

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



RESISTENCIA-SUSCEPTIBILIDAD DE
Streptococcus pneumoniae
SEROTIPIFICACION Y ANALISIS MOLECULAR

Por
ROSA MARIA HINOJOSA ROBLES

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con Especialidad en Microbiología Médica

Julio, 2005

TD

RC771

.H5

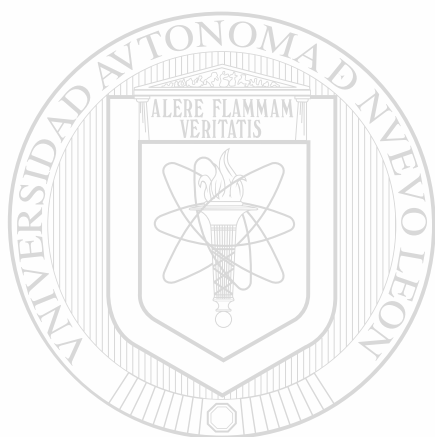
2005

c.1

ROSA MARÍA HINOJOSA ROBLES



1080127617



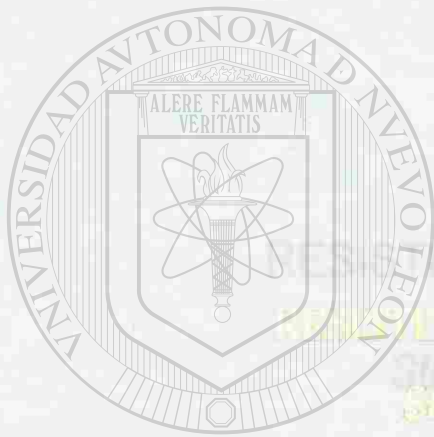
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



UANL

SEROTIPIFICACIÓN Y ANÁLISIS MOLECULAR DE
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

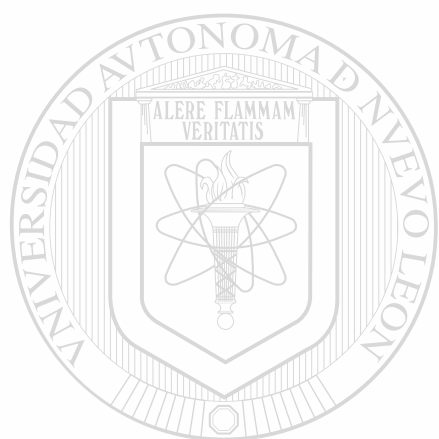
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Por
ROSA MARÍA HINOJOSA ROBLES
ROSA MARÍA HINOJOSA ROBLES

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con Especialidad en Microbiología Médica

Saltillo, Coahuila de Zaragoza,
Julio, 2005





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



RESISTENCIA-SUSCEPTIBILIDAD DE

Streptococcus pneumoniae

SEROTIPIFICACIÓN Y ANÁLISIS MOLECULAR

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Por

ROSA MARÍA HINOJOSA ROBLES

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN

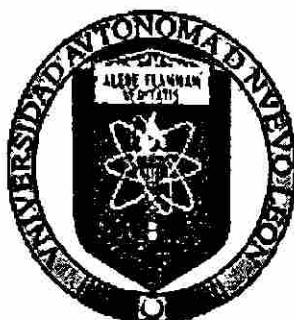
CIENCIAS con Especialidad en Microbiología Médica

Julio, 2005

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



COMISIÓN DE TESIS

Dr. med. Relando Tijerina Menchaca
Director de Tesis

Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez
Co-Directora de Tesis

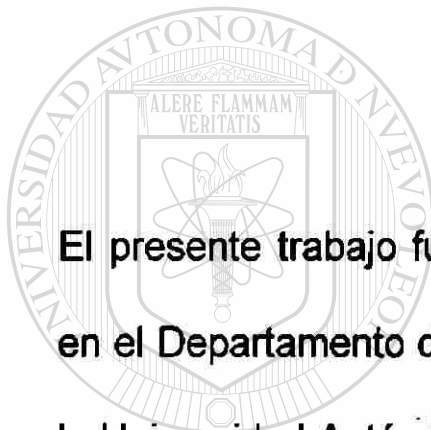
Dra. Gloria María González González
Comisión de Tesis

Dra. Irma Matilde Rivera Morales
Comisión de Tesis

Dra. Lygia Guadalupe Rivera Morales
Comisión de Tesis

Dr. Dionicio A. Galarza Delgado
Subdirector de Estudios de Posgrado

RESISTENCIA-SUSCEPTIBILIDAD DE
Streptococcus pneumoniae
SEROTIPIFICACIÓN Y ANÁLISIS MOLECULAR



El presente trabajo fue realizado por Rosa María Hinojosa Robles, en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y el Laboratorio del Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública, en Cuernavaca, Morelos.

Se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. med. Rolando Tijerina Menchaca y la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez. Apoyado parcialmente por el programa PAICYT No. DGI-232/02 de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

DEDICATORIA

A DIOS NUESTRO SEÑOR

Por ser mi guía en los momentos difíciles.

A LA MEMORIA DE MIS PADRES

Raúl Hinojosa De León y María Dolores Robles López, por la fortuna de haberlos tenido y guiar mi camino siempre con amor y sabiduría.

A LA MEMORIA DE MI HERMANO

Raúl Hinojosa Robles, por estar siempre conmigo, mi esposo y mis hijos siempre te recordaremos con amor, cariño y respeto.

A MI ESPOSO

Gilberto Torres Carreón

Por el gran amor y confianza que siempre has sabido darme.

A MIS HIJOS

Alethia María, Jeannette Alejandrina y Gilberto Torres

Por su comprensión, amor y paciencia...Gracias mis amores!.

A MIS HERMANOS

Victor, Simón, Luciano, Ma. Antonia, Ma. Dolores y Martha, por coincidir en el tiempo.

AGRADECIMIENTO

AL Dr. med. Rolando Tijerina Menchaca, por la dirección de este trabajo y sabios consejos.

A la Dra. Herminia Martