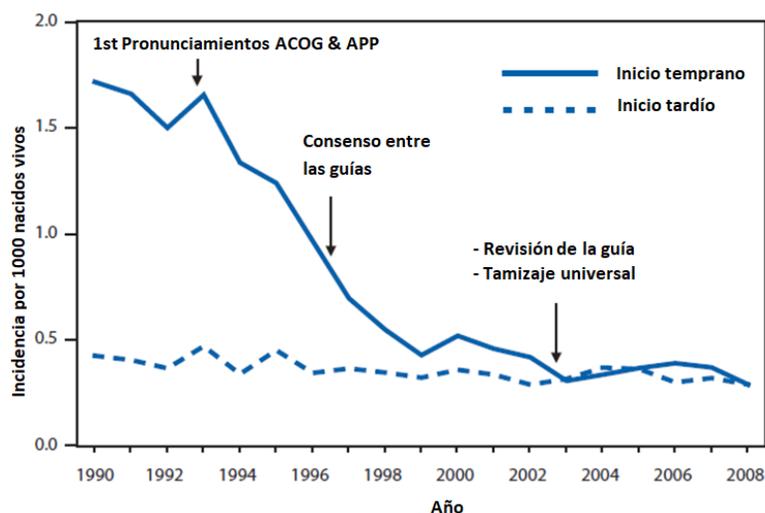


Figura 2. Incidencia de la EOD y la LOD en Estados Unidos entre 1990-2008. Abreviaturas: ACOG: Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología; AAP: Academia Americana de Pediatría. Imagen adaptada desde Verani y colaboradores, 2010 (12).

Por otro lado, las infecciones con cuadros invasivos por *S. agalactiae* en pacientes adultos se observan como infecciones postparto o en adultos inmunocomprometidos con antecedentes de alcoholismo, diabetes mellitus, cáncer, o infección con VIH. En ese contexto, el espectro de dichas infecciones generan neumonía, bacteriemia, meningitis, endocarditis, infecciones del tracto genitourinario, infecciones de piel y tejidos blandos y osteomielitis (1,6).

1.3 Mecanismos de patogenicidad

La especie *S. agalactiae* coloniza asintóticamente los tractos gastrointestinal inferior y genital femenino, pero es un patógeno oportunista invasivo en otros nichos del hospedero (16). En el caso de las madres en gestación, la bacteria puede alcanzar al feto causando su muerte o un parto prematuro, y a los recién nacidos generando con mayor frecuencia enfermedades invasoras, tales como sepsis, neumonía, meningitis y encefalopatía (16). Se ha reportado que entre un 15 y un 50% de los recién nacidos de madres colonizadas con *S. agalactiae* al momento del parto se infectan con esta bacteria, siendo el canal del parto o la aspiración de líquido amniótico contaminado las principales vías de contagio (17,18). De éstos, entre el 1 y el 2% desarrolla la EOD (19). Por otro lado, el mecanismo de la infección ascendente que genera el parto prematuro o la muerte fetal no está comprendido del todo. Sin embargo, un estudio reportado por Vornhagen y colaboradores (2018) muestra que *S. agalactiae* induce la exfoliación de las células epiteliales de la vagina mediante la activación de la señalización de la β -catenina para inducir la transición epitelio-mesénquima. Inducida la exfoliación vaginal de las células epiteliales, la colonización de *S. agalactiae* no se vio alterada e incluso propició la infección ascendente al espacio intrauterino, resultando en la muerte fetal y nacimiento prematuro en un modelo murino. Los factores específicos involucrados en este mecanismo son aún desconocidos (16,20).

La colonización vaginal de *S. agalactiae* es de carácter transitoria e intermitente, debido a las condiciones propias del nicho ecológico, tales como pH, microbiota comensal, respuesta inmunitaria del hospedero y cambios durante el embarazo, entre otras (5,21).

Los roles de la bacteria como agente colonizador y patogénico requieren de una serie de mecanismos moleculares que le permiten adaptarse al nicho ecológico, colonizarlo y eventualmente generar una infección. *S. agalactiae* puede expresar proteínas con capacidad de adherencia a los componentes de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés),

las cuales contribuyen a una mayor adherencia *in vitro* de la bacteria en líneas celulares de epitelio vaginal y cervical (16,22,23). La ECM es un componente esencial de los tejidos de los vertebrados y cumple un rol fundamental en muchos procesos fisiológicos, desde crecimiento y desarrollo celular hasta su muerte (24). Consiste en todas las moléculas secretadas e inmovilizadas en el espacio extracelular y su composición varía de un tejido a otro, así como las propiedades mecánicas, de elasticidad y flexibilidad (24). Sin embargo, la ECM posee los siguientes componentes básicos: glucosaminoglicanos y sus proteoglicanos que resisten las fuerzas de compresión: glicoproteínas adhesivas (laminina y fibronectina); y proteínas fibrosas que proporcionan resistencia a la tracción (colágenos y elastina) (24). Por otro lado, se ha demostrado que el fibrinógeno puede ingresar a la matriz extracelular por interacción directa con el polímero de fibronectina, modificando la topología de la ECM (25). Las bacterias, incluyendo a *S. agalactiae*, tienen la capacidad de adherirse a estos componentes propiciando su permanencia en el hospedero. Para ello, *S. agalactiae* contiene en su cromosoma una serie de genes que codifican proteínas con funciones biológicas de adherencia e invasión celular, evasión de la respuesta inmune, toxinas formadoras de poros y resistencia a péptidos antimicrobianos, además de otro importante factor de virulencia no proteico como la cápsula (18,26,27).

1.3.1 Factores de virulencia

Los factores de virulencia microbianos comprenden una amplia gama de moléculas producidas por microorganismos patógenos, mejorando su capacidad para evadir la respuesta inmune del hospedero y causar enfermedades. Esta definición amplia comprende productos secretados, como toxinas, enzimas y exopolisacáridos, así como estructuras de la superficie celular como cápsulas, lipopolisacáridos, glicoproteínas y lipoproteínas. También se sabe que los cambios intracelulares en las redes reguladoras metabólicas, gobernadas por sensores/reguladores de proteínas y ARN reguladores no codificantes, contribuyen a la virulencia (28). En *S. agalactiae*, corresponden a proteínas que propician la colonización e infección en las células y tejidos del hospedero, además de generar procesos de evasión del sistema inmune y toxicidad celular (7,16). Para colonizar el tracto genital inferior, *S. agalactiae* utiliza la adherencia a las células epiteliales a través de adhesinas asociadas a la superficie. Éstas incluyen proteínas de unión a fibrinógeno (FbsA, FbsB y FbsC), proteína

de unión a laminina (Lmb), pilus PI-1 y PI-2a o PI-2b, proteína de superficie de unión al plasminógeno (PbsP), proteína de unión a fibronectina (SfbA), adhesina bacteriana inmunogénica (BibA) y las glicoproteínas con repeticiones ricas en serina (Srr1 y Srr2) (7,16,29). Algunas adhesinas de *S. agalactiae* pueden ejecutar funciones adicionales en procesos como la invasión celular y la evasión inmune (16). Como complemento a las adhesinas, *S. agalactiae* posee factores de virulencia asociados a la evasión de la respuesta inmune, tales como la peptidasa del factor C5a, hialuronidasa (HylB), polisacáridos capsulares ricos en ácido siálico, superóxido dismutasa y el Factor H. También posee factores de virulencia asociados al daño tisular, como el pigmento hemolítico, β -hemolisina y el Factor CAMP (7,16,18). Adicionalmente, se ha descrito una adhesina “hipervirulenta” de *Streptococcus* Grupo B (HvgA), específica del clon ST17 con tropismo por las meninges (30).

1.3.1.1 Proteínas de unión a fibrinógeno

En este grupo se encuentran las proteínas de superficie FbsA, FbsB y FbsC, las cuales tienen un tamaño aproximado entre 26 y 66 kDa (31–33). FbsA y FbsC son fundamentales para la capacidad de *S. agalactiae* de adherirse a las células epiteliales humanas por medio de unión al ligando fibrinógeno, donde FbsC además, media la formación de biopelículas y también mediaría la diseminación de *S. agalactiae* (16,27). Por otro lado, la proteína FbsB también propicia la adherencia por medio de unión a fibrinógeno (27). Estudios previos han demostrado, a través de deleciones de los genes *fbsA* y *fbsB*, que el rol de FbsA estaría asociado a la adherencia, mientras que FbsB sería necesaria para invadir células humanas, específicamente en células de pulmón (27,34). Si bien hay demostración directamente *in vitro* de unión de entre FbsA y FbsB y el fibrinógeno, no se han identificado los sitios de unión al ligando en estas proteínas (7). Por su parte, la deleción del gen *fbsC* disminuyó la capacidad de *S. agalactiae* para adherirse e invadir células epiteliales y endoteliales humanas, y formar biopelículas en medio de cultivo. Además, la virulencia del mutante *fbsC* y su capacidad para colonizar el cerebro fueron reducidas en modelos murinos de infección (33).

En general, los aislados de *S. agalactiae* obtenidos desde cuadros invasivos muestran una mayor capacidad de unión de fibrinógeno en comparación con los obtenidos desde cuadros de colonización (27).

1.3.1.2 Glicoproteínas con repeticiones ricas en serina

Las glicoproteínas con repeticiones ricas en serina (Srr) son una gran y diversa familia de adhesinas encontradas en la superficie de bacterias Gram positivo, las cuales se unen a fibrinógeno de la ECM (7). Las proteínas Srr1 y Srr2 contienen un motivo de anclaje LPXTG que es reconocido por una enzima sortasa responsable de la unión a la pared celular (7). Los pesos moleculares de estas proteínas varían entre 240 y 350 kDa, y los genes *srr1* y *srr2* comparten <20% de identidad (7,35,36). El gen *srr1* se encuentra presente en la mayoría de los aislados clínicos de *S. agalactiae*, incluidos los serotipos Ia, III y V, mientras que *srr2* estaría restringido al serotipo III y ST17 (22). Se ha reportado que ambas proteínas (Srr1 y Srr2) median la invasión de células endoteliales microvasculares (27,35). Además, Srr1 promueve la colonización vaginal y la persistencia, ya que una mutante con una delección del gen *srr1* mostró una persistencia reducida en un modelo murino de colonización vaginal (27).

1.3.1.3 Proteína de unión a laminina

El gen *lmb*, que se encuentra presente en casi todos los aislados humanos de *S. agalactiae*, codifica la proteína de unión a laminina (Lmb) de 43 kDa (16,31). La laminina es una glucoproteína con motivos de dedos de zinc y representa un componente esencial de la membrana basal en los tejidos de todo el cuerpo humano (16). Para unirse a esta glucoproteína, la adhesina Lmb utiliza un bolsillo de unión a zinc, que posiblemente mantiene la proteína Lmb en una conformación estructural que conduce o mejora la afinidad a la laminina (16). Cepas mutantes de *S. agalactiae* que carecen de *lmb* muestran una disminución de la adherencia a laminina humana y a células endoteliales microvasculares del cerebro (7).

1.3.1.4 Proteína de superficie de unión al plasminógeno

La proteína de superficie de unión al plasminógeno (PbsP) es una proteína de superficie de unos 40 kDa, asociada a la pared celular bacteriana, que se une al componente plasminógeno de la ECM (16,37). El gen que codifica la PbsP está presente en todas las secuencias de genomas completos de las cepas de *S. agalactiae* aisladas de humanos. La PbsP se conserva entre los principales linajes de *S. agalactiae* y es una de las principales adhesinas de plasminógeno en las cepas que no pertenecen al CC17 (38). PbsP participa en la diseminación hematogena y la invasión de la barrera hematoencefálica por *S. agalactiae* (39). Además,

PbsP es una adhesina multifuncional capaz de unirse también a vitronectina, lo que podría contribuir a su capacidad para promover la adherencia de *S. agalactiae* a las células epiteliales (39). Adicionalmente, datos aún no publicados por la Sección Biotecnología del Instituto de Salud Pública de Chile (ISPCH) muestran un aumento de 200 veces en los niveles de transcritos del gen *pbsP* respecto del grupo calibrador (cultivo *in vitro*) en un modelo murino de colonización vaginal descrito por Soto y colaboradores (2018) (40).

1.3.1.5 Pilus

Los genes que codifican el pilus en *S. agalactiae* están ubicados dentro de dos locus distintos, designados como islas de pilus 1 y 2 (PI-1 y PI-2), con dos variantes de PI-2: PI-2a y PI-2b (7). Cada PI incluye tres genes que codifican proteínas con el motivo LPXTG, que constituyen la estructura física del pilus, junto con dos genes que codifican enzimas transpeptidasas asociadas con la polimerización de las subunidades de la proteína del pilus. Las tres proteínas estructurales del pilus de *S. agalactiae* se expresan como polipéptidos precursores con un péptido señal N-terminal y una señal C-terminal de ordenamiento en la pared celular (41). Los pili son apéndices proteicos anclados a la pared celular, que contienen 3 subunidades estructurales; la proteína espinal del eje de las fimbrias (PilB), la punta de las fimbrias (PilA) y la base de las fimbrias (PilC). Cada porción tiene diferentes funciones en cuanto a colonización y virulencia. PilA puede adherirse a las células de la vagina, el pulmón y el epitelio endotelial microvascular del cerebro. Además, frente a su presencia existe menos infiltración de neutrófilos. Por otro lado, PilB contribuiría a la formación de biopelículas (16).

1.3.1.6 Proteína de unión a fibronectina

La proteína de unión a fibronectina (SfbA) es altamente conservada en aislados de *S. agalactiae* y contribuye a la invasión celular pero no a la adherencia a las células del hospedero. De hecho, SfbA participa directamente en la unión de fibronectina y en la invasión de células endoteliales microvasculares del cerebro humano (27). Modelos de infección murino con mutantes de *S. agalactiae* carentes del gen *sfbA* presenta una capacidad reducida para traspasar la barrera hematoencefálica y por consiguiente provocar una meningitis (27). Además, SfbA contribuye a la invasión de *S. agalactiae* de las células

epiteliales vaginales y cervicales. Por lo anterior, puede participar en la colonización y permanencia de *S. agalactiae* en la zona vaginal (27).

1.3.1.7 Adhesina bacteriana inmunogénica

La adhesina bacteriana inmunogénica (BibA) promueve la colonización de la mucosa y la invasión de los compartimentos circundantes. También participa en la adhesión a las células cervicales, pulmonares e intestinales, además de interferir con la inmunidad del hospedero al unirse a la proteína C4 del complemento (16).

BibA es una proteína anclada a la pared celular que es altamente conservada en aislados de *S. agalactiae* y participa en la unión de la bacteria a las células epiteliales humanas. Se han descrito cuatro variantes de BibA (I, II, III y IV). La variante IV, se asoció exclusivamente con cepas hipervirulentas (ST17) (27).

Como se detalló anteriormente, existen diversas proteínas de superficie en la especie de *S. agalactiae* que promueven o participan en los mecanismos de adhesión e invasión de células eucariontes. Diferenciadas por motivos de unión a distintos ligandos, función y motivos de anclaje a la superficie bacteriana, tal como se presenta en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Resumen de las principales proteínas de *S. agalactiae* relacionadas a la adherencia e invasión celular.

Proteína	Función	Ligando	Anclaje a la superficie celular ^{a,b}
Proteínas de unión a fibrinógeno (FbsA, FbsB y FbsC)	Adherencia y colonización (FbsA y FbsC). Invasión (FbsB). Formación de biopelícula e invasión de barreras epiteliales y endoteliales (FbsC).	Fibrinógeno	LPXTG ^{*a}
Glicoproteínas con repeticiones ricas en serina (Srr1 y Srr2)	Adherencia y persistencia (Srr1). Invasión de células endoteliales (Srr1 y Srr2).	Fibrinógeno	LPXTG ^a
Lmb	Adherencia a células endoteliales microvasculares cerebro	Laminina	LXXC/XXGC ^b
PbsP	Invasión de la barrera hematoencefálica y adherencia en células epiteliales.	Plasminógeno	LPXTG ^a
SfbA	Invasión de células endoteliales microvasculares del cerebro e invasión de células epiteliales vaginales y cervicales.	Fibronectina	Desconocido
BibA	Colonización de las mucosas.	Células epiteliales	LPXTG ^a
Pili	Adherencia a células epiteliales y endoteliales, y formación de biopelículas	Células epiteliales y endoteliales	LPXTG ^a

*Solo reportado en FbsA y FbsC. ^aMotivo de reconocimiento de las sortasas. ^bSecuencia de consenso de las lipoproteínas.

Por lo mencionado, la superficie celular es de gran importancia para la comprensión de la patogénesis bacteriana. La persistencia de *S. agalactiae* en el hospedero, así como su patogenicidad, son dependientes en gran parte de sus proteínas de superficie y por esta razón es importante el estudio de estas moléculas. Dentro de este grupo de proteínas, existe una que es altamente inmunogénica y que a la fecha se desconoce su función: la proteína inmunogénica de superficie (Sip) (31,42).

1.3.2 Proteína Inmunogénica de Superficie (Sip)

La proteína Sip es altamente conservada y está presente en todos los serotipos de *S. agalactiae* (42,43). Esta proteína de ~53 kDa está compuesta por 434 aminoácidos codificados en un marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) de 1305 nucleótidos y se encuentra localizada en la superficie celular (42,43). A partir de un análisis de la estructura primaria de esta proteína, se determinó que contiene un péptido señal de secreción y un dominio LysM (**Figura 3**). El péptido señal de secreción es escindido de la proteína madura.

10	20	30	40	50
MKMNKVLLT	STMAASLLSV	ASVQAQ	QETDT	TWTARTVSEV
KADLVKQDNK				
60	70	80	90	100
SSYTVKYGDT	LSVISEAMSI	DMNVLAKINN	IADINLIYPE	TTLTVTYDQK
110	120	130	140	150
SHTATSMKIE	TPATNAAGQT	TATVDLKTNQ	VSVADQKVSL	NTISEGMTPE
160	170	180	190	200
AATTIVSPMK	TYSSAPALKS	KEVLAQEQAV	SQAAANEQVS	PAPVKSITSE
210	220	230	240	250
VPAAKEEVKP	TQTSVSQSTT	VSPASVAAET	PAPVAKVAPV	RTVAAPRVAS
260	270	280	290	300
VKVVTPKVET	GASPEHVSAP	AVPVTTTS	PA	TDSKLQATEV
310	320	330	340	350
TATPVAQPAS	TTNAVAAHPE	NAGLQPHVAA	YKEKVASTYG	VNEFSTYRAG
360	370	380	390	400
DPGDHGKGLA	VDFIVGTNQA	LGNKVAQYST	QNMAANNISY	VIWQQKFYSN
410	420	430		
TNSIYGPANT	WNAMPDRGGV	TANHYDHVHV	SFNK	

Figura 3. Estructura primaria de la proteína Sip. Secuencia correspondiente a la proteína Q9ETV8 (Uniprot). Se destacan los residuos que comprenden el péptido señal de secreción (amarillo) y el dominio LysM (turquesa).

De acuerdo a un modelamiento en 3D del dominio LysM de la proteína Sip mediante herramientas bioinformáticas de predicción de estructuras, éste tendría una estructura $\beta\alpha\alpha\beta$, con estructuras secundarias de dos α -hélices empaquetadas por dos láminas β antiparalelas (44). Este dominio permite que la proteína Sip se ancle a la pared celular de la bacteria por unión al peptidoglicano (44). Este anclaje en el amino terminal propicia la permanencia de la proteína en la superficie bacteriana, donde es reconocida como antígeno por el sistema inmune del hospedero al ser un agonista de los receptores tipo Toll (TLR) 2 y 4 en un modelo murino (45). Reportes previos han demostrado a nivel preclínico que la proteína Sip es un

potencial blanco vacunal por ser altamente inmunogénica, además de ser un excelente blanco para la detección de *S. agalactiae* mediante PCR en tiempo real, ya que el gen *sip* está presente en todos sus serotipos y en un alto porcentaje de aislados de esta bacteria (46–49). Esta proteína demostró tener capacidad de adyuvante (45) y generar protección como vacuna oral a nivel preclínico al ser secretada como proteína heteróloga en un modelo de *Lactococcus lactis* (50). Adicionalmente, en un estudio aún no publicado por la Sección Biotecnología del ISPCH se observó un aumento en los niveles de transcritos del gen *sip* en un modelo murino de colonización, previamente descrito por Soto y colaboradores (40). La cuantificación relativa de los transcritos de *sip* por PCR en tiempo real con transcripción reversa, se realizó a 4 y 7 días post inoculación, observándose un aumento de 7 veces (día 4) y 3 veces (día 7) respecto del grupo calibrador (cultivo *in vitro*).

Considerando que a la fecha de realización de esta tesis la función de la proteína Sip es desconocida, los antecedentes moleculares disponibles, tales como el anclaje de la proteína en el peptidoglicano de la pared celular, la localización en la superficie de una fracción de la proteína y la observación de un aumento de los transcritos en un modelo de colonización, permiten preguntarse si esta proteína cumple algún rol que favorezca la permanencia de la bacteria en el hospedero, de manera similar a otras proteínas de superficie ya estudiadas. Entonces, una estrategia de mutagénesis dirigida para la delección del gen *sip* constituye un comienzo en esta línea de investigación.

1.4 Estrategias de mutagénesis en *Streptococcus agalactiae*

Las estrategias de mutagénesis dirigida son una alternativa clásica para la generación de cepas mutantes desde la década de los 80s. En esa década, se reportaron mutagénesis exitosas en cepas de *S. agalactiae* a través del uso de transposones (51,52). Luego, los vectores plasmidiales con origen de replicación termosensibles se convirtieron en una herramienta versátil y relativamente sencilla para la ejecución de ensayos de mutagénesis dirigida, aunque muy laboriosa (53). En los últimos 20 años, los protocolos de mutagénesis con vectores plasmidiales termosensibles, tales como; pHY304, pGHost9, pGHost5, pGHost8, pGCP213, pVE6007, pJRS233, pBR322-pGHost8, pTCVP y pMBSacB, han sido amplia y exitosamente utilizados para la generación de cepas mutantes de *S. agalactiae*, principalmente en estudios de genes y operones que codifican proteínas de función desconocida (34,54,63,64,55–62).

Estos vectores tienen orígenes de replicación de bajo número de copias y codificantes de proteínas termosensibles, los que al estar regulados en *trans* por el producto proteico lábil al calor, pierden actividad significativamente a temperaturas $\geq 37^{\circ}\text{C}$. Por lo tanto, cuando las bacterias que contienen estos plásmidos con estos orígenes de replicación se incuban a 37°C o más, la actividad de este origen disminuiría. A temperaturas sobre 40°C harían que la replicación del vector se perdiera por completo (65).

Por otra parte, la especificidad del locus que se requiere modificar en el genoma bacteriano está dada por las secuencias flanqueantes, las cuales deben conocerse previamente para generar la construcción que se clonará en el vector de recombinación. Estas secuencias ubicadas río arriba y río abajo del locus que se desea modificar, son conocidas como “brazos de homología”. Una vez que el vector, que posee clonada la secuencia de recombinación, es introducido en el citoplasma bacteriano a una temperatura no permisiva para la replicación del plásmido, uno de los brazos de homología hibridará con la hebra complementaria de ADN del cromosoma, lo que permitirá la inserción de toda la secuencia del vector en el genoma bacteriano por recombinación homóloga. Luego, el segundo brazo de homología hibridará con la hebra complementaria del cromosoma bacteriano generando una segunda recombinación entre la secuencia del vector y el genoma de la bacteria, generando un intercambio alélico (de secuencias) sitio específica (64).

1.4.1 Vector *pMBsacB*

pMBsacB es un derivado del vector *pHY304* que incluye un *cassette* de expresión compuesto por el promotor *p23* y el gen *sacB* de *Bacillus subtilis*, dando origen a un vector de 6,2 kb (**Figura 4**). Además, tiene un marcador de resistencia a eritromicina (*erm*) y un origen de replicación derivado del vector de amplio rango de hospederos *pWVO1* (64,66). El gen *sacB* codifica la enzima levansacarasa, que sintetiza el polímero ramificado de fructosa conocido como leván a partir del disacárido sacarosa. Se desconoce la función biológica de la levansacarasa en *B. subtilis*, pero se cree que el leván que genera cumple una función estructural o nutritiva para la bacteria (64). Notablemente, en otras especies bacterianas este polímero genera una toxicidad letal (67,68). Es posible que el mecanismo de toxicidad se deba a la acumulación intracelular o extracelular de leván, que altera las funciones moleculares normales (68).

Esta estrategia, que usa la actividad de la enzima levansacarasa como marcador de contraselección, brinda un sistema versátil para la delección/inserción de secuencias o incluso, cambios en una base en el cromosoma bacteriano (64).

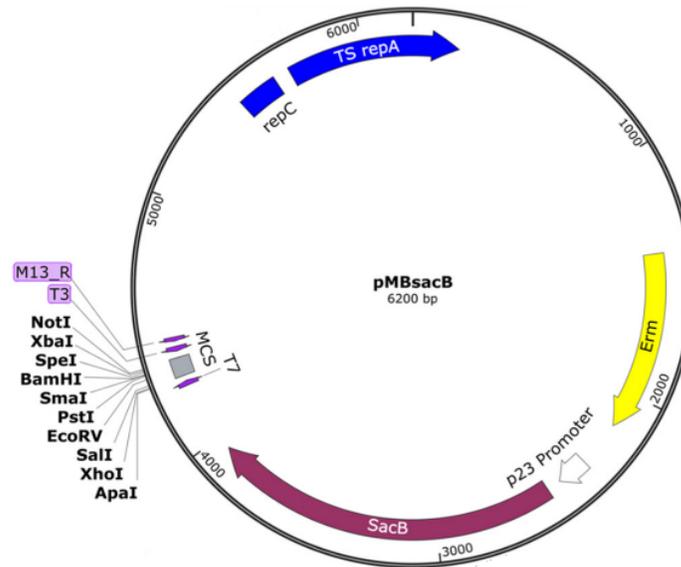


Figura 4. Esquema del vector pMBsacB. Origen de replicación: iniciador de la replicación (*repC*) y gen codificante de una proteína de inicio de replicación termosensible (*TS repA*); *Erm*: marcador de resistencia a eritromicina (23S ARNr [adenina(2058)-N(6)]-metiltransferasa *Erm(B)*); Promotor p23: promotor constitutivo fuerte; *sacB*: gen de *B. subtilis* codificante de una levansacarasa; T7: secuencia de hibridación del partidor universal T7; M13_R: secuencia de hibridación del partidor universal reverso M13; T3_R: secuencia de hibridación del partidor universal reverso T3; MCS: sitio de multiclonamiento con secuencias de reconocimientos para distintas enzimas de restricción.

Las líneas de investigación dirigidas a generar un prototipo de vacuna contra *S. agalactiae* en base a la proteína Sip para mujeres en edad fértil y/o embarazadas, su caracterización como potencial adyuvante y el desarrollo de técnicas moleculares dirigidas al gen codificante para la detección de la bacteria en mujeres gestantes, han sido ejecutadas con éxito y continúan desarrollándose en la búsqueda de profundizar el conocimiento en cada una de ellas. Sin embargo, el conocer la función de esta proteína sigue siendo una brecha en las investigaciones científicas asociadas a *S. agalactiae*, por lo que esta tesis avanzará en el entendimiento del aporte que la proteína Sip le confiere a esta bacteria.

II. HIPÓTESIS

La Proteína Inmunogénica de Superficie (Sip) de *Streptococcus agalactiae* participa en la adherencia y/o invasión celular del hospedero.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la participación de la proteína Sip de *Streptococcus agalactiae* en la adherencia e invasión de células eucariontes.

3.2 Objetivos específicos

- i) Diseñar e implementar una estrategia para eliminar el gen *sip* de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 de *S. agalactiae* mediante intercambio alélico específico.
- ii) Determinar el efecto de la delección del gen *sip* de *S. agalactiae* BIOTEC.ISPCH/2015 sobre su capacidad de adherencia e invasión de células eucariontes.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Diseño y construcción *in silico* de la secuencia de recombinación

4.1.1 Selección del genoma completo de referencia

El no disponer de la secuencia genómica de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015, implicó que las secuencias flanqueantes o brazos de homología de aquí en adelante, fueran obtenidos de alguno de los genomas ensamblados y depositados en la base de datos *GenBank* del *National Institutes of Health* de Estados Unidos (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). La estrategia consistió en utilizar la herramienta básica de búsqueda de alineación local (*BLAST*, por sus siglas en inglés) para encontrar aquellas secuencias más similares a la secuencia del gen *sip* de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 de *S. agalactiae* (*GenBank* KX363665.1). Los criterios de selección fueron separados en dos etapas: la primera, consistió en escoger las 10 secuencias con mayor porcentaje de identidad y cobertura, mientras que la segunda etapa consistió en escoger, dentro de las 10 secuencias seleccionadas en la etapa uno, el genoma de una cepa de referencia depositada en alguna colección internacional de microorganismos de referencia, como *American Type Culture Collection* (ATCC) o *National Collection of Type Cultures* (NCTC).

4.1.2 Ensamblaje *in silico* de la secuencia de recombinación

Identificadas las secuencias correspondientes a los brazos de homología río arriba y río abajo del gen *sip*, estas fueron ensambladas al ORF del gen *cat* que codifica la cloranfenicol acetiltransferasa (*GenBank* NC_010558.1). Se añadieron las secuencias nucleotídicas para los sitios reconocidos por las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI* en los extremos 5' y 3' (**Figura 5**), respectivamente, y se verificó *in silico* que la construcción final no incluyera en su secuencia interna sitios de restricción reconocidos por dichas enzimas mediante la herramienta *Restriction Analyzer* (<https://molbiotools.com/restrictionanalyzer.php>).

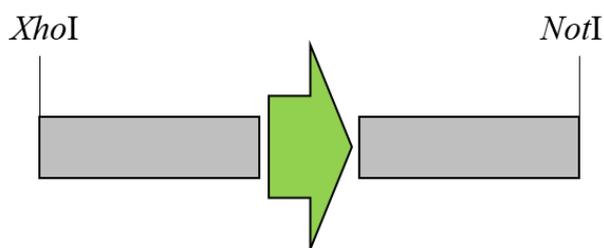


Figura 5. Esquema de la construcción *in silico* de la secuencia de recombinación. Gris: brazos de homología río arriba y río abajo del gen *sip*; verde: ORF del gen *cat* con secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción *XhoI* (extremo 5') y *NotI* (extremo 3').

4.1.3 Síntesis de la secuencia de recombinación

La secuencia de la construcción final, compuesta por los brazos de homología flanqueando al ORF del gen *cat*, fue enviado en formato FASTA a la empresa *GenScript* (<https://www.genscript.com/>) para su síntesis y clonamiento en el vector pUC57-Mini (**Figura 6**).

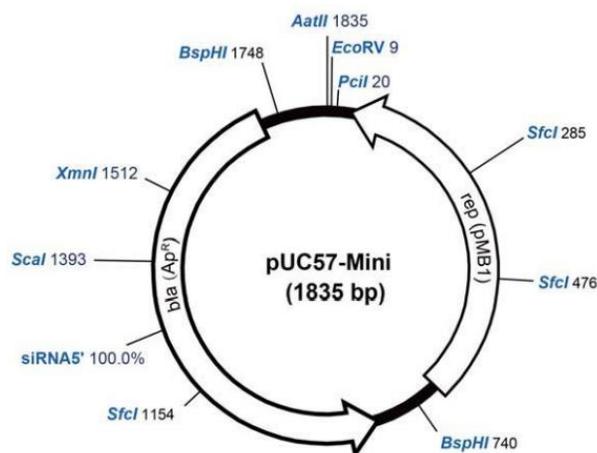


Figura 6. Mapa del vector pUC57-Mini. *rep*(pMB1): origen de replicación; *bla* (Ap^R): gen codificante de una β -lactamasa de Clase A tipo TEM variante 1, que confiere resistencia a ampicilina.

4.1.4 Obtención de un vector para recombinación homóloga

El vector (pMBsacB) utilizado para la mutagénesis de *sip* fue desarrollado por el Dr. Adam J. Ratner y colaboradores en la Universidad de New York, USA. Los autores de la publicación Hooven y colaboradores (2019) donaron a la Sección de Biotecnología del ISPCH una alícuota del vector purificado a una concentración de 220 ng/ μ l (64). Este

material fue mantenido a -20°C y a partir del mismo se realizaron los ensayos que dieron lugar a esta investigación.

4.2 Obtención de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 de *S. agalactiae* mutante sip

*4.2.1 Cepa BIOTEC.ISPCH/2015 de *S. agalactiae**

Esta cepa fue aislada de un paciente Chileno menor a un año que presentaba un cuadro clínico de sepsis. Es una cepa β -hemolítica, serotipo III y ST17 (CC17), según análisis genético por MLST.

*4.2.2 Obtención de *Escherichia coli* DH5 α quimiocompetentes*

A partir de un respaldo mantenido a -80°C , se inoculó con una asa la bacteria en 3 ml de caldo Luria Bertani (LB) estéril y posteriormente se incubó a 37°C por 16-18 horas con agitación a 220 rpm. Posteriormente, se realizó una dilución 1:100 de este cultivo en 100 ml del mismo caldo y se incubó a 37°C con agitación a 220 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) entre 0,4-0,6. Luego, a partir de los 100 ml de cultivo, se obtuvo el sedimento bacteriano por centrifugación a $4024 \times g$ por 10 minutos a 4°C en 2 tubos Falcon de 50 ml, previamente enfriados. Seguidamente, se resuspendió el sedimento bacteriano en 20 ml de CaCl_2 0,1 M frío, manteniéndose en hielo durante 1 hora. Nuevamente, se centrifugaron las bacterias a $4024 \times g$ por 10 minutos a 4°C y, al interior de un gabinete de bioseguridad, se descartó el sobrenadante, dejándose los tubos en posición invertida por 1 a 2 minutos para permitir que el medio de cultivo remanente escurriera totalmente. Luego, se resuspendió el sedimento bacteriano en 0,5-1 ml de CaCl_2 0,1 M frío por cada 50 ml de cultivo original y se mantuvo en hielo por 18-24 horas. Finalmente, se alicuotaron las células competentes en volúmenes de 50 μl con una concentración final de glicerol del 20% y se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

*4.2.3 Transformación de *E. coli* DH5 α con vector pMBSacB*

Se agregó 1-5 μl de ADN plasmidial (0,5-1 μg) en 50 μl de bacterias *E. coli* DH5 α quimiocompetentes previamente descongeladas y mantenidas en hielo durante este paso. Se dejaron en hielo sin agitación por 30 minutos y se realizó una incubación a 42°C por 60 segundos. Inmediatamente después, se resuspendieron las bacterias en 950 μl de caldo LB y

se incubaron a 30°C por 2 horas con agitación a 220 rpm. Posteriormente, se sembraron 100 µl de la suspensión bacteriana en placas de agar LB suplementado con 300 µg/ml de eritromicina, las que se incubaron a 30°C por 24-36 horas. Luego, se sembraron las colonias transformantes en 3 ml de caldo LB suplementado con 300 µg/ml de eritromicina, seguido de una incubación a 30°C por 24-48 horas. A continuación, se sembraron con asa estéril los cultivos en placas de agar LB suplementado con 300 µg/ml de eritromicina y se incubaron a 30°C por 18-24 horas. Finalmente, con una tórula estéril se recuperó el cultivo en abundancia, se suspendió en caldo tripticasa de soya suplementado con glicerol al 20% y 300 µg/ml de eritromicina y se mantuvo a -80°C como respaldo.

4.2.4 Transformación de *E. coli* DH5α con vector pUC57-MutSIP

Se agregó 1-5 µl de ADN plasmidial (0,1-0,5 µg) en 50 µl de bacterias *E. coli* DH5α quimiocompetentes, previamente descongeladas y mantenidas en hielo durante este paso. Se dejaron en hielo sin agitación por 30 minutos y se realizó una incubación a 42°C por 60 segundos. Inmediatamente después, se resuspendieron las bacterias en 950 µl de caldo LB y se incubaron a 37°C por 1 hora con agitación a 220 rpm. Posteriormente, se sembraron 100 µl de la suspensión bacteriana en placas de agar LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, las que se incubaron a 37°C por 16-18 horas. Luego, se sembraron las colonias transformantes en 3 ml de caldo LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron a 37°C por 16-18 horas. Seguido a este paso, se sembraron los cultivos en placas de agar LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron a 37°C por 18-24 horas. Finalmente, con una tórula estéril se recuperó el cultivo en abundancia, se suspendió en caldo tripticasa de soya suplementado con glicerol al 20% y 100 µg/ml de ampicilina y se mantuvo a -80°C como respaldo.

4.2.5 Purificación de ADN plasmidial

A partir de las bacterias transformadas de acuerdo a lo especificado en los puntos 4.2.3 y 4.2.4, se purificó el ADN plasmidial usando el sistema comercial *EZNA Plasmid DNA Mini Kit I* (Omega Bio-tek) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Previamente, se inoculó la cepa de *E. coli* DH5α transformada con el vector pUC57-MutSIP en 5 ml de caldo LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y se incubó a 37°C por 16-18 horas con agitación

a 220 rpm. Por otro lado, se inoculó la cepa de *E. coli* DH5 α transformada con el vector pMBSacB en 5 ml de caldo LB suplementado con 300 $\mu\text{g/ml}$ de eritromicina y 3 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol¹ y se incubó a 30°C por 48 horas con agitación a 220 rpm. Para ambos cultivos bacterianos, se centrifugó a 4024 x g por 10 minutos y posteriormente se descartó el sobrenadante. Luego, se resuspendió el sedimento bacteriano en 250 μl de la “Solución I” suplementada con ARNasa. Seguidamente, se añadieron 250 μl de la “Solución II” y se agitó cada tubo con la mezcla hasta observar una suspensión más clarificada. Posteriormente, se agregaron 350 μl de la “Solución III” hasta observar un precipitado. Se centrifugaron las mezclas a 13000 x g por 10 minutos y luego se transfirieron 850 μl de cada sobrenadante a una columna del sistema comercial. Nuevamente, se centrifugaron a 13000 x g por 1 minuto y se descartaron los filtrados. Se agregaron 500 μl del tampón HBC y se centrifugó a 13000 x g por 1 minuto, para luego descartar el filtrado. En seguida, se agregaron 700 μl de la “Solución de Lavado” y se centrifugó a 13000 x g por 1 minuto. Se repitió el proceso de lavado y se centrifugó a 15000 x g por 2 minutos para eliminar remanentes de la “Solución de Lavado”. Finalmente, las columnas se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, se agregaron 50 μl de la “Solución de Elusión” a cada columna y se centrifugó a 15000 x g por 1 minuto.

4.2.6 Subclonamiento

Se realizó una doble digestión con las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI* (New England Biolabs) a los vectores pUC57-MutSIP y pMBSacB purificados en el punto 4.2.5, mediante una mezcla con 4 μl de tampón 3.1, 1 μl de cada enzima y 1 μg de ADN plasmidial, en un volumen final de 40 μl . Se incubaron las mezclas a 37°C por 16 horas y posteriormente se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% con un marcador de ADN Lambda/*HindIII* (Thermo Scientific). El vector pMBSacB linealizado (6,1 kb) y el inserto (2,5 kb) resultantes, fueron recuperados y purificados desde el gel de agarosa usando el sistema comercial *PureLink Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen). Para esto, se visualizaron los productos de la doble digestión enzimática en el gel de agarosa en un transiluminador UV

¹ El uso de cloranfenicol, a una concentración subinhibitoria, inhibe la síntesis de proteínas de la bacteria, y por lo tanto, disminuye la replicación del cromosoma. Sin embargo, la replicación del plásmido es independiente de las proteínas recién sintetizadas y continúa durante varias horas hasta alcanzar de 2000 a 3000 copias.

y se cortaron trozos de gel que contenían las bandas de interés y se transfirieron los trozos de agarosa en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Luego, se agregó el tampón L3 en relación 3:1 respecto a la masa de los trozos de gel (e.g., a 400 mg de gel se le agregó 1,2 ml de tampón L3), y se incubaron a 50°C por 10 minutos, agitando suavemente cada 3 minutos. Una vez fundida la agarosa, se agregaron alícuotas de 850 µl a una columna de purificación y se centrifugaron a 12000 x g por 1 minuto. Se eliminaron los filtrados, se añadieron 500 µl de la solución de lavado y se centrifugaron a 12000 x g por 1 minuto. Se eliminaron los filtrados y se agregaron 50 µl de tampón de elusión a cada columna. Cada purificado fue cuantificado en un equipo *Nanodrop* (Thermo Scientific) usando dos longitudes de onda: 260 y 280 nm. Inmediatamente después, se realizó la etapa de clonamiento del inserto en el vector mediante ligación con una ADN ligasa T4 (New England Biolabs). Se preparó una mezcla de ligación con 2 µl de tampón de ligación, 1 µl de ADN ligasa T4 y una mezcla del inserto y vector en relación 3:1 (0,078 pmoles y 0,026 pmoles, respectivamente). Este cálculo se realizó utilizando la herramienta informática *NEBioCalculator* (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>). Posteriormente, se incubó la mezcla de ligación a 16°C por 1 hora y se inactivó a 65°C por 10 minutos. Finalmente, se transformaron bacterias *E. coli* DH5α quimiocompetentes con el producto de ligación siguiendo el procedimiento detallado en el punto 4.2.3. De esta forma se generó el vector de recombinación pMBSacB-MutSIP.

4.2.7 Transformación de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 de *S. agalactiae*

El procedimiento para la preparación de las células electrocompetentes de *S. agalactiae* corresponde a un protocolo modificado desde Hooven y colaboradores (2019) (64). Brevemente, a partir del respaldo a -80°C de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 de *S. agalactiae* se sembró una placa de agar tripticasa de soya suplementado con 5% de sangre de cordero y se incubó a 37°C por 18-24 horas. Luego, se sembró una colonia β-hemolítica en 5 ml de caldo Todd-Hewitt (TH), incubándose a 37°C por 16-18 horas con agitación a 220 rpm. El cultivo obtenido fue utilizado para inocular 50 ml de caldo TH suplementado con 0,5% de glucosa, 0,6 % de glicina y 25% de polietilenglicol 6000 (PEG-6000) y se incubó a 37°C por 18-24 horas con agitación a 220 rpm. Posteriormente, se diluyeron los 50 ml de cultivo en 130 ml del mismo medio precalentado a 37°C y se incubó a esta temperatura con agitación a

220 rpm por 1 hora. Luego, se obtuvo el sedimento bacteriano de todo el contenido mediante una centrifugación a 3500 x g por 10 minutos. Se lavó el sedimento bacteriano dos veces con una solución de PEG-6000 al 25% m/m en glicerol al 10% v/v, realizándose este paso en hielo. Seguidamente, se resuspendieron las bacterias en 1 ml de la solución de lavado y se alicuotaron en volúmenes de 40 µl, los que se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

El procedimiento de electroporación realizado correspondió a un protocolo modificado desde Holo y Nes (1989) y Framson y colaboradores (1997) (69,70). Se mezclaron 40 µl de bacterias (*S. agalactiae* BIOTEC.ISPCH/2015) electrocompetentes con 1 µg de ADN plasmidial (pMBSacB-MutSIP). Se introdujo la mezcla en cubetas de electroporación de 2 mm y se aplicó un pulso de 2 kV por 4,5 a 5 ms. Inmediatamente después, las bacterias se resuspendieron en 960 µl de medio TH suplementado con MgCl₂ 20 mM (concentración final) y CaCl₂ 2 mM (concentración final) y se mantuvieron en hielo por 5 minutos. Seguidamente, se incubaron las suspensiones bacterianas a 30°C por 3 horas con agitación a 220 rpm. Luego, se sembraron 100 µl de las suspensiones bacterianas en placas de agar tripticasa de soya suplementado con 5% de sangre de cordero y 1 µg/ml de eritromicina. Las placas fueron incubadas a 30°C por 24-48 horas.

4.2.8 Mutagénesis

La estrategia de mutagénesis sitio dirigida utilizada en este estudio para escindir el ORF del gen *sip*, requirió en primera instancia la inserción del vector pMBSacB-MutSIP en el cromosoma bacteriano. Este primer evento de recombinación (primer entrecruzamiento) ocurrió al cultivar la bacteria transformada con el vector a una temperatura no permisible para la replicación del vector. En este paso, y durante el proceso de replicación del ADN cromosomal, uno de las secuencias denominadas como brazos de homología se une por complementariedad al cromosoma, generándose la inserción total del vector (pMBSacB-MutSIP). Luego, para la escisión total del vector y la generación del alelo mutante (segundo entrecruzamiento), se realizaron cultivos bacterianos a temperaturas permisibles para la replicación del vector. Este evento, al igual que en el primer entrecruzamiento, ocurre cuando el segundo brazo de homología se une por complementariedad a su secuencia homóloga en el cromosoma. Finalmente, la contraselección con sacarosa, permitió seleccionar las colonias candidatas con la mutagénesis requerida: intercambio entre los ORFs de los genes *sip* y *cat*.

Estos ensayos se realizaron de acuerdo a un protocolo modificado desde Hooven y colaboradores (2019) (64).

4.2.8.1 *Generación del primer entrecruzamiento*

Se inocularon 20 ml de caldo TH suplementado con 5 µg/ml de eritromicina con una colonia de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 de *S. agalactiae* transformada con el vector pMBSacB-MutSIP y se incubó a 28°C por 18-24 horas con agitación a 220 rpm. Se realizó una dilución 1:100 en el mismo medio de cultivo durante 3 días consecutivamente, usando la misma temperatura y el mismo tiempo de incubación. Luego, a partir del último traspaso se realizó una dilución 1:100 en caldo TH y se incubó a 40°C por 18-24 horas con agitación a 220 rpm, repitiendo este paso durante 3 días consecutivamente, usando la misma temperatura y el mismo tiempo de incubación. A partir del último traspaso, se realizaron diluciones seriadas² 1:10 en suero fisiológico, las que se sembraron en placas de agar TH suplementado con 5 µg/ml de eritromicina y se incubaron a 40°C por 18-24 horas. Seguidamente, se sembraron colonias en 3 ml de caldo TH suplementado con 5 µg/ml de eritromicina y se incubaron a 40°C con por 5 horas con agitación a 220 rpm. De los cultivo bacterianos, se tomó 1 ml y se centrifugó a 13000 x g por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Luego, se agregaron 100 µl de agua bidestilada libre de nucleasas y se resuspendió el sedimento bacteriano. Se añadieron 10 µl de lisozima (5 mg/ml) y 10 µl de proteinasa K (2 mg/ml) y la mezcla se incubó a 37°C por 10 minutos, seguido de una incubación a 56°C por 10 minutos y un paso de inactivación a 95°C por 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó la mezcla a 13000 x g y se utilizó el sobrenadante como templado para la confirmación del primer entrecruzamiento mediante una reacción de PCR usando los partidores sip_farout_F y pMBSacB_MCS (como se describe en el punto 4.3.2.1).

4.2.8.2 *Ensayo de sensibilidad a sacarosa*

Se tomaron 100 µl de un cultivo en caldo TH suplementado con 5 µg/ml de eritromicina obtenido a partir de aquellas colonias con PCR positivo para el primer entrecruzamiento. Se realizó una dilución 1:50 en caldo TH suplementado con 5 µg/ml de eritromicina (dos tubos

² Se realizan diluciones seriadas para obtener colonias aisladas. Esto permite analizar y posteriormente seleccionar solo aquellas colonias que contengan el genotipo positivo para el primer entrecruzamiento.

por cada colonia candidata) y se incubaron a 40°C con agitación a 220 rpm hasta llegar a la fase exponencial de crecimiento (OD_{600nm}: 0,4-0,6). Luego, se agregó sacarosa 2 M (0,75 M concentración final) a una de las réplicas y el mismo volumen de agua en la segunda réplica y se incubaron a 40°C por 2 horas con agitación a 220 rpm. Seguidamente, se realizaron diluciones seriadas 1:10 en suero fisiológico de cada réplica y se sembraron en placas de agar TH suplementado con 5 µg/ml de eritromicina y se incubaron a 40°C por 18-24 horas. Finalmente, se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (UFC). La sensibilidad a sacarosa se determinó mediante una cuantificación relativa entre las UFC/ml obtenidas desde el conteo de colonias de los ensayos con y sin sacarosa.

4.2.8.3 *Generación del segundo entrecruzamiento*

Para el segundo entrecruzamiento, se escogió una colonia con PCR positivo para el primer entrecruzamiento y demostrada sensibilidad a sacarosa. Con esta colonia se inocularon 20 ml de caldo TH sin antibióticos y se incubó a 28°C por 18-24 horas con agitación a 220 rpm. Se realizó una dilución 1:100 en el mismo medio de cultivo durante 3 días consecutivamente, a la misma temperatura y el mismo tiempo de incubación. Luego, a partir del último traspaso, se realizó una dilución 1:100 en 20 ml de caldo TH suplementado con 0,75 M de sacarosa y se incubó a 40°C por 18-24 horas con agitación a 220 rpm, repitiendo este paso durante 3 días consecutivamente, a la misma temperatura y el mismo tiempo de incubación. Finalmente, se realizaron diluciones seriadas 1:10 en suero fisiológico y éstas se sembraron en placas de agar TH suplementado con 0,75 M de sacarosa y se incubaron a 40°C por 18-24 horas. Las colonias resultantes se analizaron mediante reacciones de PCR usando las distintas combinaciones de partidores descritas en el punto 4.3.2.1.

4.3 Caracterización molecular y microbiológica de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 de

***S. agalactiae* mutante sip**

4.3.1 Identificación de la proteína Sip

4.3.1.1 Ensayo de flujo lateral para detección de la proteína Sip

De acuerdo a las instrucciones del fabricante del sistema *StrepB* (aún no comercializado), que detecta la presencia de la proteína Sip mediante una inmunocromatografía con anticuerpos monoclonales contra dicha proteína, se realizó una suspensión de 5 colonias de

S. agalactiae en 250 µl de la solución A y luego se agregaron 250 µl de la solución B. De la mezcla, se cargaron 100 µl en el *cartridge* de inmunocromatografía *StrepB*. Finalmente, se realizó la lectura a los 10 minutos. Como control positivo, se utilizó una suspensión bacteriana de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 de *S. agalactiae* silvestre.

4.3.1.2 Western blot

A partir de un cultivo bacteriano saturado de las cepas de *S. agalactiae* BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre y mutante *sip* en 5 ml de caldo infusión cerebro y corazón (BHI, por sus siglas en inglés), se centrifugó a 4000 x g para obtener el sedimento bacteriano. Luego, se resuspendieron las bacterias en 250 µl de una solución de lisado de RIPA (NaCl 150 mM; EDTA 0,5 M; Tris-HCl 0,5 mM pH: 8,0; NP40 1%; desoxicolato de sodio 0,1%; SDS 0,1%; pH: 8,0) suplementado con 1 mg/ml de lisozima y se incubó a 37°C por una hora. Se realizó una cuantificación de proteínas totales mediante la técnica de ácido bicinoninico (BCA, por sus siglas en inglés) de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Thermo Fisher). Del lisado, se tomaron 40 µl (50 µg de proteínas) y se le agregaron 8 µl de buffer de carga Laemmli 6X (Tris base 375 mM, SDS 9%; glicerol 50%; azul de bromofenol 0,03%; β-mercaptoetanol 9 %). Seguidamente, las muestras fueron incubadas a 95°C por 10 minutos en un termociclador. Posteriormente, se cargaron las proteínas en los pocillos de dos geles desnaturantes de poli(acrilamida) al 12% (réplicas), los que se sometieron a electroforesis con un tampón de corrida Tris-glicina-SDS pH: 8,4, de acuerdo a las siguientes condiciones: 15 minutos a 100 V y 65 minutos a 170 V. Luego, un gel fue teñido con una solución de azul de Coomassie al 0,25% (azul de Coomassie 0,25 %; ácido acético glacial 10% v/v; metanol 50% v/v) por 15 minutos con una agitación constante de 60 rpm. Seguido, se destiñó el gel con una solución de ácido acético (ácido acético glacial 7% v/v; metanol 45% v/v) con agitación hasta obtener la descoloración deseada. Las proteínas contenidas en el segundo gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a través de transferencia húmeda a una corriente fija de 350 mA por 40 minutos, utilizando hielo para evitar sobrecalentamiento de la solución amortiguadora. Seguidamente, la membrana fue teñida con una solución de rojo Ponceau al 2% para confirmar la transferencia de las proteínas desde el gel. Luego, la membrana fue bloqueada con una solución de leche descremada al 10% en TBS suplementado con Tween 20 al 0,1% v/v (TTBS) con agitación 60 rpm por 1 hora.

Posteriormente, la membrana fue lavada 3 veces en TTBS por 10 minutos con agitación a 60 rpm. Inmediatamente después, se incubó la membrana con el anticuerpo primario policlonal anti-rSip obtenido desde conejo y diluido 1:4000 con TTBS y leche al 5%, por 18-24 horas a 4°C con una agitación constante de 40 rpm. Posteriormente, se lavó la membrana 3 veces en TTBS por 10 minutos con agitación a 60 rpm. Luego, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a HRP (Bio-Rad) diluido 1:5000 en TTBS con leche al 5%, por 1 hora a temperatura ambiente con una agitación constante de 60 rpm. Seguido, se lavó 3 veces la membrana en TTBS por 10 minutos con una agitación constante de 60 rpm. Finalmente, la membrana fue revelada utilizando 8 ml de *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad) y dejado en oscuridad por 5 minutos, para luego documentar las imágenes seriadas cada 30 segundos de exposición a una resolución estándar (96 ppp) en un fotodocumentador de quimioluminiscencia, MicroChemi 4.2 (DNR Bio).

4.3.2 Caracterización genética

4.3.2.1 PCR convencional

Todas las reacciones de PCR convencional de esta tesis fueron realizadas utilizando el sistema comercial *OneTaq DNA Polymerase* (New England Biolabs), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se consideró una mezcla con 5 µl de *5X OneTaq Standard Reaction Buffer*; 0,5 µl de dNTPS 10 mM; 0,5 µl de cada partidor 10 µM (**Tabla 2**) y 0,125-0,25 µl de *OneTaq DNA Polymerase*. El perfil térmico de amplificación fue realizado de acuerdo a: denaturación inicial a 94°C por 30 segundos; 35 ciclos de denaturación a 94°C, hibridación a 50-55°C por 45 segundos y extensión a 68°C por 0,5-4 minutos (considerando 1 minuto por cada kb del producto esperado).

Las colonias candidatas con la mutagénesis fueron evaluadas mediante PCR convencional con los partidores Sag59/Sag190, SIP_DE2-F/SIP_DE2-R y F_insert/R_insert (**Tabla 2**). Las cepas BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre y ATCC12403 de *S. agalactiae* fueron utilizadas como controles positivos en las tres reacciones.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Partidor	Secuencia (5' - 3')	Descripción	Referencia
Sag59	GTTCCCTGAACATTATCTTTGAT	Amplificación por PCR del gen <i>cfb</i> , específico para la especie <i>S. agalactiae</i> (154 pb)	(71)
Sag190	TTTACCAGCTGTATTAGAAGTA		
SIP-F	GTTCCAGCAGCTAAAGAGGAAG	Amplificación por PCR del gen <i>sip</i> (118 pb).	(48)
SIP-R	CCGGTGCTACTTTAGCTACTGG		
SIP_DE2-F	CCCTAGAGTGGCAAGTGTTAAA	Amplificación por PCR el gen <i>sip</i> (559 pb) para confirmar la delección del gen.	Este estudio
SIP_DE2-R	TGATACGTGAACGTGGTCATAG		
F_insert	CCAGTAAAGTGTGATATTATAGTCTCGG	Amplificación por PCR para confirmar la escisión del ORF del gen <i>sip</i> en el cromosoma bacteriano.	Este estudio
R_insert	GGCATATAAAAAAGAAGCCAAATAGCTTCC		
sip_farout_F	GCAAGTTCCTTAGTTGTTTTAGG	Amplificación por PCR para confirmar la inserción del vector pMBSacB-MutSIP en el cromosoma bacteriano.	Este estudio
sip_farout_R	TGTTGCAGCTCCGAGGCCAAAAACC		
pMBSacB_MCS	CAATACGCAAACCGCCTCTC		

Nota: Los partidores fueron diseñados utilizando la herramienta *PrimerQuest Tool* y evaluados *in silico* mediante *OligoAnalyzer* (<https://www.idtdna.com/pages>).

4.3.2.2 Secuenciación masiva

La secuenciación de los genomas completos de las cepas de *S. agalactiae* BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre y mutante *sip* se realizó mediante la plataforma *Illumina NextSeq 2000*. Las lecturas fueron procesadas con la herramienta *Trimmomatic v0.39*, excluyéndose aquellas con una calidad inferior a 30 en escala *Phred*. Los genomas fueron ensamblados *de novo* con *SPAdes v3.13.0* y la calidad de los ensamblajes generados fue evaluada con *QUAST v5.0.2*. A partir de los *contigs* generados, se utilizó el programa *SnapGene Viewer 6.0* para visualizar y buscar las secuencias de interés y se realizaron alineamientos múltiples de los genomas con los programas *Mauve v2.4.0* y *Mulan* (<https://mulan.dcode.org/>). Adicionalmente con la herramienta *ClustalW* contenida en el programa *Bioedit v7.0.5.3*, se realizaron alineamientos múltiples de secuencias cortas correspondientes al locus del gen *sip*. Finalmente, el ADN insertado en el genoma de la cepa mutante fue analizado mediante alineamientos locales con la herramienta *Blastn*.

4.3.3 Caracterización microbiológica

4.3.3.1 Test de CAMP

Desde un cultivo fresco en placa de agar tripticasa de soya suplementado con 5% de sangre de cordero de la cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*, se tomaron 3-5 colonias con

una asa redonda y se sembró un estriado a lo largo de una placa de agar tripticasa de soya suplementado con 5% de sangre de cordero. Luego, a partir de un cultivo fresco en placa de agar tripticasa de soya suplementado con 5% de sangre de cordero de las cepas BIOTEC.ISPCH/2015 de *S. agalactiae* silvestre y mutante *sip*, se tomaron 3-5 colonias β -hemolíticas con un asa redonda y se sembró un estriado de manera perpendicular al primer estriado con *S. aureus* en la placa. Se incubó la placa a 37°C por 18-24 horas y posteriormente se realizó la lectura de la presencia o ausencia hemólisis generada. Como control negativo se utilizó la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

4.3.3.2 Susceptibilidad antimicrobiana

Las determinaciones de susceptibilidad a antimicrobianos se realizaron de acuerdo a las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Brevemente, desde un cultivo fresco de las cepas BIOTEC.ISPCH/2015 de *S. agalactiae* silvestre y mutante *sip*, se tomaron colonias con una asa redonda y se inocularon 4,5 ml de suero fisiológico estéril hasta establecer una suspensión de bacterias de 0,5 Unidades McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/ml). Dentro de los siguientes 15 minutos, se sembraron los inóculos en placas de agar Müller-Hinton suplementado con 5% de sangre de cordero en tres direcciones para formar un césped bacteriano que cubriera toda la superficie del medio. Se dejó secar por 3-10 minutos y, con ayuda de una pinza esterilizada, se colocaron los discos de papel y tiras plásticas estériles con antibióticos. Los antibióticos utilizados se detallan en los puntos 4.3.3.2.1 y 4.3.3.2.2.

4.3.3.2.1 Susceptibilidad por método de difusión en agar

Las placas de agar Müller-Hinton suplementado con 5% de sangre de cordero que contenían discos de papel de 6 mm estériles e impregnados con antibióticos; penicilina (10 μ g), tetraciclina (30 μ g), ofloxacino (5 μ g), levofloxacino (5 μ g), vancomicina (30 μ g), eritromicina (15 μ g) y clindamicina (2 μ g), se incubaron a 35°C \pm 2°C por 18-24 horas. Finalmente, la lectura del diámetro de los halos de inhibición se realizó con un pie de metro y la interpretación se realizó de acuerdo a la Tabla 2H-1 de la guía M100 del CLSI (Anexo 1).

4.3.3.2 Susceptibilidad por método de difusión-dilución (epsilometría)

Las placas de agar Müller-Hinton suplementado con 5% de sangre de cordero que contenían tiras plásticas estériles e impregnadas con un gradiente exponencial continuo de los antibióticos penicilina (0,002-32 µg/ml) y ceftriaxona (0,002-32 µg/ml) se incubaron a 35°C ± 2°C por 18-24 horas. Finalmente, para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM), se determinó visualmente el borde de la elipse de inhibición que interseca longitudinalmente la tira de cada antibiótico y la interpretación se realizó de acuerdo a la Tabla 2H-1 de la guía M100 del CLSI (Anexo 1).

4.3.3.3 Aglutinación en látex

En base a las indicaciones del fabricante del sistema comercial *The Oxoid Streptococcal Grouping Kit* (Oxoid), se seleccionaron 2-5 colonias y se emulsionaron en la preparación enzimática del kit para el proceso de extracción. Luego, se incubaron durante 10 minutos a 37°C en baño María, con una agitación vigorosa durante 2-3 segundos cada 5 minutos, para luego continuar con la incubación. Posteriormente, se dispuso 1 gota del reactivo correspondiente a los anticuerpos específicos contra el antígeno B de la pared celular de *S. agalactiae* conjugados con látex, en los anillos circulares de la tarjeta de reacción. Seguidamente, se agregó 1 gota de extracto sobre la gota de látex contenida en el anillo de papel. Luego, con una varilla de madera, se mezcló y esparció la mezcla dentro del contorno del anillo de papel. Finalmente, tras mover la tarjeta con la mezcla de forma oscilante, se realizó la lectura de la ausencia o presencia de aglutinación en menos de 30 segundos para evitar falsos positivos.

4.3.3.4 Cinética de crecimiento

A partir de los respaldos de las cepas BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre y mutante *sip* mantenidos a -80°C, se sembró cada cepa en una placa de agar tripticasa de soya suplementado con 5% de sangre de cordero y se incubaron a 37°C por 18-24 horas. Confirmada la pureza del cultivo mediante la observación macroscópica de colonias β-hemolíticas, se inoculó una colonia de cada cepa por separado en 5 ml de BHI y luego se incubaron estos cultivos a 37°C con agitación a 220 rpm durante 18-24 horas. Posteriormente, se inocularon 2 ml de cada cultivo crecido en 200 ml de BHI, incubándose

a 37°C con agitación a 220 rpm durante 5-6 horas. Se realizaron lecturas de las densidades ópticas a OD_{600nm} cada 20 minutos en duplicado por cultivo. Este ensayo se repitió en días diferentes para obtener un total de 4 mediciones por cada tiempo evaluado.

4.4 Evaluación de la capacidad de adherencia e invasión de la cepa mutante *sip* en la línea celular HeLa

La línea celular HeLa de epitelio de adenocarcinoma cervical humano, fue mantenida en subcultivos en Medio Esencial Mínimo (MEM) (Sigma) suplementado con 1% de penicilina-streptomina 10,000 U/ml (Gibco) y un 1% de suero fetal bovino (previamente inactivado a 56°C por 30 minutos) e incubada a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂. Los subcultivos se llevaron a cabo en botellas de 75 ml hasta llegar a una confluencia del 90%, de acuerdo a lo observado por microscopía óptica. Para la realización de todos los ensayos de adherencia e invasión celular, se confirmó por microscopía óptica que las células estuviesen adheridas a la placa de polipropileno de 24 pocillos, y se realizaron 3 lavados con 2 mL con PBS. Luego, los ensayos de adherencia e invasión celular se realizaron con 200 mil células/pocillo de la línea celular HeLa en 1 ml de medio MEM (Sigma) en ausencia de suero fetal bovino y penicilina-streptomina (Gibco).

4.4.1 Ensayo de adherencia celular en modelo in vitro en la línea celular HeLa

Se crecieron las cepas BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre y mutante *sip* en 5 ml de BHI a 37°C con agitación a 220 rpm durante 18-24 horas. Luego, se inocularon 4950 µl de BHI con 50 µl del cultivo previamente crecido y se incubó en las mismas condiciones del cultivo primario hasta alcanzar una OD_{600nm} entre 0,4-0,6. Posteriormente, se ajustó la suspensión bacteriana a 0,5 Unidades McFarland usando suero fisiológico estéril. Seguidamente, se agregaron 13,3 µl de la suspensión bacteriana ajustada a 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) en cada pocillo de una placa de 24 pocillos que contenía 2×10^5 células/pocillo de la línea celular HeLa (contenidas en 986,7 µl de MEM), estableciéndose una MOI de 1:10 (células/bacterias). La placa de cultivo celular se incubó por 2 horas a 37°C con 5% de CO₂. Los pocillos de la placa se lavaron 3 veces con PBS y luego se añadieron 100 µl de solución 0,5% Tripsina-EDTA 10X (Gibco) y se incubó a 37°C por 5 minutos. Seguidamente, se observó el desprendimiento de la monocapa de la línea celular desde cada pocillo de la placa en un microscopio óptico y

luego se agregaron 200 μ l de Tritón X-100 0,05% preparado en PBS. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas 1:10 en suero fisiológico y se sembraron 100 μ l en placas de agar tripticasa de soya suplementado con 5% de sangre de cordero, incubándose a 37°C por 18-24 horas. Finalmente, se realizó un recuento de colonias en la dilución más baja que contuviera entre 10 y 100 UFC. El cálculo de porcentaje de adherencia se realizó mediante el conteo de colonias recuperadas desde el ensayo, para luego realizar la conversión de estas a UFC/ml mediante la multiplicación del factor de dilución en la placa del recuento y de volumen de siembra (100 μ l) (número de colonias $\times 10^{(\text{dilución})} \times 10$). Luego, el resultado obtenido fue utilizado para obtener el porcentaje de adherencia, considerando como un 100% las 2×10^6 UFC/ml inoculadas inicialmente en el cultivo celular.

4.4.2 Ensayo de invasión celular en modelo *in vitro* en la línea celular HeLa

Se crecieron las cepas BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre y mutante *sip* en 5 ml de caldo BHI a 37°C a 220 rpm durante 18-24 horas. Luego, se inocularon 4950 μ l de BHI con 50 μ l del cultivo previamente crecido y se incubó en las mismas condiciones del cultivo primario hasta alcanzar una $OD_{600\text{nm}}$ entre 0,4-0,6. Posteriormente, se ajustó la suspensión bacteriana a 0,5 Unidades McFarland usando suero fisiológico estéril. Seguidamente, se agregaron 13,3 μ l de la suspensión bacteriana ajustada a 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) en cada pocillo de una placa de 24 pocillos que contenía 2×10^5 células/pocillo de la línea celular HeLa (contenidas en 986,7 μ l de MEM), estableciéndose una MOI de 1:10 (células/bacterias). La placa de cultivo celular se incubó a 37°C por 2 horas con 5% de CO_2 . Los pocillos de la placa se lavaron 3 veces con PBS, para luego agregar 1 ml de MEM suplementado con gentamicina (100 μ g/ml concentración final). La placa se incubó a 37°C por 2 horas con 5% de CO_2 . Luego, cada pocillo se lavó 3 veces con PBS y se añadieron 100 μ l de solución 0,5% Tripsina-EDTA 10X (Gibco), dejando únicamente una capa superficial sobre la monocapa de la línea celular mediante el retiro del exceso de solución de tripsina, para posteriormente incubar la placa a 37°C por 5 minutos. Seguidamente, se observó el desprendimiento de la monocapa de la línea celular desde cada pocillo de la placa en un microscopio óptico y luego se agregaron 200 μ l de Tritón X-100 0,05% preparado en PBS. Posteriormente, se sembraron 100 μ l de la suspensión de células HeLa y bacterias sin diluir en placas de agar tripticasa de soya suplementado con 5% de sangre de cordero, incubándose a 37°C por 18-24 horas.

Finalmente, el cálculo de porcentaje de invasión se realizó mediante el conteo de colonias recuperadas desde el ensayo, para luego realizar la conversión de estas a UFC/ml mediante la multiplicación del factor de dilución en la placa del recuento y de volumen de siembra (100 μ l) (número de colonias $\times 10^{(\text{dilución})} \times 10$). Luego, el resultado obtenido fue utilizado para obtener el porcentaje de invasión, considerando como un 100% las 2×10^6 UFC/ml inoculadas inicialmente en el cultivo celular.

4.5 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron ejecutados con el programa *GraphPad Prism* versión 8.0.2. Se aplicó la prueba de Kolmogórov-Smirnov para evaluar la distribución normal de los datos generados desde los ensayos de sensibilidad a sacarosa, adherencia e invasión. Luego, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con una prueba de comparación múltiple de Tukey.

V. RESULTADOS

5.1 Obtención de la secuencia de recombinación

5.1.1 Obtención de los brazos de homología del gen *sip*

A partir del alineamiento de la secuencia del gen *sip* (*GenBank* KX363665.1) con la herramienta *Megablast*, se obtuvieron las 100 mejores secuencias alineadas con un rango de porcentaje de identidad de 98,93% a 100%, todas con un 100% de cobertura y un *E-value* de 0. Las 10 mejores secuencias, establecidas bajo los criterios de porcentaje de identidad y cobertura, mostraron un 100% en estos parámetros. Todas estas secuencias estaban contenidas en los genomas completos de las cepas de *S. agalactiae*, detalladas en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Ranking de los 10 mejores alineamientos con la secuencia del gen *sip*.

N° orden	Cepa	ID <i>GenBank</i>	Identidad (%)	Cobertura (%)	Secuencia de referencia <i>GenBank</i>	Cepa de colección ATCC o NCTC
1	01173	CP053027.1	100	100	No	No
2	Sag153	CP036376.1	100	100	No	No
3	ZQ0910	CP049938.1	100	100	No	No
4	TFJ0901	CP034315.1	100	100	No	No
5	WC1535	CP016501.2	100	100	No	No
6	B507	CP021771.1	100	100	No	No
7	B509	CP021769.1	100	100	No	No
8	NCTC8187	LS483387.1	100	100	No	NCTC
9	NCTC11930	LS483342.1	100	100	No	NCTC
10	CUGBS591	CP021862.1	100	100	No	No

El diseño *in silico* de la secuencia de recombinación se realizó a partir de la secuencia del genoma completo de la cepa de referencia NCTC8187 de *S. agalactiae* (*GenBank* LS483387.1), lo que permitió determinar las secuencias nucleotídicas de las regiones flanqueadas del gen *sip* en el cromosoma bacteriano. Utilizando el *software Blastn* se validó *in silico* una secuencia de 3306 pb, compuesta por 1305 pb del ORF del gen *sip* y 1000 pb

río arriba y 1001 pb río abajo de este ORF. La búsqueda se realizó en la base de datos nucleotídica específica de *S. agalactiae* (taxid: 1311), optimizando los parámetros para búsqueda de secuencias altamente similares (*Megablast*) y secuencias similares (*Blastn*). Utilizando ambos parámetros, el resultado fue el mismo: 100 secuencias con 100% de cobertura y porcentajes de identidad entre 99,06-100% y un *E-value* de 0. Los 10 alineamientos mejor posicionados, todos con 100% de identidad y 100% de cobertura, resultaron ser los mismos que arrojó el alineamiento local del ORF del gen *sip* y que se encuentran contenidas en la **Tabla 3**.

5.1.2 Construcción *in silico* de la secuencia de recombinación

Luego de la validación *in silico* del locus del gen *sip* y sus secuencias flanqueantes, estas últimas fueron ensambladas al ORF del gen *cat*. Adicionalmente, se agregaron secuencias reconocidas como sitios de corte por las enzimas de restricción *XhoI* (extremo 5´) y *NotI* (extremo 3´). Desde extremo 5´ al extremo 3´, la secuencia de 6 pb correspondientes al sitio de corte por la enzima *XhoI*, seguido de una secuencia de 1000 pb correspondientes al brazo de homología río arriba del gen *sip* y luego una secuencia de 660 pb correspondientes al ORF del gen *cat*. Finalmente, una secuencia de 1001 pb correspondiente al brazo de homología río abajo del gen *sip* y una secuencia de 8 pb correspondientes al sitio de corte por la enzima *NotI* (**Figura 7**).

```

XhoICTCGAGGTATGGTTTTACTGCGGGTCCCGAGTTTTAGCCGATACTTATGTCCTCCAATTGATAATGGTGAATTAACAACAGGTTCAATGGTTATCCTGGACATTTGGGGTGGATTATGCTGT
TCCGACTGGAACGATTATTAGGCGAGTGGCAGATGGTACTGTGAAATTTGCAGGAGCTGGAGCCAACCTTTCTTGGATGACAGACTTAGCAGGAAATTTGTGTCATGATTCAACATGCGGATGGAAATGCA
TAGTGGTTACGCTCATATGTCACGTGTGGTGGCTAGGACTGGGAAAAAGTCAACAAGGAGATATCATCGGTTACGTAGGAGCAACTGGTATGGCGACGGGACCTCACCTTCATTTGAAATTTTACC
AGTAAACCTAATTTTCAAATGGTTCCATGGACGTATCAATCCAACGTCACATAATTGCTAATGTTGCGACCTTTAGTGGAAAAACGCAAGCATCAGCTCCAAGCATTAAAGCATTACAATCAGCTCCT
GTACAGAAATCAATCTAGTAAATAAAAGTGTATCGAGTAGATGAATTACAAAAGGTTAATGGTGTGGTGTAGTCAAAAAAACAACCCCTAACGCCGACTGGGTTGATTTGGAAACGATTAATGGTATACCA
GCATCAGAAATGATGAGGTTGATGCTAATGGTAATTGACAGCTGACCAGGTTCTCAAAAAGGTGGTACTTTATCTTTAATCCTAAAACCTTAAGACTGTAGAAAAACCCATCCAAGGAACAGCT
GGTTAACTGGGCTAAGACAGCTTTGCTAATGGTAGTTCAGTTGGCTCGCGTGTGACAAAGTCAAGAAGCTGCTTACAATAGTTTGGAGTATTGATTCATTGTTTAAATGACAGTTTGTACTA
ACTAAGTACAATTTCTTAAACCGTCTGAAAATAATTTTATGTCAGTAAAGTGTGATATTATGTCGGACTAATAAAAAGGAAATAGGAATTGAAGCAATGGAGAAAAAATCACTGGATATACC
ACCGTGTATATATCCCAATGGCATCGAAAAGCAATTTGAGGCATTTGAGTCAGTTCGTCATGTAACCTATAACAGACCGTTCAGCTGGATATACGGCCCTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAAATAG
CAGAAGTTTATCCGGCTTTATTCACATCTTCCCGCCGTGATGAATGCTCATCCGGAGTTCGGTATGGCAATGAAAAGACGGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTACCCCTGTATACCGTTTCCG
TGAGCAAACTGAAAAGCTTTTATCCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAACCTGGCCATTTCCCTAAAGGGTATAT
JAGAATATGTTTTGCTCTCAGCAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTGTGATTAACGTTGGCCAATATGGACAACCTTCTCCGCCCTTTTACCATGGGCAATATATACGCAAGGGGACAAGG
TCTGTATGCCCTGGCGATTACGGTTCATTATAAAAAGGAAAGCTATTTGGCTCTCTTTTATATGCTTGCATAGACTTCAAGGTTCTATCTAATTTTATAAATTGAGGAGATTAAGCTATAAGTC
TGAACTACTTTCACGTTAACCGTGACTAAATCAAAAACGTTAAAACCTAAAATCTAAGTCTGTAAGGATTAATGAAAACGCTTTAAAAATAGATATAAATAAGGTTGTAGATATCTAAAATTAAGAA
TAAGGAAGTGAGAATATGCCACATCTAAGTAAAGAAGCTTTTAAAAAGCAATAAAAAATGGCATTATTGTGTCATGTCAAGCTTTGCTGGGGAGCCTCTTATACCTGAAAAGCGGAGGTATTGCTCT
TTTTAGCTTTGGCAGCTCAAGAAGCAGGAGCGGTTGGTATAAGAGCCAATAGTGTCCGCGACATTAAAGGAAATCAAGAAGTTACTAATTTACCTATCATCCGGCATTATAAACGTTGAATATCTCCA
CAAGAACCATTATCACTGCTACGATGACAGAGGTGGATCAATTAGCTAGTTTAGATATTGCAGTAATAGCCATAGATTGTACACTTAGAGAGCGTCAATGATGGTTGAGTGTAGCTGAGTTTATTCAAA
AGATAAAAAGGAAATATCTCGAACAGTTGCTAATGGTGTATATAAGTACTTTTGAAGAAGGCAAAAATGCTTTTGAAGCAGGAGTTGATTTTGGGGTACAACCTATCCGGATACACAGATTACAGCC
GCCAAGAAAGAGGACCGGATATAGAATCTTAAAGCTTTGTCAAGCCGGTATAGATGTGATTGCGGAAGTAAATTCATACTCTAAGCAGGCTAATGAAATTAATCATATAGGTGTTGCAGGA
ATTGTAGTTGGTGTCTATCACTAGACAAAAGAAATAGCCGGAGCTTTTATCTCAGGACTTAGTTAAAAGTGTACTCAAAAATCAAAAATAAAAAGGGGAATAGTTATGAGTATCA
GCCGC(NotI)

```

Figura 7. Diseño *in silico* de la secuencia de recombinación. Se destacan en amarillo las secuencias con los sitios de corte reconocidos por las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI*; en verde se destaca el ORF del gen *cat*. Las secuencias sin destacar corresponden a los brazos de homología del gen *sip*.

5.1.3 Síntesis de la secuencia de recombinación

La empresa *GenScript* sintetizó y clonó la secuencia de recombinación en el sitio de restricción *EcoRV* del vector de amplio rango de hospederos pUC57-Mini, generándose el vector pUC57-MutSIP (4426 pb). Este vector además contiene en su secuencia un marcador de resistencia a ampicilina y un origen de replicación de alto número de copias (**Figura 8**).

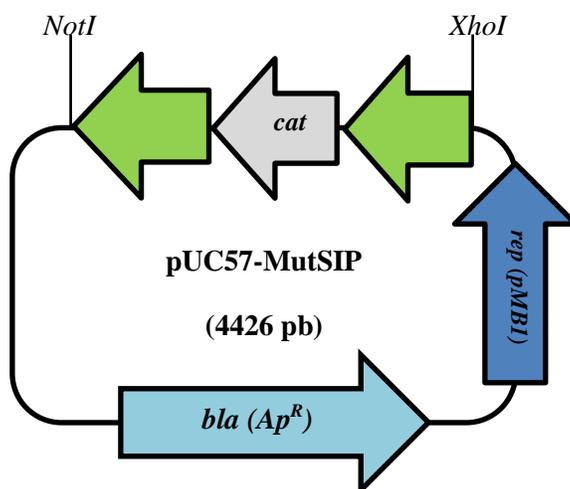


Figura 8. Esquema del vector pUC57-MutSIP. Azul: *rep* (pMB1): origen de replicación; celeste: *bla* (Ap^R): gen codificante de una β -lactamasa de Clase A tipo TEM variante 1 que confiere resistencia a ampicilina. Verde: brazos de homología río arriba y río abajo del gen *sip*; gris: ORF del gen *cat*; secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción *XhoI* (extremo 5') y *NotI* (extremo 3').

5.1.4 Validación in vitro de las secuencia de recombinación

En este punto, se comprobó mediante PCR convencional que los brazos de homología obtenidos de la cepa de referencia NCTC8187 correspondieran a las secuencias flanqueantes del gen *sip* de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015. Para este propósito, se diseñaron los partidores F_insert/R_insert que hibridan en los brazos de homología diseñados; específicamente en las posiciones nucleotídicas 58 río arriba y 39 río abajo del ORF del gen *sip*, respectivamente (**Figura 9A**). Estos oligonucleótidos también se probaron en combinación con partidores internos del gen *sip* (SIP-F/SIP-R) obtenidos de la publicación Escobar y colaboradores (2020) (48). Los productos de PCR obtenidos correspondieron a los esperados (**Figura 9B**): F_insert/R_insert para la secuencia de recombinación obtenida del material sintetizado por la empresa *GenScript* (673 pb); F_insert/R_insert para el ADN cromosomal de la cepa

BIOTEC.ISPCH/2015 (1402 pb); F_insert/SIP-R (776 pb); y SIP-F/R_insert (744 pb). Los productos de PCR obtenidos correspondieron con los tamaños esperados para el material genético sintetizado (pUC57-MutSIP) y ADN cromosomal de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 al usar los partidores F_insert/R_insert. Mientras que con las combinaciones de los partidores que hibridan en los brazos de homología y al interior del ORF del gen *sip*, se observaron amplicones al usar como templado el ADN cromosomal de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015. Con estos ensayos se comprobó que las secuencias correspondientes a los brazos de homología, que componen la secuencia de recombinación, están ubicados en la orientación definida anteriormente *in silico* en la secuencia de referencia LS483387.1. Con ello, se continuó con las etapas de la mutagénesis.

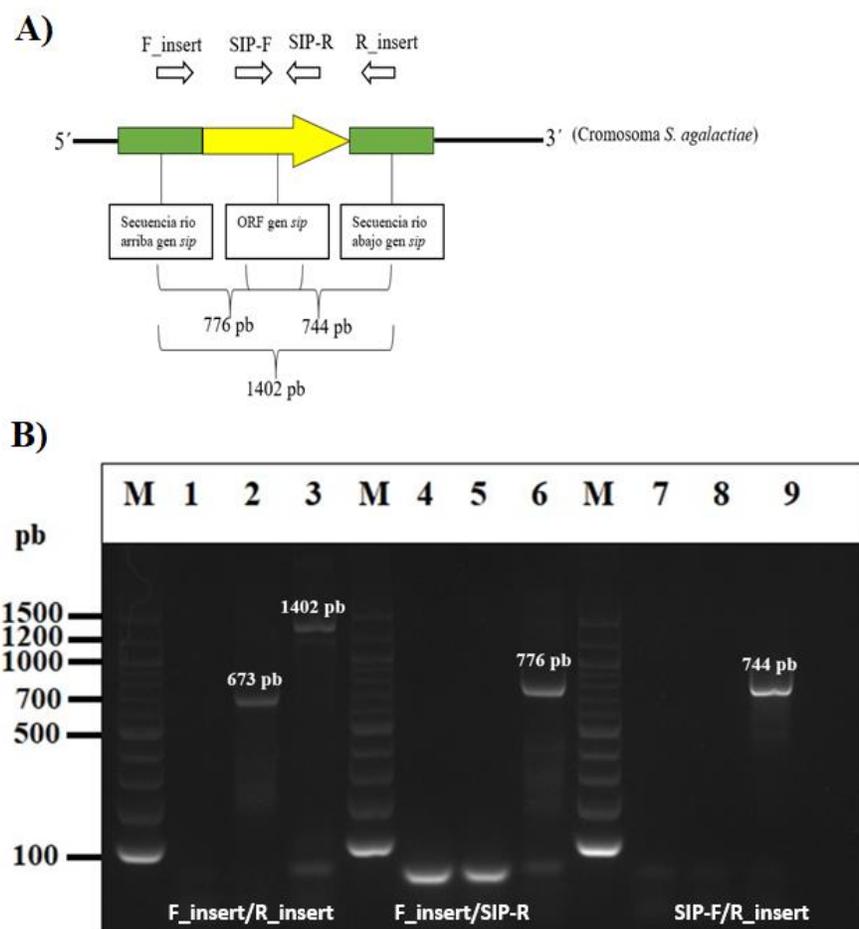


Figura 9. Validación *in vitro* de las secuencias flanqueantes del gen *sip*. A) Esquema de hibridación de los partidores utilizados para comprobar la ubicación en el cromosoma del locus del gen *sip*; B) Fotografía de un gel de agarosa al 2% teñido con *SybrSafe* a concentración final 1X, muestra los amplicones del ORF del gen *sip* desde los brazos de homología generados con los partidores F_insert/R_insert (carriles 1-3) y los productos SIP-F/R_insert (carriles 7-9)

de PCR obtenidos desde las combinaciones de los partidores F_insert/R_insert con partidores que hibridan al interior del ORF del gen *sip* (F_insert/SIP-R: carriles 4-6 y SIP-F/R_insert: carriles 7-9). Carril M: marcador de peso molecular de 100 pb; carriles 1, 4 y 7: control negativo; carriles 2, 5 y 8: vector pUC57-MutSIP; carriles 3, 6 y 9: ADN cromosomal de *S. agalactiae* BIOTEC.ISPCH/2015.

5.2 Mutagénesis dirigida al locus del gen *sip*

5.2.1 Verificación de identidad de los vectores pMBSacB y pUC57-MutSIP, y subclonamiento

Para mantener los vectores pMBSacB y pUC57-MutSIP, se introdujeron en la bacteria *E. coli* DH5 α mediante quimiotransformación, para luego verificar sus identidades a través de la purificación de ADN plasmidial y digestión con las enzimas de restricción *NotI* y *XhoI*, como se muestra en la **Figura 10**. La **Figura 10A**, muestra la digestión enzimática del vector pMBSacB con cada enzima por separado (carriles 2 y 3) y el vector linealizado de 6123 pb como producto de la doble digestión (carril 4). Por otro lado, la **Figura 10B** muestra la digestión enzimática del vector pUC57-MutSIP con cada una de las enzimas (carriles 2 y 3) y la liberación del inserto de 2591 pb producto de la doble digestión con las enzimas *NotI* y *XhoI* (carril 4). Con este ensayo, se verificó la identidad del ADN plasmidial purificado desde las correspondientes cepas derivadas de *E. coli* DH5 α transformadas con ambos plasmidios.

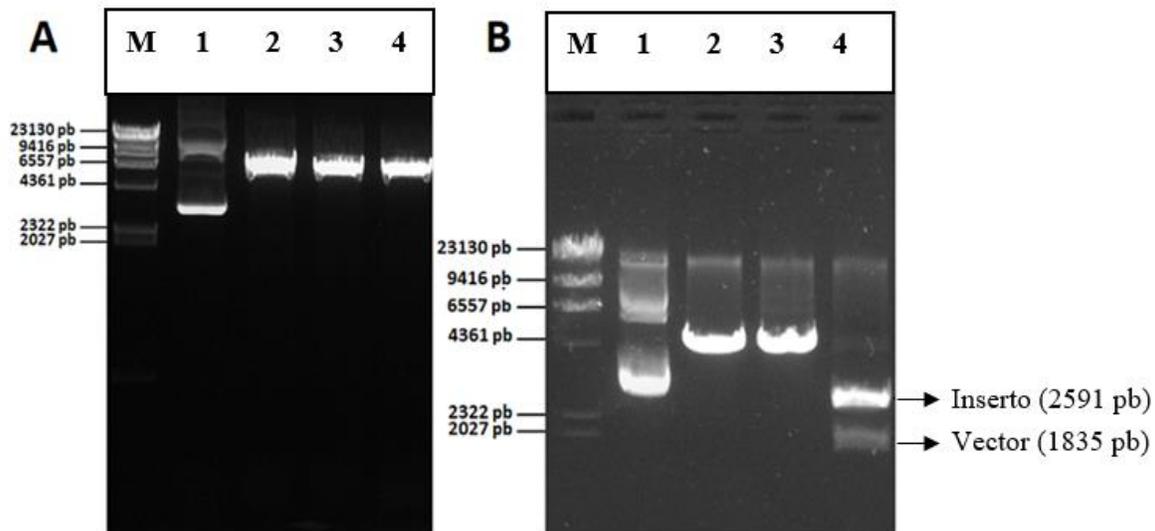


Figura 10. Digestión analítica de los vectores pMBSacB y pUC57-MutSIP. Fotografías de geles de agarosa al 1% teñidos con *SybrSafe* a concentración final 1X. **A)** Carril M: estándar de peso molecular ADN del fago Lambda digerido con *HindIII*; carril 1: vector pMBSacB sin digerir; carril 2: vector pMBSacB digerido con

NotI; carril 3: vector pMBSacB digerido con *XhoI*; carril 4: vector pMBSacB digerido con *NotI* y *XhoI*. **B)** Carril M: estándar de peso molecular ADN del fago Lambda digerido con *HindIII*; carril 1: vector pUC57-MutSIP sin digerir; carril 2: vector pUC57-MutSIP digerido con *NotI*; carril 3: vector pUC57-MutSIP digerido con *XhoI*; carril 4: vector pUC57-MutSIP digerido con *NotI* y *XhoI*.

Verificadas las identidades de los vectores, se recuperaron las bandas de interés desde el gel de agarosa y se purificaron para realizar el subclonamiento del inserto (carril 4 de la **Figura 10B**) en el vector pMBSacB (carril 4 de la **Figura 10A**). Luego de la ligación, se transformó la bacteria *E. coli* DH5 α mediante quimiotransformación y se confirmó la identidad del nuevo vector generado (pMBSacB-MutSIP) mediante la purificación de ADN plasmidial y digestión con las enzimas de restricción *NotI* y *XhoI*, como se muestra en la **Figura 11**. En esta imagen, se observa un único vector purificado desde *E. coli* DH5 α transformada (carril 1) y la verificación de identidad mediante digestión con cada una de las enzimas de restricción (carriles 2 y 3) y la liberación de dos bandas con pesos moleculares estimados de 6123 y 2591 pb del vector linealizado y el inserto (carril 4), respectivamente, confirmándose el éxito del subclonamiento y la posterior transformación con el nuevo vector generado.

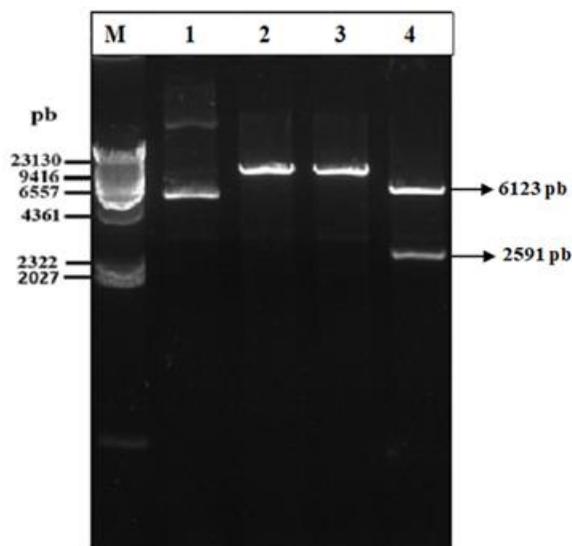


Figura 11. Digestión analítica del vector pMBSacB-MutSIP. Fotografías de geles de agarosa al 1% teñidos con *SybrSafe* a concentración final 1X. Carril M: estándar de peso molecular ADN del fago Lambda digerido con *HindIII*; carril 1: pMBSacB-MutSIP sin digerir; carril 2: pMBSacB-MutSIP digerido con *NotI*; carril 3: pMBSacB-MutSIP digerido con *XhoI*; carril 4: pMBSacB-MutSIP digerido con *NotI* y *XhoI*.

5.2.2 Transformación de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 de *S. agalactiae*

La incorporación del vector pMBSacB-MutSIP en la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 de *S. agalactiae* fue confirmada mediante la observación de colonias β -hemolíticas crecidas en placas de agar tripticasa de soya suplementado con 5% de sangre de cordero y 1 μ g/ml de eritromicina, crecimiento en placas de agar TH suplementadas con 5 μ g/ml de eritromicina y aglutinación de partículas de látex con antisuero específico para el polisacárido de la pared de *Streptococcus* Grupo B (*S. agalactiae*) (**Figura 12**). Estas pruebas confirmaron el cambio en el fenotipo de resistencia a eritromicina (**Figuras 12A y 12B**) por medio del vector pMBSacB-MutSIP que contiene la 23S ARNr [adenina(2058)-N(6)]-metiltransferasa Erm(B) y la identificación de la especie a través de la aglutinación en látex acoplado con anticuerpos específicos para el antígeno B de *S. agalactiae* (**Figura 12C**).

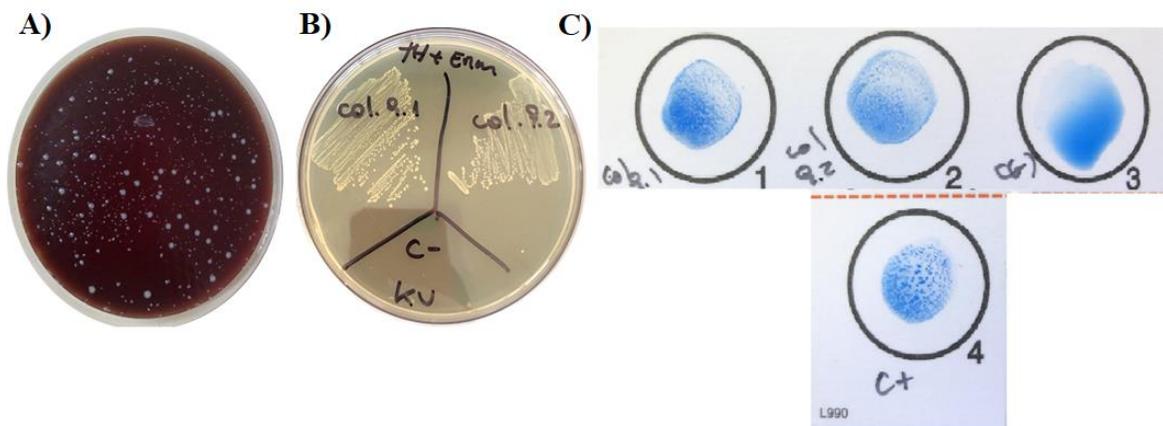


Figura 12. Confirmación de la transformación de la cepa *S. agalactiae* BIOTEC.ISPCH/2015 con pMBSacB-MutSIP. A) placa de agar tripticasa de soya suplementada con 5% de sangre de cordero y 1 μ g/ml de eritromicina con colonias transformantes. B) Placa de agar TH suplementada con 5 μ g/ml de eritromicina. Col. 9.1 y 9.2: colonias transformantes; C- KU: cepa *S. agalactiae* BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre. C) Aglutinación en látex con anticuerpos específicos contra el antígeno B de la especie *S. agalactiae*. 1 y 2: colonias transformantes; 3: *E. coli* DH5 α ; 4: cepa *S. agalactiae* BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre.

5.2.3 Mutagénesis: primer entrecruzamiento

El evento de primer entrecruzamiento, generado por la inserción del vector pMBSacB-MutSIP en el cromosoma de *S. agalactiae*, fue confirmado mediante la amplificación por PCR convencional de un fragmento de 2892 pb (producto generado por la inserción del vector desde el brazo de homología río arriba del gen *sip*) o 3621 pb (producto generado por

la inserción del vector desde el brazo de homología río abajo del gen *sip*), utilizando los partidores *sip_farout_F* y *pMBSacB_MCS* (**Figura 13A**). El partidador *sip_farout_F* hibrida 25 nt río arriba del inicio de la región de homología en el cromosoma de *S. agalactiae* y el partidador *pMBSacB_MCS* hibrida 282 nt río abajo del sitio de multiclonamiento en el vector *pMBSacB-MutSIP*. Del total de colonias analizadas, un 75% (9/12) amplificó uno de los productos esperados (2892 o 3621 pb), evidenciando el entrecruzamiento simple entre el vector y el cromosoma bacteriano (**Figura 13B**).

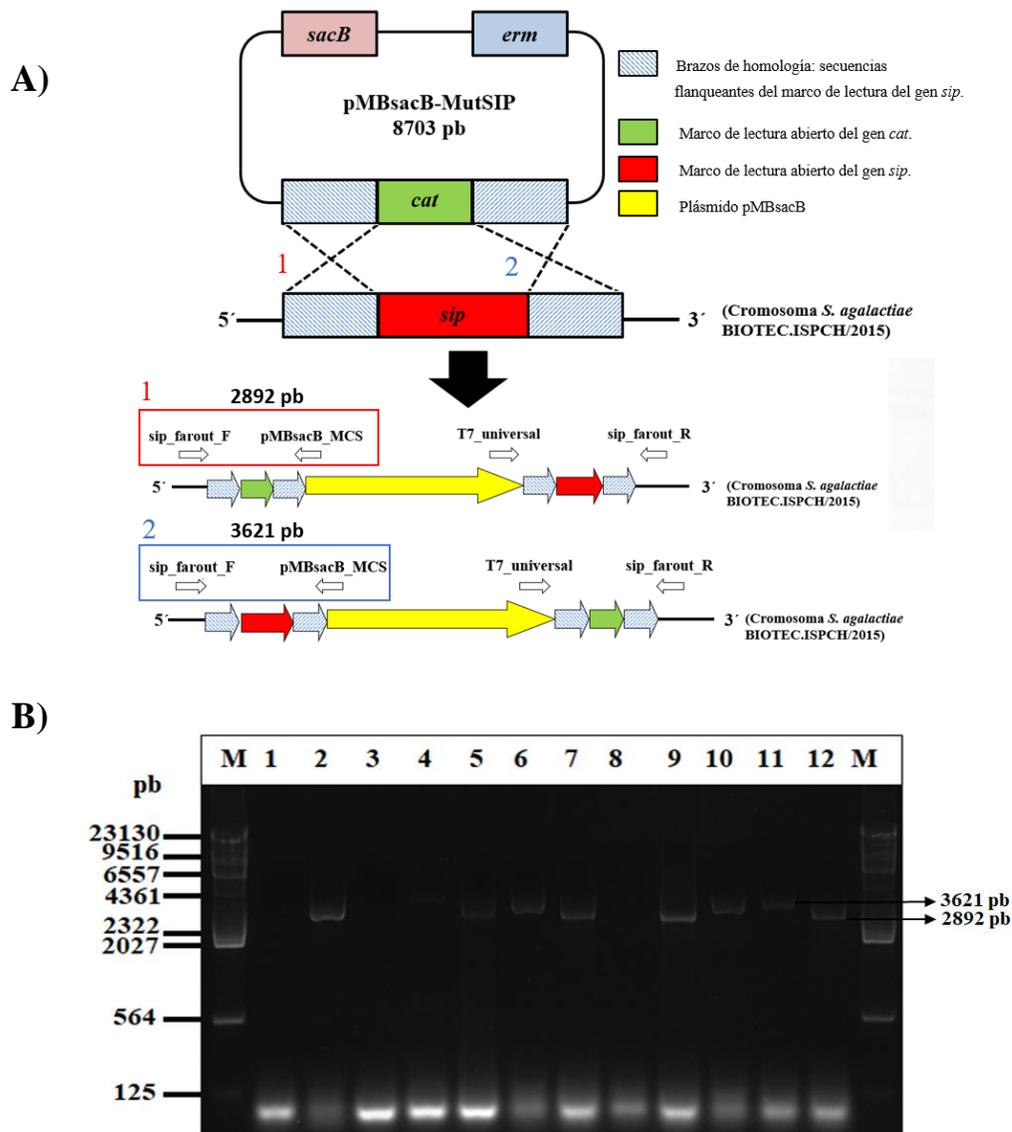


Figura 13. Confirmación del primer entrecruzamiento. A) Esquema de inserción del vector *pMBSacB-MutSIP* en el cromosoma de *S. agalactiae*: 1) entrecruzamiento entre los brazos de homología río arriba y 2) entrecruzamiento entre los brazos de homología río abajo; B) Visualización de productos de PCR para el primer entrecruzamiento.

entrecruzamiento: Fotografía de gel de agarosa al 1% teñido con *SybrSafe* a concentración final 1X. Carril M: estándar de peso molecular ADN del fago Lambda digerido con *HindIII*; carriles 1-12: productos de amplificación por PCR obtenidos desde colonias candidatas con entrecruzamiento del vector pMBSacB-MutSIP. Tamaño esperado de los amplicones: 2892 pb y 3621 pb.

De las colonias positivas para el entrecruzamiento simple, solo se utilizó una para continuar los siguientes experimentos. A partir de la colonia escogida, se analizó la sensibilidad a sacarosa para determinar la estabilidad de la inserción del vector en el cromosoma bacteriano y la funcionalidad de la proteína levansacarasa codificada en el gen *sacB* del vector pMBSacB-MutSIP a través del efecto de toxicidad en la bacteria. La colonia analizada demostró tener un crecimiento deficiente en medio de cultivo suplementado con sacarosa en comparación a la misma cepa sin suplementación en medio de cultivo con sacarosa. Al finalizar el experimento, se observó que en presencia de sacarosa la cepa con primer entrecruzamiento tuvo un desarrollo de colonias menor al 1% relativo al observado a la misma cepa en ausencia de sacarosa (**Figura 14**).

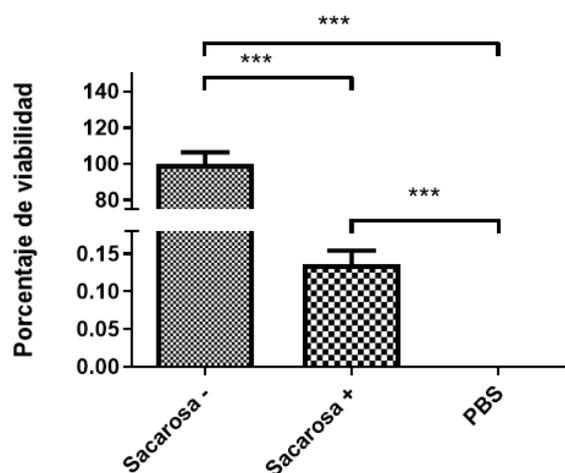


Figura 14. Ensayo de sensibilidad a sacarosa de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 con la inserción del vector pMBSacB-MutSIP. Sacarosa -: Cepa BIOTEC.ISPCH/2015 con la inserción del vector pMBSacB-MutSIP crecida en medio de cultivo sin suplementación de sacarosa; Sacarosa +: Cepa BIOTEC.ISPCH/2015 con la inserción del vector pMBSacB-MutSIP crecida en medio de cultivo con suplementación de sacarosa; PBS fue utilizado como control negativo de crecimiento. Se estableció que la media del número de UFC recuperadas del ensayo como un 100% en el grupo “*Sacarosa -*” y se realizó una cuantificación relativa en el grupo “*Sacarosa +*”. [***, $p < 0,0001$], ANOVA de una vía con una prueba de comparación múltiple de Tukey].

Confirmado el entrecruzamiento por PCR convencional y la funcionalidad de la enzima levansacarasa, esta cepa se respaldó a -80°C y en paralelo se utilizó para generar el segundo entrecruzamiento.

5.2.4 Mutagénesis: segundo entrecruzamiento

A partir de una colonia con entrecruzamiento positivo desde el brazo de homología río arriba, se realizaron sucesivos subcultivos por tres días en medio TH sin antibióticos y sin sacarosa a 30°C y luego tres días adicionales en TH suplementado con sacarosa generaron el segundo evento de recombinación a través del entrecruzamiento de los brazos de homología río abajo del *cassette* y el ORF del gen *sip*. Del último subcultivo, se realizaron diluciones seriadas 1:10 y siembra en placas de agar TH suplementado con sacarosa para la contraselección con la finalidad de obtener colonias aisladas. Se realizaron reacciones de PCR convencional dirigidos a amplificar toda secuencia contenida en la construcción de la secuencia de recombinación a las colonias candidatas, utilizando los partidores *sip_farout_F* y *sip_farout_R*, que hibridan fuera de las secuencias utilizadas como brazos de homología; específicamente a 25 nt del inicio del brazo de homología río arriba y 38 nt del término del brazo de homología río abajo. El producto de PCR de 2640 pb obtenido desde la cepa candidata a mutante *sip* y de 3369 pb obtenido desde la cepa silvestre, confirmó el intercambio de secuencias en el locus donde originalmente estaba contenida la secuencia del ORF del gen *sip* (**Figura 15**).

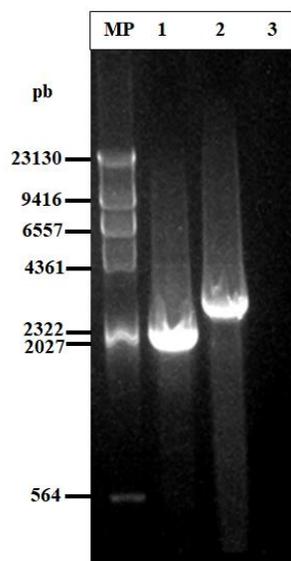


Figura 15. Visualización de los productos de amplificación del locus con el alelo mutante y silvestre. Fotografía de un gel de agarosa al 1% teñido con *SybrSafe* a concentración final 1X. Carril M: estándar de peso molecular de ADN del fago Lambda digerido con *HindIII*; carril 1: *S. agalactiae* BIOTEC.ISPCH/2015 mutante *sip*; carril 2: *S. agalactiae* BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre. Tamaño esperado de amplicón: 2640 pb para la cepa mutante *sip* y 3369 pb para la cepa silvestre.

5.3 Caracterización molecular

5.3.1 Verificación de la ausencia de expresión de la proteína Sip en la cepa mutante

Para confirmar la ausencia en la expresión de la proteína Sip en la cepa mutante, se realizaron dos ensayos serológicos con distinto fundamento; *Western blot* y un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral. En la **Figura 16A** se muestra el resultado del ensayo mediante *Western blot*, donde se observa una banda con una masa molecular aproximada de 53 kDa correspondiente a la proteína Sip en la muestra proveniente de la cepa silvestre (carril 2). Por su parte, en la **Figura 16B** se muestra el resultado del ensayo inmunocromatográfico, donde se observa la presencia de la banda específica para la proteína Sip en la muestra obtenida desde la cepa silvestre (panel inferior). En ambas pruebas no se observó la expresión de la proteína Sip en la cepa mutante (**Figura 16A**, carril 3 y **Figura 16B**, panel superior).

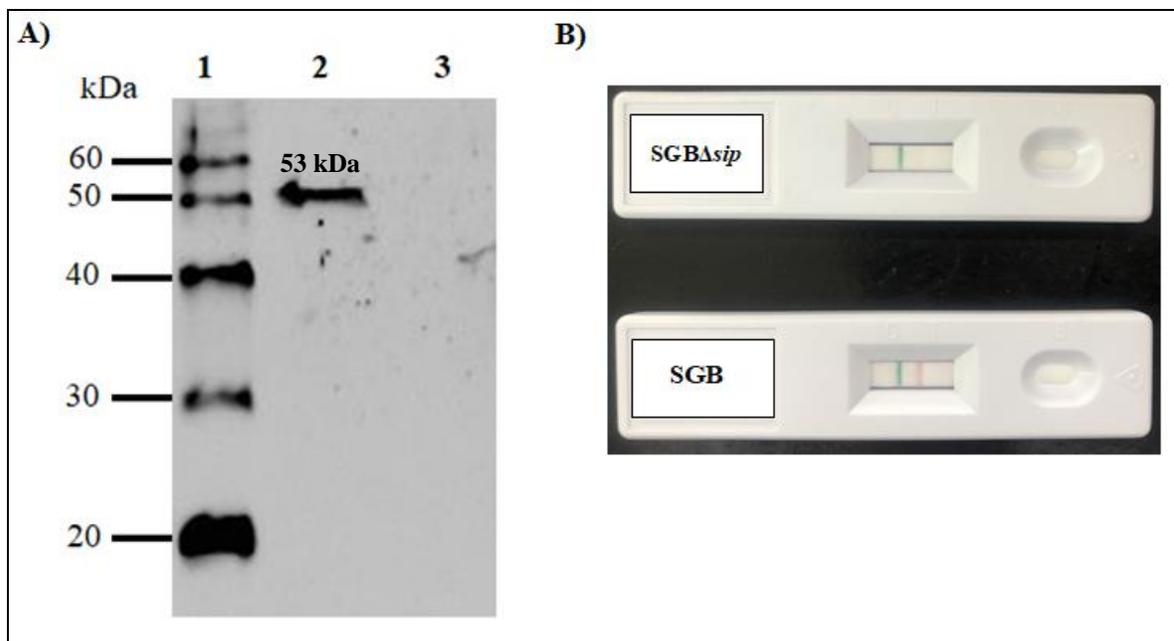


Figura 16. Detección de la proteína Sip mediante inmunoensayos. A) *Western blot*: carril 1: Estándar de peso molecular para inmunotransferencia *MagicMark XP Western Standard* (Invitrogen) (20-220 kDa); carril 2: *S. agalactiae* BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre; carril 3: *S. agalactiae* BIOTEC.ISPCH/2015 mutante *sip*; B) Ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral: SGB: cepa BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre y; SGB Δ *sip*: BIOTEC.ISPCH/2015 mutante *sip*.

5.3.2 Caracterización genética

La confirmación genética de la mutagénesis sitio dirigida al ORF del gen *sip*, se realizó a través de dos metodologías; una basada en amplificación de ácidos nucleicos de fragmentos específicos de *S. agalactiae* y la otra mediante la secuenciación del genoma completo de la bacteria con el sistema *Illumina NextSeq 2000*.

5.3.2.1 Visualización de productos de PCR

Se escogieron 3 blancos moleculares para este fin; i) gen *cfb*, el cual permitió confirmar la identidad de *S. agalactiae* por ser un gen que está presente solo en esta especie; ii) locus del gen *sip* desde las secuencias flanqueantes, el cual permitió confirmar diferencias de tamaño entre el genoma de la cepa silvestre (que contiene el ORF del gen *sip*) y la cepa mutante *sip* (que contiene el ORF del gen *cat*); iii) ORF gen *sip*, este fragmento de amplificación permitió confirmar la escisión del ORF del gen *sip* desde el genoma de la especie *S. agalactiae*. Los productos de PCR de las 3 reacciones elaboradas de manera independiente, permitieron

confirmar la identidad de la especie de la cepa mutante a través de la amplificación del fragmento de 154 pb del gen *cfb* (**Figura 17**, carril 2). Además, se logró confirmar la secuencia insertada en la cepa mutante *sip* mediante la amplificación de un fragmento de 673 pb (**Figura 17**, carril 6) en lugar del fragmento de 1402 pb obtenido desde la cepa silvestre (**Figura 17**, carril 7). Finalmente, el PCR dirigido a una región interna del ORF del gen *sip* evidenció la ausencia del fragmento de 559 pb en la cepa mutante *sip* (**Figura 17**, carril 10).

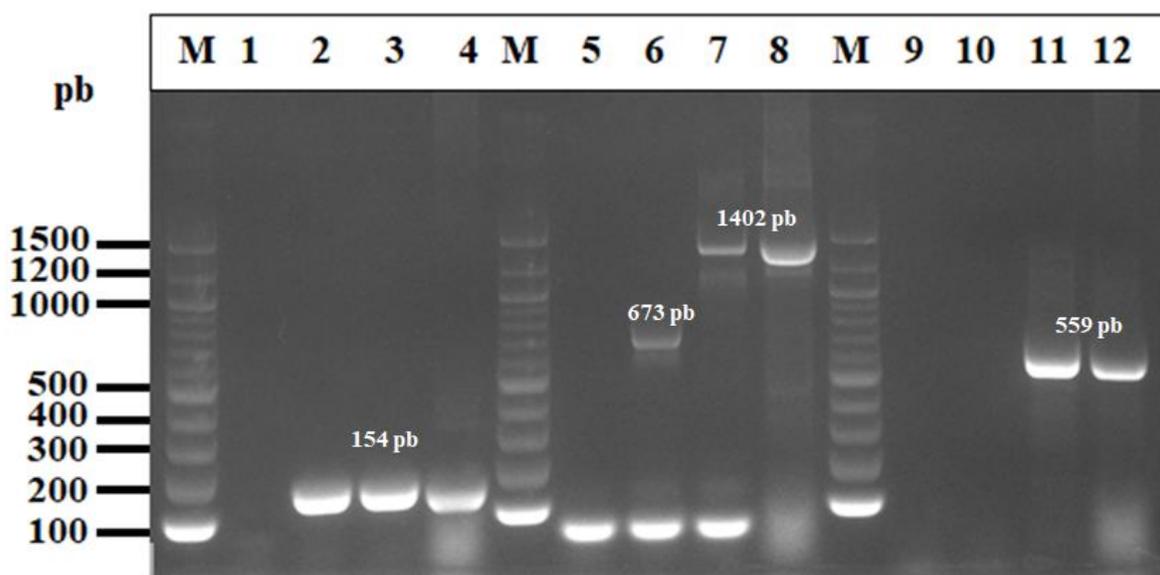


Figura 17. Confirmación de la mutagénesis por PCR. Fotografía de un gel de agarosa al 1% teñido con *SybrSafe* a concentración final 1X. Carriles 1-4: amplificación del gen *cfb*; carriles 5-8: amplificación del gen *sip* desde los brazos de homología; carriles del 9-12: amplificación del ORF del gen *sip*. Carril M: estándar de peso molecular ADN de 100 pb: carriles 1, 5 y 9: corresponden al control de reactivos; carriles: 2, 6 y 10: amplicones obtenidos desde la cepa mutante *sip*; carriles 3, 7 y 11: amplicones obtenidos desde la cepa silvestre; carriles 4, 8 y 12: amplicones obtenidos desde la cepa control *S. agalactiae* ATCC-12403.

5.3.2.2 Análisis de genomas

Desde el ensamblaje de las lecturas generadas en la secuenciación masiva de los genomas completos de las cepas BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre y mutante *sip*, se obtuvieron 66 y 70 *contigs*, respectivamente. De estos *contigs*, solo 38 (cepa silvestre) y 39 (cepa mutante) correspondían a secuencias ≥ 500 pb. El tamaño del genoma completo de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre fue de 1.994.120 pb, mientras que para la cepa mutante *sip* fue de 1.993.248 pb (**Tabla 4**). Los *contigs* fueron analizados primeramente con el *software*

SnapGene Viewer 6.0, para buscar y visualizar las secuencias correspondientes a los ORFs de los genes *sip* y *cat*. Con este análisis, se pudo observar que la secuencia del ORF del gen *sip* estaba presente únicamente en uno de los *contigs* del genoma de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre. Por otro lado, el ORF del gen *cat* estaba contenido únicamente en uno de los *contigs* del genoma de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 mutante *sip*.

Tabla 4. Reporte del control de calidad de los ensamblajes mediante el programa *Quast*.

	BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre	BIOTEC.ISPCH/2015 mutante <i>sip</i>
# contigs (≥ 0 pb)	66	70
# contigs (≥ 1000 pb)	36	36
# contigs (≥ 5000 pb)	33	33
# contigs (≥ 10000 pb)	26	26
# contigs (≥ 25000 pb)	22	22
# contigs (≥ 50000 pb)	14	14
Largo total (≥ 0 pb)	1.997.531	1.997.262
Largo total (≥ 1000 pb)	1.992.861	1.991.409
Largo total (≥ 5000 pb)	1.985.396	1.983.944
Largo total (≥ 10000 pb)	1.941.011	1.939.559
Largo total (≥ 25000 pb)	1.862.584	1.861.133
Largo total (≥ 50000 pb)	1.577.093	1.575.963
# contigs	38	39
Contig más largo	222.989	222.989
Largo total	1.994.120	1.993.248
GC (%)	35,23	35,23
N50	93.139	93.139
N75	59.730	59.731
L50	7	7
L75	13	13
# N's por 100 kpb	0.00	0.00

Con los *contigs* provenientes de la secuenciación masiva de las cepas BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre y mutante *sip*, se ensamblaron los genomas en base a la secuencia genómica de la cepa de referencia NCTC8187 y luego se generó un alineamiento múltiple entre las 3 secuencias. Alineados los tres genomas, se localizó en la secuencia de referencia el ORF del gen *sip* mediante la herramienta de búsqueda del programa *Mauve*. Con esto, fue posible identificar la región correspondiente al evento de delección/inserción ocurrida en el ORF del gen *sip* en la cepa mutante (**Figura 18**).

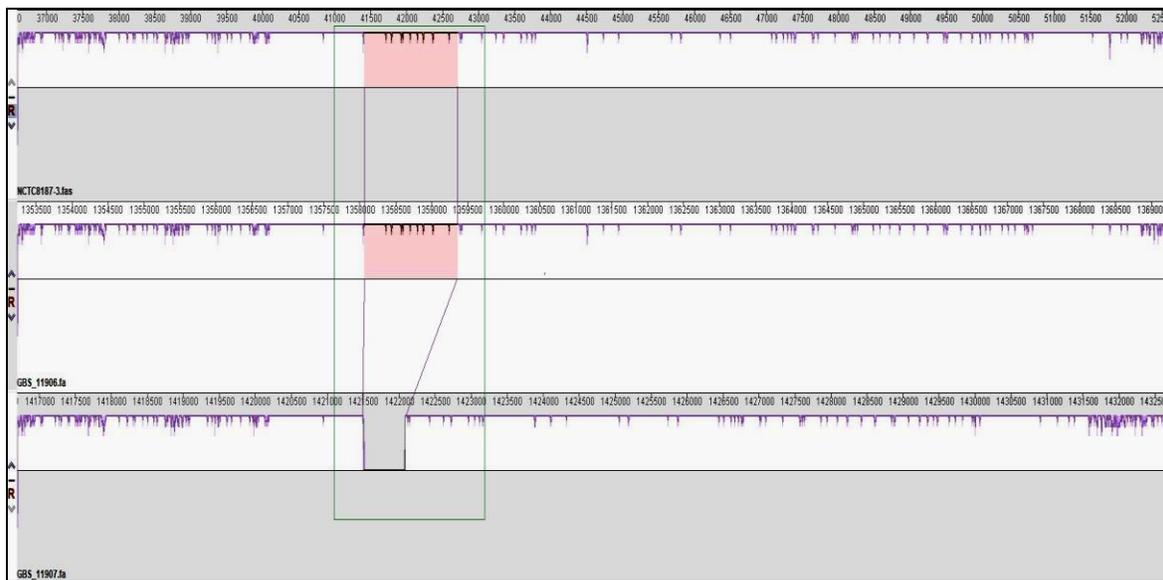


Figura 18. Alineamiento múltiple de genomas completos. Acercamiento de un fragmento de 16.000 pb desde el alineamiento múltiple de los genomas completos de la secuencia de la cepa de referencia NCTC8187 (*GenBank* LS483387.1) y las secuencias de los genomas completos de las cepas BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre y mutante *sip*, identificadas como GBS_11906 y GBS_11907, respectivamente. El alineamiento se generó a través del *software Mauve v2.4.0*. Las secuencias nucleotídicas están representadas en columnas compuestas zonas blancas en los segmentos con 100% de identidad entre las secuencias. Los segmentos donde se observan líneas blancas interrumpidas con una coloración malva indican una identidad variable entre las secuencias, mientras que la ausencia de las líneas verticales representan regiones sin homología. El recuadro en verde destaca el locus seleccionado en el programa en el que se encuentra la secuencia del ORF del gen *sip*, de acuerdo a la secuencia de referencia (rango desde 41.400 a 42.704). Dentro del recuadro en verde, las regiones destacadas en rosado muestran el ORF del gen *sip* y la homología entre las secuencias de la cepa de referencia y la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre. La región sin homología en la secuencia GBS_11907 corresponde al fragmento de 576 pb insertado en el genoma de la cepa mutante *sip*.

Adicionalmente, los genomas completos de las cepas NCTC8187, BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre y mutante *sip* fueron alineados utilizando la plataforma *web Mulan* (<https://mulan.dcode.org/>). Mediante este análisis se observó nuevamente la homología en el locus del ORF del gen *sip* (41.400-42.704) entre la cepa de referencia y la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre (Anexo 2). La cepa mutante *sip* no evidenció homología en dicho locus respecto de la secuencia de la cepa de referencia, observándose una diferencia entre ambas en un fragmento de 576 pb, que corresponde al ADN insertado. Luego, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias del locus del gen *sip* con la herramienta

bioinformática *ClustalW* desde 125 pb río arriba respecto del codón de inicio (ATG) del ORF del gen *sip* hasta 91 pb río abajo del codón de término (TAA). Este alineamiento fue visualizado con el programa *SnapGene Viewer*, observándose un 99,37% de similitud entre las secuencias de referencia (NCTC8187; *GenBank* LS483387.1) y BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre en el ORF del gen *sip*. Además se confirmó que la cepa mutante *sip* contiene una secuencia diferente en esta región, la cual corresponde al ADN insertado (ORF del gen *cat*) (**Figura 19**). Finalmente, un alineamiento local en la plataforma *Blastn* arrojó un 100% de similitud entre la secuencia insertada en la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 mutante *sip* con una región (posiciones 4524 al 5099) de la secuencia completa del vector pLY-4 (*GenBank* MN562271.1), la cual corresponde al gen que codifica la cloranfenicol acetiltransferasa (*cat*).

Figura 19. Alineamiento múltiple del locus del gen *sip*. El alineamiento múltiple entre las secuencias se generó a con la herramienta *ClustalW* contenida en el programa *BioEdit* y se visualizó con el programa *SnapGene Viewer*. Las flechas rojas indican los codones de inicio y término del ORF del gen *sip*. En amarillo se destaca la conservación de bases respecto de la secuencia de la cepa de referencia; en blanco se destacan los *mismatch* respecto de la secuencia de la cepa de referencia; y “(-)” representa a los *gaps*.

5.4 Caracterización microbiológica

Confirmada y caracterizada molecularmente la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 mutante *sip*, se realizaron diversas pruebas que permitieron comprobar en términos microbiológicos las posibles diferencias entre esta cepa y la cepa silvestre.

La cinética de crecimiento realizada en dos ensayos independientes con dos réplicas cada uno a 37°C, muestra curvas muy similares con solapamiento entre los puntos de sus densidades ópticas, lo que sugiere que ambas cepas tienen una cinética de crecimiento similar (**Figura 20**).

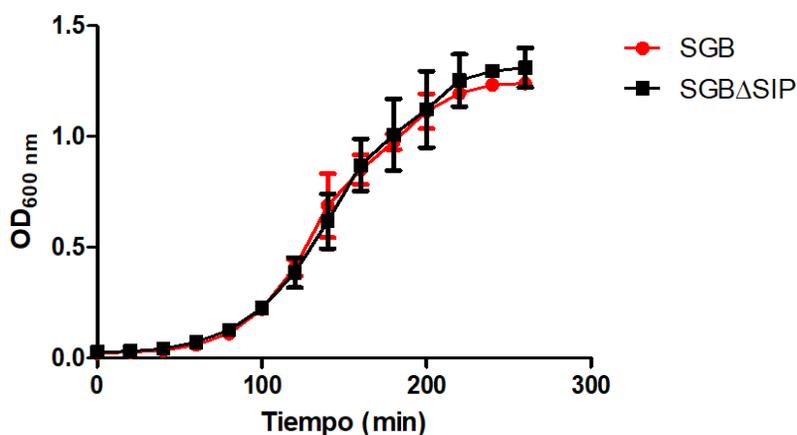


Figura 20. Cinética de crecimiento de las cepas BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre y mutante *sip*. Comparación de las cepas *S. agalactiae* BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre (SGB) y mutante *sip* (SGBΔ*sip*) en términos de desarrollo bacteriano en medio de cultivo BHI a 37°C con agitación constante a 220 rpm.

Por otro lado, con respecto al fenotipo de resistencia frente a un panel de antimicrobianos se determinó que, tanto cualitativamente (i.e., interpretación como sensible, intermedio o resistente), semicuantitativamente (i.e., diámetros de los halos de inhibición) y cuantitativamente (i.e., valores de CIM), ambas cepas presentan el mismo comportamiento (**Tabla 5**).

Tabla 5. Perfil de resistencia de las cepas *S. agalactiae* BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre y mutante *sip*.

Antibiótico	<i>S. agalactiae</i> silvestre	<i>S. agalactiae</i> mutante <i>sip</i>
Difusión		
Penicilina (10 µg)	S (29 mm)	S (28 mm)
Tetraciclina (30 µg)	R (11 mm)	R (11 mm)
Ofloxacino (5 µg)	S (20 mm)	S (20 mm)
Levofloxacino (5 µg)	S (21 mm)	S (21 mm)
Vancomicina (30 µg)	S (19 mm)	S (19 mm)
Eritromicina (15 µg)	S (26 mm)	S (26 mm)
Clindamicina (2 µg)	S (23 mm)	S (23 mm)
CIM		
Penicilina	S (0,125 µg/ml)	S (0,125 µg/ml)
Ceftriaxona	S (0,064 µg/ml)	S (0,064 µg/ml)

Interpretación: S = sensible y R = resistente.

Finalmente, cuando se analizó la expresión del factor CAMP a través de la prueba que lleva ese mismo nombre no se observaron diferencias entre ambas cepas, observándose el sinergismo entre el factor CAMP secretado por *S. agalactiae* silvestre y mutante *sip* y la β -hemolisina de *S. aureus* (**Figura 21**).

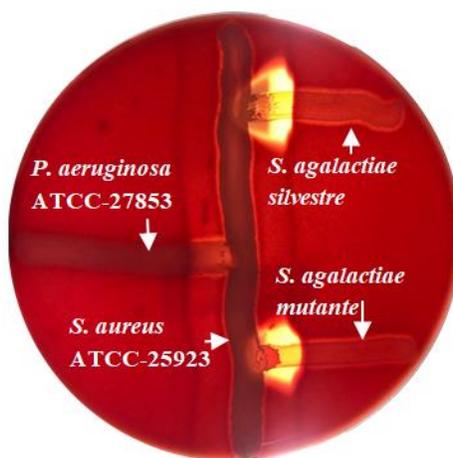


Figura 21. Secreción del factor CAMP. Placa de agar tripticasa de soya suplementado con 5% de sangre de cordero e incubada por 18-24 horas a 37°C. La hemólisis generada en la unión de los cultivos de *S. aureus* ATCC-25923 y *S. agalactiae* (silvestre y mutante *sip*) indican la positividad del ensayo. La cepa *P. aeruginosa* ATCC-27853 fue utilizada como control negativo.

5.5 Evaluación del rol de la proteína Sip en la adherencia e invasión de células eucariontes *in vitro*

Finalizadas las etapas de caracterización genética y microbiológica de las cepas BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre y mutante *sip*, se evaluó su fenotipo de adherencia e invasividad *in vitro* usando la línea celular HeLa. La cepa *L. lactis* subsp. *cremonis* NZ9000 fue utilizada como control positivo en el ensayo de adherencia y como control negativo en el ensayo de invasión.

Se realizaron 8 ensayos independientes sin réplicas para determinar la capacidad de adherencia e invasión celular de cada cepa. A partir de los resultados obtenidos, se observó una diferencia estadísticamente significativa en el ensayo de adherencia entre la cepa silvestre y mutante *sip*. Para confirmar la observación, se realizaron 3 ensayos independientes adicionales para el ensayo de adherencia. La diferencia entre los porcentajes de adherencia calculada resultó estadísticamente significativa entre las variables BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre y mutante *sip* (**Figura 22A**). Por otro lado, se observó un mayor porcentaje de UFC recuperadas desde los ensayos de invasión en la cepa silvestre pero sin una diferencia estadísticamente significativa respecto de la cepa mutante *sip* (**Figura 22B**). En ambos grupos, la prueba estadística utilizada fue una comparación múltiple de Tukey. De acuerdo a estos resultados, la proteína Sip podría estar implicada en el mecanismo de adherencia de *S. agalactiae* en células eucariontes y no estaría cumpliendo algún rol en el mecanismo de invasión celular.

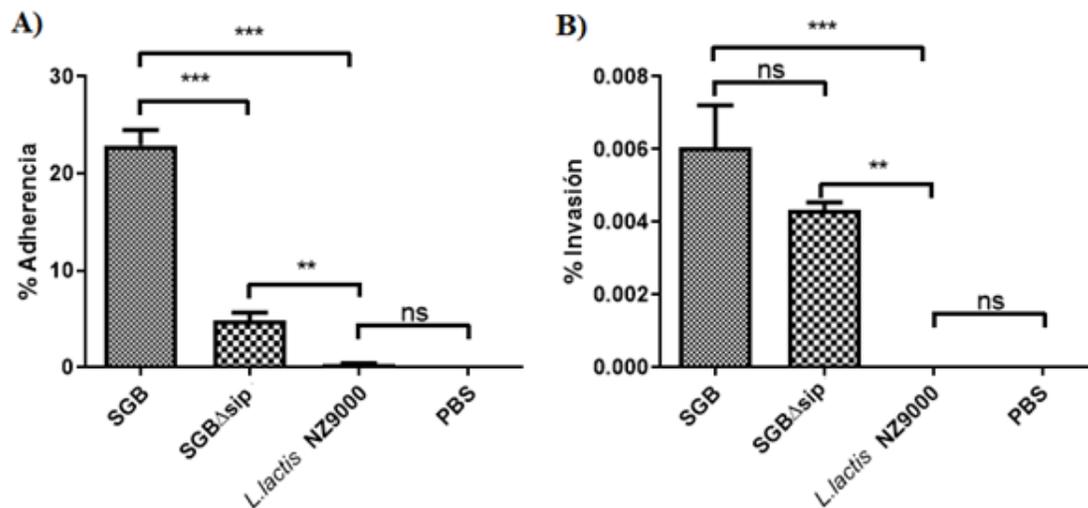


Figura 22. Ensayos de adherencia e invasión celular. **A)** Representación gráfica de los datos obtenidos desde los ensayos de adherencia (n=11); y **B)** representación gráfica de los datos obtenidos desde los ensayos de invasión (n=8). SGB: *S. agalactiae* BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre; SGB Δ sip: *S. agalactiae* BIOTEC.ISPCH/2015 mutante sip; *L. lactis* NZ9000: *L. lactis* subsp. *cremonis* NZ9000; PBS fue utilizado como control negativo de crecimiento y como control de contaminación cruzada durante el ensayo. Los porcentajes de células recuperadas en los ensayos se calcularon de acuerdo al inóculo inicial de bacterias por pocillo (2×10^6 UFC). [(*, $p < 0,05$), (**, $p < 0,001$), (***, $p < 0,0001$), (ns: no significativo), ANOVA de una vía con un test de comparación múltiple de Tukey].

VI. DISCUSIÓN

S. agalactiae causa enfermedades neonatales que pueden generar la muerte de los recién nacidos (12). También es aceptada su participación como patógeno causante de la muerte fetal o parto prematuro luego de permanecer de manera intermitente como agente colonizador en el tracto genital de las madres durante la gestación (16). La morbilidad y mortalidad provocadas por esta bacteria constituyen un problema de salud pública importante en la población. Las guías para la prevención de enfermedades neonatales han resultado exitosas para disminuir la incidencia de la EOD, mientras que la LOD se ha mantenido en el tiempo (12). Sin embargo, una de las desventajas de estas estrategias es la selección de cepas resistentes por el uso de carácter profiláctico de antibióticos y los eventuales *shocks* anafilácticos por alergia a la penicilina de la madre gestante (72). En ese sentido, el desarrollo de vacunas contra *S. agalactiae* en mujeres gestantes o en edad fértil sería una valiosa herramienta para combatir la muerte fetal, parto prematuro e infección del neonato. Por lo anterior, en 2017 la Organización Mundial de la Salud realizó un llamado a desarrollar vacunas para esta población objetivo. A la fecha no hay vacunas licenciadas contra *S. agalactiae*, pero sí avances en prototipos en distintas etapas de desarrollo (73). Una de ellas es un prototipo de vacuna oral en base la proteína Sip (50). Esta proteína de función desconocida es altamente inmunogénica y ha demostrado ser un buen blanco vacunal.

El gen que codifica la proteína Sip está presente en todos los serotipos de *S. agalactiae* y solo en seis genomas completos secuenciados no está contenido (49). Se conocen algunas propiedades de la proteína Sip, tales como: su localización en la superficie bacteriana, inmunogenicidad y capacidad de adyuvante (43,45,46). Investigaciones previas basadas en el estudio de la funcionalidad de las proteínas de superficie de *S. agalactiae*, demuestran que la estrategia de delección de los genes que las codifican entregan información importante para comprender la interacción de estas moléculas con el hospedero (37,74,75). Estos modelos *in vitro* han sido realizado en líneas celulares epiteliales y endoteliales humanas, tales como; células epiteliales basales alveolares humanas de la línea A549, células endoteliales de cerebro de la línea hCMEC/D3, células de adenocarcinoma cervical de la línea HeLa y células de adenocarcinoma colorrectal humano de la línea Caco-2 (33,37,74,75).

Los métodos de mutagénesis dirigida en *S. agalactiae* han sido desarrollados mayormente en base al uso de vectores suicidas. Estos vectores tienen como principal característica la de no replicarse a temperaturas restrictivas, lo cual permite que estas moléculas se inserten en cromosoma bacteriano mediante un evento de recombinación, para luego generar una delección/inserción específica tras un segundo evento de recombinación (53,64). La principal dificultad de estas metodologías está en la selección final de las mutantes, ya que en este punto es posible obtener colonias con distintos genotipos, además de las colonias de interés (68). Recientemente, Hooven y colaboradores (2019) desarrollaron y reportaron la modificación genética del vector termosensible pHY304 mediante el clonamiento del promotor p23 y el gen *sacB* que codifica una levansacarasa. El método desarrollado es muy versátil, ya que utiliza un vector de amplio rango de hospederos (pMBsacB), pudiendo replicarse entre los 28 y 37°C. Los productos de este método pueden ser una delección, inserción, delección/inserción, o incluso el cambio en una sola base del genoma bacteriano. En todas las opciones es posible obtener un producto limpio en términos de especificidad en el locus de interés. En esta tesis, se eliminó por completo el ORF del gen *sip* del genoma de una cepa clínica de *S. agalactiae* utilizando este método, y el producto obtenido fue una delección limpia de la secuencia blanco; desde el codón de inicio (ATG) al codón de término (TAA). No se modificó, por inserción o delección, ningún otro locus del cromosoma bacteriano, debido a que los brazos de homología utilizados, río arriba y río abajo, fueron de 1000 y 1001 pb, respectivamente, lo que proporcionó una alta especificidad de locus al sistema. Esto es muy importante en la etapa en que el vector entra al cromosoma en la primera recombinación.

Un punto importante de este método, que lo diferencia de otras estrategias de recombinación con vectores suicidas, es la contraselección con sacarosa (64). La selección de colonias de interés posterior al segundo evento de recombinación puede ser altamente laboriosa, ya que en este paso es posible obtener colonias con el genotipo mutante que aún mantengan el vector en el citoplasma o colonias que no realizaron el segundo evento de entrecruzamiento y que mantengan el vector en el cromosoma (64,68). Además de las colonias con genotipo silvestre que no hayan realizado el segundo evento de entrecruzamiento y que luego hubieran perdido el vector en los sucesivos pasajes. Para una selección exclusiva de las colonias con el genotipo de interés, el método permite insertar un marcador de resistencia a un antibiótico al

cual la cepa silvestre es sensible, lo que sumado a la contraselección con sacarosa por medio de la enzima levansacarasa codificada en el gen *sacB*, permite seleccionar en un 100% de colonias con el genotipo mutante de interés. En esta tesis, un error en el paso de solicitud de síntesis de la secuencia de recombinación, generó que la secuencia del ORF del gen *cat* fuese sintetizada de manera incompleta con tan solo 576 pb, en lugar de los 660 pb que originalmente codifican la enzima cloranfenicol acetiltransferasa. No obstante, los subcultivos sucesivos y mayoritariamente la contraselección con sacarosa fueron suficientes para seleccionar colonias con genotipo mutante. En el último paso de selección, se observó un 20% de colonias con el genotipo mutante versus un 80% de colonias con el genotipo silvestre a partir de dos ensayos independientes. La contraselección con sacarosa eliminó todas aquellas colonias que mantenían el vector en su cromosoma o en el citoplasma. Con un vector suicida sin la selección por sacarosa, y con la expresión de una cloranfenicol acetiltransferasa trunca y no funcional, la selección de una colonia con el genotipo mutante de interés no hubiera sido posible (64).

Durante el proceso de generación de la mutagénesis se logró observar una serie de elementos que deben ser considerados para el éxito del mismo. Al momento de diseñar la secuencia de recombinación, en este caso una secuencia sintética, es recomendable contar con la secuenciación del genoma de la cepa en la que se requiere generar la mutagénesis. En caso contrario, el uso de secuencias de referencia son una alternativa bastante útil. Para la ejecución de este método, el uso de una secuencia de recombinación sintética puede resultar una alternativa costosa, pero con la ventaja que es menos laboriosa. Por otro lado, la construcción de una secuencia de recombinación mediante la técnica de *overlap extension* PCR (OE-PCR), tiene como ventaja un menor costo, pero sin lugar a dudas es más laborioso (64). Además, esta última estrategia requiere de un diseño de partidores altamente específicos para generar los solapamientos entre los productos de PCR iniciales. También requiere de pasos previos de clonamiento y subclonamientos, a diferencia de la síntesis química. Una ventaja de la construcción de una secuencia de recombinación por OE-PCR, es que los brazos de homología tendrán un 100% de identidad dado que se obtienen directamente del genoma de la cepa que se desea mutar. Pero una desventaja importante es la limitada disposición que puede tener un laboratorio de cepas bacterianas que contengan algún gen de resistencia

adecuado para la cepa blanco de la mutagénesis, mientras que con la síntesis química esta limitación no existe.

De acuerdo a lo observado, una de las características que debe tener la bacteria en la que se desarrollará la mutagénesis, es que el rango de temperatura de crecimiento esté entre los 28 y 40°C. *S. agalactiae* es una bacteria mesófila que se desarrolla hasta los 45°C y cuya temperatura óptima de crecimiento es 30°C (76). Los autores Hooven y colaboradores (2019), reportaron que a 37°C era posible generar el primer evento de recombinación o inserción del vector pMBSacB en el cromosoma de *S. agalactiae*, pero durante la reproducción del método esto no fue posible, debiendo aumentarse en 3°C la temperatura para propiciar este evento (64). Posibles eventos de mutaciones por subcultivos sucesivos y trabajo experimental previo a 37°C por parte de los desarrolladores del vector, podrían haber favorecido la termoestabilidad del origen de replicación del vector. Igualmente, Maguin y colaboradores (1992) reportaron que el vector pGK12, derivado del vector pWVO1, se replicaba hasta los 37,5°C, manteniéndose la población bacteriana luego de 8 horas de incubación con selección de eritromicina (77,78). El vector utilizado en esta tesis (pMBSacB) también es un derivado del vector pWVO1 y los desarrolladores declaran que mantiene el origen de replicación termosensible del vector de origen (64). Otros autores no se refieren en detalle a las etapas de recombinación al utilizar el vector pMBSacB en la generación de mutagénesis (79,80). Una vez ajustada la temperatura a 40°C, se logró obtener un 80% de colonias con primer entrecruzamiento positivo. No obstante, el PCR de confirmación del primer evento de recombinación y la verificación de la funcionalidad de la levansacarasa son ineludibles y no se recomienda realizar los ensayos para el segundo evento de recombinación sin una caracterización previa de una colonia con PCR positivo y demostrada sensibilidad a sacarosa.

Este sistema de mutagénesis tiene como dificultad la baja eficiencia en la transformación con el vector pMBSacB y sus derivados, tanto en *E. coli* como en *S. agalactiae*, por su bajo número de copias. Adicionalmente, por tratarse de una bacteria Gram positivo, *S. agalactiae* representa un reto natural para incorporar ADN foráneo, lo que dificulta los estudios genéticos en este microorganismo. La gruesa capa de peptidoglicano en su pared celular se considera una barrera potencial para la captación de ADN y la transformación de *S. agalactiae* no puede ocurrir de forma natural, pero puede lograrse mediante transformación

de protoplastos por electroporación (81). En este punto, los trabajos de Holo y Nes y (1989) y Framson y colaboradores (1997) constituyeron la base experimental para el éxito en la transformación de *S. agalactiae* por electroporación (69,70). Sin embargo, algunas modificaciones, tales como: utilizar un medio rico (caldo TH) en la preparación de las células electrocompetentes y en la recuperación, y el añadir 5% de sangre de cordero al agar tripticasa de soya suplementado con eritromicina aumentó considerablemente el rendimiento en la obtención de transformantes (**Figura 12A**), ya que inicialmente se obtuvieron de 1 a 5 colonias por placa.

Por otro lado, una vez generada la mutagénesis, se realizaron ensayos microbiológicos y genéticos que caracterizaron tanto el fenotipo como genotipo de las cepas silvestre y la mutante *sip*. El fenotipo de la cepa mutante *sip* no evidenció diferencias en términos de su perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos penicilina, tetraciclina, ofloxacino, levofloxacino, vancomicina, eritromicina y clindamicina. Además, no se observó diferencia en la cinética de crecimiento en medio rico respecto de la cepa silvestre, así como en la capacidad de expresar el factor CAMP. Respecto al genotipo, los genomas correspondientes a las cepas BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre y mutante *sip* que se obtuvieron mediante secuenciación masiva, evidenciaron que la única diferencia entre ambos era la ausencia del gen *sip* y la inserción de la secuencia parcial del ORF del gen *cat* (576 pb) en el locus del primero.

Finalmente, los ensayos de adherencia e invasión a la línea celular HeLa con las cepas silvestre y mutante *sip*, permitieron evaluar y comparar entre ellas el efecto de eliminar el gen que codifica la proteína Sip. En el ensayo de invasión se observó una mayor cantidad de bacterias que consiguieron ingresar a la célula hospedera (media: 0,007%±0,0025% de desviación estándar [SD]) en comparación con la cepa mutante *sip* (0,005%±0,0014% SD). Sin embargo, y de acuerdo al análisis estadístico, esta diferencia no fue significativa (p -value >0,05) (**Figura 22B**). La capacidad de invasión de *S. agalactiae* en células epiteliales y endoteliales está altamente estudiada, y en todos estos reportes los porcentajes son menores al 1% respecto del inóculo inicial. Schubert y colaboradores (2004) evaluaron el rol de la proteína FbsA en cinco cepas diferentes de *S. agalactiae* mediante la delección del gen *fbsA*, reportando porcentajes de UFC recuperadas entre <0,01% hasta 0,05% en las cepas silvestres desde los ensayos de invasión en la línea celular A549 (74). Por otro lado, Gutekunst y

colaboradores (2004) evaluaron el rol de la proteína FbsB por delección del gen *fbkB* en la misma línea celular (A549), reportando <0,08% de UFC recuperadas del ensayo de invasión (32). Similares observaciones fueron reportados por Buscetta y colaboradores (2016) cuando evaluaron el rol de la proteína PbsP, con <0,5% de UFC recuperadas desde la línea de células endoteliales del cerebro hCMEC/D3 (37). Estos reportes evidencian la variabilidad en la capacidad de invasión de las diferentes cepas.

Por otro lado, en los ensayos de adherencia se observó una mayor diferencia entre los porcentajes de UFC recuperadas entre la cepa silvestre y mutante *sip*, con una media de $22,9\% \pm 5,3\%$ SD y $4,8\% \pm 2,8\%$ SD, respectivamente. El análisis estadístico de comparación múltiple de Tukey entregó un p -value <0,0001 entre ambas variables (**Figura 22A**). En estudios previos en los que se identificaron las principales proteínas de superficie con funcionalidad como adhesinas en *S. agalactiae*, las diferencias entre los porcentajes de UFC recuperadas de los ensayos es considerablemente variable. Schubert y colaboradores (2004) eliminaron el gen *fbxA* en las cepas 706 S2, O176 H4A, 6313, SS1169 y O90R, observando una diferencia cercana a las 10 veces entre las cepas silvestres y las mutantes respectivas (74). De estos aislados, la cepa silvestre con mayor porcentaje de recuperación de UFC correspondió a 6313 (10%). A partir del aislado 6313 (serotipo III, CC23), Gutekunst y colaboradores (2004) estudiaron el rol de la proteína FbsB en la adherencia e invasión de la línea celular A549, observándose únicamente una diferencia en la recuperación de UFC desde los ensayos de invasión (4 veces) (32). Por otra parte, en los ensayos de adherencia se observó una media de 8% de recuperación de UFC en la cepa silvestre y mutante a partir de tres ensayos independientes en triplicado. Luego, Buscetta y colaboradores (2014), eliminaron el gen *fbxC* en la cepa de referencia NEM316 y evaluaron el rol de esta proteína en ensayos de adherencia e invasión en las líneas celulares Caco-2 y A549 (33). Los autores reportaron de 2 y 3,3 veces de diferencia entre la recuperación de UFC de la cepa silvestre y mutante, en las líneas Caco-2 y A549, respectivamente. Posteriormente, Buscetta y colaboradores (2016) utilizaron la misma cepa de referencia (NEM316) para estudiar el rol de la proteína PbsP en la adherencia e invasión en la línea celular hCMEC/D3 mediante la delección del gen que la codifica y observaron una diferencia de solo un punto porcentual entre la cepa silvestre y la mutante *pbsP* (37).

Sin lugar a dudas, el estudio de los componentes de la superficie celular de *S. agalactiae* es importante del punto de vista inmunológico para búsqueda de blancos vacunales, pero también por su relevancia en la patogénesis de la bacteria (73). La presencia de estos genes codificantes de proteínas de superficie propician la adherencia a los distintos componentes de la ECM promoviendo la persistencia de la bacteria como agente colonizador y patógeno oportunista (16,27).

De acuerdo a los resultados, estos sugieren que la proteína Sip no sería parte de los mecanismos de invasión celular de la bacteria, pero sí tendría un rol importante en la adherencia de *S. agalactiae* en las células del hospedero. Por lo anterior, una proyección para robustecer estas observaciones debe considerar dos aspectos importantes: i) realizar ensayos de unión a los componentes de la ECM para determinar el ligando específico al cual se estaría uniendo la proteína, suponiendo una hipótesis en la cual la proteína Sip fuese una adhesina; y ii) realizar una complementación de la cepa mutante *sip*, ya sea mediante la transformación con un vector que contenga una copia funcional del gen *sip* o integrando en el cromosoma una copia funcional del gen *sip* (Anexo 3), con la finalidad de visualizar que el fenotipo de adherencia se recupera de manera parcial o total, respecto de la cepa mutante.

VII. CONCLUSIONES

- ✓ El método de mutagénesis dirigida basado en el vector suicida pMBSacB generó una deleción/inserción específica en el locus de interés, obteniéndose una mutante estable de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 de *S. agalactiae* que presenta una deleción del ORF del gen *sip* e incorpora en su reemplazo una secuencia de ADN exógena.
- ✓ Las caracterizaciones microbiológicas y genéticas sugieren que la ausencia del gen *sip* no afecta el desarrollo de la bacteria mutante a nivel *in vitro* y que no hubo modificaciones inespecíficas por inserción o deleción en otros locus del genoma de la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 de *S. agalactiae*.
- ✓ La ausencia de la proteína Sip en la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 de *S. agalactiae* no modificó su capacidad de invasión en la línea celular HeLa.
- ✓ La cepa BIOTEC.ISPCH/2015 mutante *sip* presenta un fenotipo de adherencia atenuado respecto a la cepa silvestre, lo que sugiere que la proteína Sip participa en la capacidad de adherencia de la bacteria a las células epiteliales, de acuerdo al modelo estudiado.

VIII. REFERENCIAS

1. James H. Jorgensen and Michael A. Pfallerc. Manual of Clinical Microbiology [Internet]. 2015. 383–402 p. Available from: <http://estore.asm.org>
2. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. *Streptococcus* Adherence and Colonization. Microbiol Mol Biol Rev. 2009;73(3):407–50.
3. Lancefield BYRC, Hare R. The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of hemolytic *Strptococci* from parurient women* (From the Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research , New York , and the Bernhard Baron Memorial Research Laborato. 1934;61(3):335–49.
4. Slotved HC, Kong F, Lambertsen L, Sauer S, Gilbert GL. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. J Clin Microbiol. 2007;45(9):2929–36.
5. Patras KA, Nizet V. Group B Streptococcal maternal colonization and neonatal disease: Molecular mechanisms and preventative approaches. Front Pediatr. 2018;6(27).
6. Francois Watkins LK, McGee L, Schrag SJ, Beall B, Jain JH, Pondo T, et al. Epidemiology of Invasive Group B Streptococcal Infections among Nonpregnant Adults in the United States, 2008-2016. JAMA Intern Med. 2019;179(4):479–88.
7. Nagao PE. *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococci*). In: *Molecular Medical Microbiology*: Second Edition. 2014.
8. 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;19(1):1009.
9. McGee L, Chochua S, Li Z, Mathis S, Rivers J, Metcalf B, et al. Multistate, Population-Based Distributions of Candidate Vaccine Targets, Clonal Complexes, and Resistance Features of Invasive Group B *Streptococci* within the United States, 2015-2017. Clin Infect Dis. 2021;72(6):1004–13.
10. Seale AC, Bianchi-Jassir F, Russell NJ, Kohli-Lynch M, Tann CJ, Hall J, et al. Estimates of the Burden of Group B Streptococcal Disease Worldwide for Pregnant Women, Stillbirths, and Children. Clin Infect Dis. 2017;65(suppl_2):S200–19.
11. Zhu Y, Lin XZ. Updates in prevention policies of early-onset group B streptococcal

- infection in newborns. *Pediatrics and Neonatology*. 2021;62(5):465–75.
12. Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Morbidity and Mortality Weekly Report Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. Revised guidelines from CDC, 2010. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2010;59(RR10):1–32.
 13. Committee on Obstetric Practice. Prevention of Early-onset Neonatal Group B Streptococcal Disease: Green-top Guideline No. 36. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2017;124(12):e280–305.
 14. Farías M, Rodríguez A, Díaz-Dinamarca D, Soto D, Bastías D, Quezada M, et al. Estudio de la portación de *Streptococcus agalactiae* en mujeres embarazadas atendidas en el Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica de Chile durante 2011-17. *Rev Inst Salud Pública Chile*. 2018;2(2):11–7.
 15. Abarzúa F, Argomedo C, Meissner A, Díaz T, Garrido P, Fariña S, et al. 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. *Rev Chil Infectol*. 2014;31(3):305–8.
 16. Armistead B, Oler E, Adams Waldorf K, Rajagopal L. The Double Life of Group B Streptococcus: Asymptomatic Colonizer and Potent Pathogen. *Journal of Molecular Biology*. 2019. p. 2914–31.
 17. Hansen SM, Uldbjerg N, Kilian M, Sørensen UBS. Dynamics of *Streptococcus agalactiae* Colonization in Women during and after Pregnancy and in Their Infants. *J Clin Microbiol*. 2004;42(1):83–9.
 18. Rajagopal L. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. *Future Microbiol*. 2009;4(2):201–21.
 19. Wilson C, Nizet V, Maldonado Y, Remington J, Krupp MA, Klein J. Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 2011. 419–469 p.
 20. Vornhagen J, Armistead B, Santana-Ufret V, Gendrin C, Merillat S, Coleman M, et al. Group B *Streptococcus* exploits vaginal epithelial exfoliation for ascending infection. *J Clin Invest*. 2018;128(5):1985–1999.
 21. Amabebe E, Anumba DOC. The vaginal microenvironment: The physiologic role of Lactobacilli. *Frontiers in Medicine*. 2018. p. 5:181.

22. Wang NY, Patras KA, Seo HS, Cavaco CK, Rösler B, Neely MN, et al. Group B streptococcal serine-rich repeat proteins promote interaction with fibrinogen and vaginal colonization. In: *Journal of Infectious Diseases*. 2014. p. 210(6):982-91.
23. De Gaetano GV, Pietrocola G, Romeo L, Galbo R, Lentini G, Giardina M, et al. The *Streptococcus agalactiae* cell wall-anchored protein PbsP mediates adhesion to and invasion of epithelial cells by exploiting the host vitronectin/ α vintegrin axis. *Mol Microbiol*. 2018;110(1):82–94.
24. Silverthorn DU, Silverthorn DU. *Fisiología Humana. Un enfoque integrado* 6a edición. *Fisiología humana : un enfoque integrado*. 2008. 78 p.
25. Pereira M, Rybarczyk BJ, Odrlijin TM, Hocking DC, Sottile J, Simpson-Haidaris PJ. The incorporation of fibrinogen into extracellular matrix is dependent on active assembly of a fibronectin matrix. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 3):609–17.
26. Maisey HC, Doran KS, Nizet V. Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence – CORRIGENDUM. *Expert Rev Mol Med*. 2008;(10):e27.
27. Shabayek S, Spellerberg B. Group B streptococcal colonization, molecular characteristics, and epidemiology. *Frontiers in Microbiology*. 2018. p. 9:437.
28. Leitão JH. Microbial virulence factors. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. p. 21(15): 5320.
29. Six A, Bellais S, Bouaboud A, Fouet A, Gabriel C, Tazi A, et al. Srr2, a multifaceted adhesin expressed by ST-17 hypervirulent Group B *Streptococcus* involved in binding to both fibrinogen and plasminogen. *Mol Microbiol*. 2015;97(6):1209–1222.
30. Tazi A, Disson O, Bellais S, Bouaboud A, Dmytruk N, Dramsi S, et al. The surface protein HvgA mediates group B *Streptococcus* hypervirulence and meningeal tropism in neonates. *J Exp Med*. 2010;207(11):2313-22.
31. Dobrut A, Brzywczy-Włoch M. Immunogenic Proteins of Group B *Streptococcus*— Potential Antigens in Immunodiagnostic Assay for GBS Detection. *Pathogens*. 2022;11(1).
32. Gutekunst H, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ. The novel fibrinogen-binding protein FbsB promotes *Streptococcus agalactiae* invasion into epithelial cells. *Infect Immun*. 2004;72(6):3495–504.

33. Buscetta M, Papasergi S, Firon A, Pietrocola G, Biondo C, Mancuso G, et al. FbsC, a novel fibrinogen-binding protein, promotes *Streptococcus agalactiae*-host cell interactions. *J Biol Chem*. 2014;289(30):21003–15.
34. Gutekunst H, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ. Analysis of RogB-controlled virulence mechanisms and gene expression in *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun*. 2003;71(9):5056–5064.
35. Seo HS, Minasov G, Seepersaud R, Doran KS, Dubrovskaya I, Shuvalova L, et al. Characterization of fibrinogen binding by glycoproteins Srr1 and Srr2 of *Streptococcus agalactiae*. *J Biol Chem*. 2013;288(50):35982–96.
36. Chaze T, Guillot A, Valot B, Langella O, Chamot-Rooke J, Di Guilmi AM, et al. O-glycosylation of the N-terminal region of the serine-rich adhesin Srr1 of *Streptococcus agalactiae* explored by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13(9):2168–82.
37. Buscetta M, Firon A, Pietrocola G, Biondo C, Mancuso G, Midiri A, et al. PbsP, a cell wall-anchored protein that binds plasminogen to promote hematogenous dissemination of group B *Streptococcus*. *Mol Microbiol*. 2016;101(1):27–41.
38. Lentini G, Midiri A, Firon A, Galbo R, Mancuso G, Biondo C, et al. The plasminogen binding protein PbsP is required for brain invasion by hypervirulent CC17 Group B *streptococci*. *Sci Rep*. 2018;8(1):14322.
39. Coppolino F, Romeo L, Pietrocola G, Lentini G, De Gaetano GV, Teti G, et al. Lysine Residues in the MK-Rich Region Are Not Required for Binding of the PbsP Protein From Group B *Streptococci* to Plasminogen. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:679792.
40. Soto DA, Altamirano MJ, Díaz-Dinamarca DA, Leyton YY, Fernández JO, Lagos JW, et al. Desarrollo de un modelo murino de colonización vaginal de *Streptococcus agalactiae* utilizando una cepa chilena aislada de un recién nacido con septicemia. *Rev del Inst Salud Pública Chile*. 2018;2(1):8–15.
41. Nobbs AH, Rosini R, Rinaudo CD, Maione D, Grandi G, Telford JL. Sortase A utilizes an ancillary protein anchor for efficient cell wall anchoring of pili in *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun*. 2008;76(8):3550–60.
42. Brodeur BR, Boyer M, Charlebois I, Hamel J, Couture F, Rioux CR, et al.

- Identification of group B streptococcal sip protein, which elicits cross-protective immunity. *Infect Immun.* 2000;68(10):5610–5618.
43. Rioux S, Martin D, Ackermann HW, Dumont J, Hamel J, Brodeur BR. Localization of surface immunogenic protein on group B *Streptococcus*. *Infect Immun.* 2001;69(8):5162-5.
 44. Vidová B, Chotár M, Godány A. N-terminal anchor in surface immunogenic protein of *Streptococcus agalactiae* and its influence on immunity elicitation. *Folia Microbiol (Praha).* 2009;54(2):161-6.
 45. Diaz-Dinamarca DA, Manzo RA, Soto DA, Avendaño-Valenzuela MJ, Bastias DN, Soto PI, et al. Surface immunogenic protein of *Streptococcus* group b is an agonist of toll-like receptors 2 and 4 and a potential immune adjuvant. *Vaccines.* 2020;8(1):29.
 46. Díaz-Dinamarca DA, Jerias JI, Soto DA, Soto JA, Díaz N V., 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. *Mol Biotechnol.* 2018;60(3):215–25.
 47. Soto JA, Diaz-Dinamarca DA, Soto DA, Barrientos MJ, Carrión F, Kalergis AM, et al. Cellular immune response induced by surface immunogenic protein with AbISCO-100 adjuvant vaccination decreases group B *Streptococcus* vaginal colonization. *Mol Immunol.* 2019;111:198–204.
 48. Escobar DF, Diaz-Dinamarca DA, Hernández CF, Soto DA, Manzo RA, Alarcón PI, et al. Development and analytical validation of real-time PCR for the detection of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2020;20:352.
 49. Rothen J, Sapugahawatte DN, Li C, Lo N, Vogel G, Foucault F, et al. A simple, rapid typing method for *Streptococcus agalactiae* based on ribosomal subunit proteins by MALDI-TOF MS. *Sci Rep.* 2020;10:8788.
 50. Diaz-Dinamarca DA, Hernandez C, Escobar DF, Soto DA, Muñoz GA, Badilla JF, et al. Mucosal vaccination with *Lactococcus lactis*-secreting surface immunological protein induces humoral and cellular immune protection against group b *streptococcus* in a murine model. *Vaccines.* 2020;8(2):146.

51. Rubens CE, Wessels MR, Heggen LM, Kasper DL. Transposon mutagenesis of type III group B *Streptococcus*: correlation of capsule expression with virulence. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84(20):7208-12.
52. Weiser JN, Rubens CE. Transposon mutagenesis group B *Streptococcus* beta-hemolysin biosynthesis. Infect Immun. 1987;55(9):2314–6.
53. Yim HH, Rubens CE. Site-specific homologous recombination mutagenesis in group B streptococci. Methods Cell Sci. 1998;20:13–20.
54. Walker EA, Port GC, Caparon MG, Janowiak BE. Glutathione synthesis contributes to virulence of *Streptococcus agalactiae* in a murine model of sepsis. J Bacteriol. 2019;201(20):e00367-19.
55. Patras KA, Derieux J, Al-Bassam MM, Adiletta N, Vrbanac A, Lapek JD, et al. Group B *Streptococcus* Biofilm Regulatory Protein A Contributes to Bacterial Physiology and Innate Immune Resistance. J Infect Dis. 2018;218(10):1641–52.
56. Pritzlaff CA, Chang JCW, Kuo SP, Tamura GS, Rubens CE, Nizet V. Genetic basis for the β -haemolytic/cytolytic activity of group B *Streptococcus*. Mol Microbiol. 2001;39(2):236–47.
57. Spencer BL, Deng L, Patras KA, Burcham ZM, Sanches GF, Nagao PE, et al. Cas9 contributes to group b streptococcal colonization and disease. Front Microbiol. 2019;10:1930.
58. Mu R, Cutting AS, Rosario Y Del, Villarino N, Stewart L, Weston TA, et al. Identification of CiaR regulated genes that promote group b streptococcal virulence and interaction with brain endothelial cells. PLoS One. 2016;11(4):e0153891.
59. Cieslewicz MJ, Kasper DL, Wang Y, Wessels MR. Functional analysis in type Ia group B *Streptococcus* of a cluster of genes involved in extracellular polysaccharide production by diverse species of streptococci. J Biol Chem. 2001;276(1):139-46.
60. Fernandez A, Lechardeur D, Derré-Bobillot A, Couvé E, Gaudu P, Gruss A. Two coregulated efflux transporters modulate intracellular heme and protoporphyrin ix availability in *Streptococcus agalactiae*. PLoS Pathog. 2010;6(4):e1000860.
61. Nair S, Poyart C, Beretti JL, Veiga-Fernandes H, Berche P, Trieu-Cuot P. Role of the *Streptococcus agalactiae* ClpP serine protease in heat-induced stress defence and growth arrest. Microbiology. 2003. p. 407–17.

62. Pérez-Pascual D, Gaudu P, Fleuchot B, Besset C, Rosinski-Chupin I, Guillot A, et al. RovS and its associated signaling peptide form a cell-to-cell communication system required for *Streptococcus agalactiae* pathogenesis. *MBio*. 2015;6(1):e02306-14.
63. Moulin P, Rong V, Ribeiro Silva A, Pederick VG, Camiade E, Mereghetti L, et al. Defining the role of the *Streptococcus agalactiae* Sht-family proteins in zinc acquisition and complement evasion. *J Bacteriol*. 2019;201(8):e00757-18.
64. Hooven TA, Bonakdar M, Chamby AB, Ratner AJ. A counterselectable sucrose sensitivity marker permits efficient and flexible mutagenesis in *Streptococcus agalactiae*. *Appl Environ Microbiol*. 2019;85(7):e03009-18.
65. Phillips GJ. New cloning vectors with temperature-sensitive replication. *Plasmid*. 1999;41(1):78–81.
66. Leenhouts KJ, Tolner B, Bron S, Kok J, Venema G, Seegers JFML. Nucleotide sequence and characterization of the broad-host-range lactococcal plasmid pWV01. *Plasmid*. 1991;26(1):55–66.
67. Pelicic V, Reyrat JM, Gicquel B. Expression of the *Bacillus subtilis* sacB gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J Bacteriol*. 1996;178(4):1197–9.
68. Li XT, Thomason LC, Sawitzke JA, Costantino N, Court DL. Positive and negative selection using the tetA-sacB cassette: Recombineering and P1 transduction in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(22):1–8.
69. Holo H, Nes IF. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl Environ Microbiol*. 1989;55(12):3119–3123.
70. Framson PE, Nittayajarn A, Merry J, Youngman P, Rubens CE. New genetic techniques for group B *Streptococci*: High-efficiency transformation, maintenance of temperature-sensitive pWV01 plasmids, and mutagenesis with Tn917. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63(9):3539–47.
71. Picard FJ, Gagnon M, Bernier MR, Parham NJ, Bastien M, Boissinot M, et al. Internal control for nucleic acid testing based on the use of purified *Bacillus atrophaeus* subsp. *globigii* spores. *J Clin Microbiol*. 2009;47(3):751–7.
72. Schrag SJ, Verani JR. Intrapartum antibiotic prophylaxis for the prevention of perinatal group B streptococcal disease: Experience in the United States and

- implications for a potential group B streptococcal vaccine. *Vaccine*. 2013. p. D20-6.
73. Carreras-Abad C, Ramkhelawon L, Heath PT, Doare K Le. A vaccine against group b *Streptococcus*: Recent advances. *Infection and Drug Resistance*. 2020. p. 1263–1272.
 74. Schubert A, Zakikhany K, Pietrocola G, Meinke A, Speziale P, Eikmanns BJ, et al. The fibrinogen receptor FbsA promotes adherence of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells. *Infect Immun*. 2004;72(11):6197–205.
 75. Lalioui L, Pellegrini E, Dramsi S, Baptista M, Bourgeois N, Doucet-Populaire F, et al. The SrtA sortase of *Streptococcus agalactiae* is required for cell wall anchoring of proteins containing the LPXTG motif, for adhesion to epithelial cells, and for colonization of the mouse intestine. *Infect Immun*. 2005;73(6):3342–50.
 76. Laith AA, Ambak MA, Hassan M, Sherif SM, Nadirah M, Draman AS, et al. Molecular identification and histopathological study of natural *Streptococcus agalactiae* infection in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vet World*. 2017;10(1):101–11.
 77. Maguin E, Duwat P, Hege T, Ehrlich D, Gruss A. New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. *J Bacteriol*. 1992;174(17):5633–8.
 78. Kok J, Van Der Vossen JMBM, Venema G. Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 1984;48(4):726–731.
 79. Hu Y, Park N, Seo KS, Park JY, Somarathne RP, Olivier AK, et al. Pneumococcal surface adhesion A protein (PsaA) interacts with human Annexin A2 on airway epithelial cells. *Virulence*. 2021;12(1):1841–54.
 80. Dammann AN, Chamby AB, Catomeris AJ, Davidson KM, Tettelin H, Pijkeren JP Van, et al. Genome-Wide fitness analysis of group B *Streptococcus* in human amniotic fluid reveals a transcription factor that controls multiple virulence traits. *PLoS Pathog*. 2021;17(3):e1009116.
 81. Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. Glass bead transformation method for gram-positive Bacteria. *Brazilian J Microbiol*. 2009;40(4):923–926.

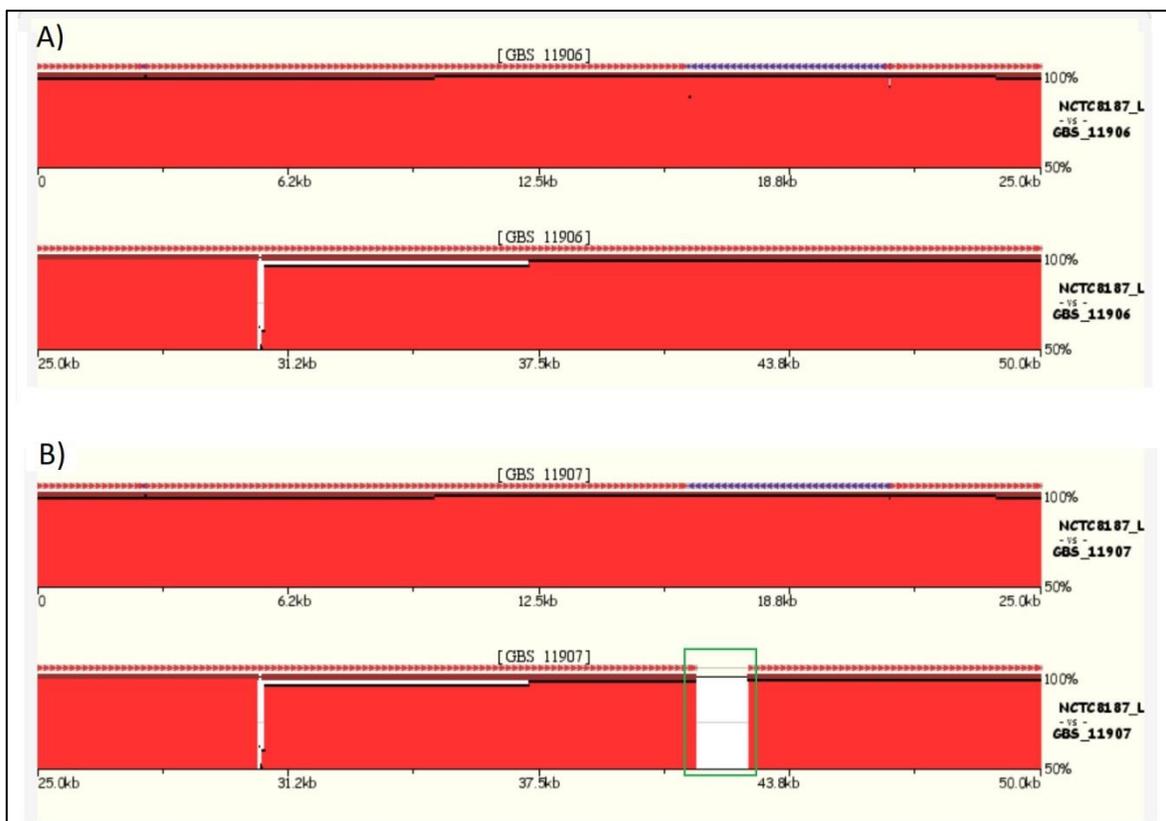
IX. ANEXOS

9.1 Anexo 1: Tabla 2H-1 *Streptococcus* spp. Grupo β-hemolítico (CLSI Guía M100, 31era edición)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL			Comments
			S	I	R	S	I	R	
PENICILLINS									
(6) An organism that is susceptible to penicillin can be considered susceptible to antimicrobial agents listed here when used for approved indications and does not need to be tested against those agents. For groups A, B, C, and G β-hemolytic streptococci, penicillin is tested as a surrogate for ampicillin, amoxicillin, amoxicillin-clavulanate, ampicillin-sulbactam, cefazolin, cefepime, ceftaroline, cephradine, cephalothin, cefotaxime, ceftriaxone, ceftizoxime, imipenem, ertapenem, and meropenem. For group A β-hemolytic streptococci, penicillin is also a surrogate for cefaclor, cefdinir, ceftroxi, ceftibuten, cefuroxime, and cefpodoxime.									
A	Penicillin or ampicillin	10 units	≥24	-	-	≤0.12	-	-	See general comment (4).
A		10 µg	≥24	-	-	≤0.25	-	-	
CEPHEMS (PARENTERAL) (Including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.)									
See comment (6).									
B	Cefepime or cefotaxime or ceftriaxone	30 µg	≥24	-	-	≤0.5	-	-	
B		30 µg	≥24	-	-	≤0.5	-	-	
B		30 µg	≥24	-	-	≤0.5	-	-	
C	Ceftaroline	30 µg	≥26	-	-	≤0.5	-	-	(7) Breakpoints are based on a dosage regimen of 600 mg administered every 12 h.
CARBAPENEMS									
See comment (6).									
O	Doripenem	-	-	-	-	≤0.12	-	-	
O	Ertapenem	-	-	-	-	≤1	-	-	
O	Meropenem	-	-	-	-	≤0.5	-	-	
GLYCOPEPTIDES									
B	Vancomycin	30 µg	≥17	-	-	≤1	-	-	
LIPOGLYCOPEPTIDES									
C	Dalbavancin	-	-	-	-	≤0.25	-	-	(8) For reporting against <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> , and <i>S. dysgalactiae</i> .
C	Oritavancin	-	-	-	-	≤0.25	-	-	
C	Telavancin	-	-	-	-	≤0.12	-	-	
LIPOPEPTIDES									
C	Daptomycin	-	-	-	-	≤1	-	-	(9) Daptomycin should not be reported for isolates from the respiratory tract.
Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL			Comments
			S	I	R	S	I	R	
MACROLIDES									
(10) Susceptibility and resistance to azithromycin, clarithromycin, and dirithromycin can be predicted by testing erythromycin.									
(11) Not routinely reported on isolates from the urinary tract.									
A	Erythromycin	15 µg	≥21	16-20	≤15	≤0.25	0.5	≥1	(12) Rx: Recommendations for intrapartum prophylaxis for group B streptococci are penicillin or ampicillin. Although cefazolin is recommended for penicillin-allergic women at low risk for anaphylaxis, those at high risk for anaphylaxis may receive clindamycin. Group B streptococci are susceptible to ampicillin, penicillin, and cefazolin, but may be resistant to erythromycin and clindamycin. When a group B <i>Streptococcus</i> is isolated from a pregnant woman with severe penicillin allergy (high risk for anaphylaxis), erythromycin and clindamycin (including ICR) should be tested, and only clindamycin should be reported. Erythromycin should be tested for ICR determination only and should not be reported. See Table 3I.
O	Azithromycin	15 µg	≥18	14-17	≤13	≤0.5	1	≥2	
O	Clarithromycin	15 µg	≥21	17-20	≤16	≤0.25	0.5	≥1	
O	Dirithromycin	15 µg	≥18	14-17	≤13	≤0.5	1	≥2	
TETRACYCLINES									
(13) Organisms that are susceptible to tetracycline are also considered susceptible to doxycycline and minocycline. However, resistance to doxycycline and minocycline cannot be inferred from tetracycline resistance.									
O	Tetracycline	30 µg	≥23	19-22	≤18	≤2	4	≥8	
FLUOROQUINOLONES									
C	Levofloxacin	5 µg	≥17	14-16	≤13	≤2	4	≥8	
O	Gatifloxacin	5 µg	≥21	18-20	≤17	≤1	2	≥4	
O	Grepafloxacin	5 µg	≥19	16-18	≤15	≤0.5	1	≥2	
O	Ofloxacin	5 µg	≥16	13-15	≤12	≤2	4	≥8	
O	Trovafoxacin	10 µg	≥19	16-18	≤15	≤1	2	≥4	
PHENICOLS									
C	Chloramphenicol	30 µg	≥21	18-20	≤17	≤4	8	≥16	See comment (11).
Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL			Comments
			S	I	R	S	I	R	
LINCOSAMIDES									
A	Clindamycin	2 µg	≥19	16-18	≤15	≤0.25	0.5	≥1	See comments (11) and (12).
(14) For isolates that test erythromycin resistant and clindamycin susceptible or intermediate, testing for ICR by disk diffusion using the D-zone test or by broth microdilution is required before reporting clindamycin. See Table 3I, Subchapter 3.9 in M02, ³ and Subchapter 3.12 in M07. ¹									
STREPTOGRAMINS									
O	Quinupristin-dalfopristin	15 µg	≥19	16-18	≤15	≤1	2	≥4	(15) For reporting against <i>S. pyogenes</i> only.
OXAZOLIDINONES									
(16) <i>S. agalactiae</i> and <i>S. pyogenes</i> that test susceptible to linezolid by MIC are also considered susceptible to tedizolid. However, some organisms that are nonsusceptible to linezolid may be susceptible to tedizolid.									
C	Linezolid	30 µg	≥21	-	-	≤2	-	-	(17) For reporting against <i>S. pyogenes</i> and <i>S. agalactiae</i> only.
C	Tedizolid	-	-	-	-	≤0.5	-	-	

Abbreviations: ATCC®, American Type Culture Collection; CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; I, intermediate; ICR, inducible clindamycin resistance; LHB, lysed horse blood; MHA, Mueller-Hinton agar; MIC, minimal inhibitory concentration; QC, quality control; R, resistant; S, susceptible.

9.2 Anexo 2



Alineamiento de genomas generado con el programa *Mulan*. Representación esquemática de los primeros 50 kb de los genomas de la secuencia de referencia, cepa y mutante *sip*. **A)** alineamiento entre la secuencia genómica de la cepa de referencia NCTC8187 (*GenBank* LS483387.1) y la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 silvestre (GBS_11906); **B)** alineamiento entre la secuencia de la cepa de referencia NCTC8187 (*GenBank* LS483387.1) y la cepa BIOTEC.ISPCH/2015 mutante *sip* (GBS_11906). Las columnas rojas representan la homología (>70%) entre las secuencias. El recuadro en verde en el panel **B** (entre los sitios 41400 y 42704), muestra una diferencia de secuencias en el locus del gen *sip* (homología <70%).

9.3 Anexo 3

(XhoI)CTCGAGTCAGCTCCTGTACAGAATCAATCTAGTAAATTTAAAAGTGTATCGAGTAGATGAATTACAAAAGGTTAATG
GTGTTTGGTTAGTCAAAAATAACACCCTAACGCCGACTGGGTTTGATTGGAACGATAATGGTATACCAGCATCAGAAATT
GATGAGGTTGATGCTAATGGTAATTTGACAGCTGACCAGGTTCTTCAAAAAGGTGGTTACTTTATCTTTAATCCTAAAAC
CTTAAGACTGTAGAAAAACCCATCCAAGGAACAGCTGGTTTAACTTTGGGCTAAGACACGCTTTGCTAATGGTAGTTCAGTT
TGGCTTCGCGTTGACAACAGTCAAGAAGTCTTTACAAAATAGTTTGAGGTATTGATTCATTGTTTTAAATGACAGTTTTGTT
ACTAACTAAGTACAATTTCTTTAAACCGTCTGAAAATAATTTTATA GTCCAGTAAAGTGTGATAT TATAGTCTCGGACTTA
TAAAAAGGA AATAGGAATTGAAGCAATGAAAAATGAATAAAAAGGTACTATTGACATCGACAATGGCAGCTTCGCTATTAT
CAGTCGCAAGTGTTC AAGCACAAGAAAACAGATACGACGTGGACAGCAGCTACTGTTTCAGAGGTAAGGC TGATTTGGTA
AAGCAAGACAATAAATCATCATATACTGTGAAATATGGTGATACACTAAGCGTTATTT CAGAAGCAATGTCAATTGATAT
GAATGTCTTAGCAAAAATTAATAACATTGCAGATATCAATCTTATTTATCTTGAGACAACACTGCAGTAACTTACGATCA
GAAGAGCTACTGCTACTTCAATGAAAATAGAAAACACCAGCAACAAATGCTGCTGGTCAAAACAACAGTACTGTCGATT
TGAAAACCAATCAAGTTTCTGTTGCAGACCAAAAAGTTTCTCTCAATACAATTTTCGGAAGGTATGACACCAGAAGCAGCA
ACAACGATTGTTTCGCCAATGAAGACATATTCTTCTGCGCCAGCTTTGAAAATCAAAAAGAAGTATTAGCACAAAGGGCAAGC
TGTTAGTCAAGCAGCAGCTAATGAACAGGTATCACCAGCTCTGTGAAGTCGATTACTTCAGAAAGTTCAGCAGCTAAAG
AGGAAGTTAAACCAACTCAGACGTCAGTCAGTCAGTCAACAACAGTATCACCAGCTTCTGTTGCCGCTGAAAACACCAGCT
CCAGTAGCTAAAGTAGCACCAGTAAAGAACTGTAGCAGCCCCTAGAGTGGCAAGTGTAAAGTAGTCACTCCTAAAAGTAGA
AACTGGTGCATCACCAGAGCATGTATCAGCTCCAGCAGTTCTGTGACTACGACTTCAACAGCTACAGACAGTAAAGTTAC
AAGCAGCTGAAGTTAAGAGCGTTCCGGTAGCACAAAAAGCTCCAACAGCAACACCGGTAGCACAAACCAGCTTCAACAAC
AAATGCAGTAGTGCACATCTGAAAATGCAAGGCTCCAACCTCATGTTGCAGCTTATAAAGAAAAAGTAGCGTCAACTT
ATGGAGTTAATGAATTCAGTACATACCGTGCAGGAGATCCAGGTGATCATGGTAAAGGTTTAGCAGTTGACTTTATTGTAG
GTAAAAACCAAGCACTTGGTAATGAAGTTGCACAGTACTTACACAAAAATATGGCAGCAAAAATTAACATTTCATATGTTATCT
GGCAACAAAAGTTTACTCAAAATACAAATAGTATTTATGGACCTGCTAATACTTGGAAATGCAATGCCAGATCGTGGTGGC
GTTACTGCCAACCACTATGACCACGTTACAGTATCATTTAACAATAA TATAAAAAAGGAAGCTATTTGGCTCTTTTTTAT
ATGCCTTGCATAGACTTTCAAGGTTCTTATCTAATTTTTATTAATGAGGAGATTAAGCTATAAGTCTGAAACTACTTTCA
CGTTAACCGTGACTAAATCAAAAACGTTAAAACCTAAAATCTAAGTCTGTAAAGATTATTGAAAACGCTTTAAAAATAGATA
TAATAAGGTTTGTAGATATCTAAAATTAAAAAAGATAAGGAAGTGAGAATATGCCACATCTAAGTAAAGAAGCTTTTAAA
AAGCAAAATAAAAAATGGCATTATTGTGTCATGTCAAGCTTTGCCTGGGAGCCTCTTTTACTGAAAGCGGAGGTGTTTAA
CCTCTTTTAGCTTTGGCAGCTCAAGAAGCAGGAGCGGTTGGTATAAAGAGCCAATAGTGTCCGCGACATTAAGGAAATCA
AGAAGTTACTAATTTACCTATCATCGCATTATTAACGTGAATATCCTCCACAAGAACCATTGCGGCCGC(NotI)

 Regiones -35 y -10 y primera base transcrita +1

 Secuencia *Shine-Dalgarno*

 ORF gen *sip*

 Señal de término de la transcripción

 Sitios de corte con enzimas restricción

Diseño de un *cassette* génico que permite la expresión de la proteína Sip al insertarse en el genoma de *S. agalactiae*.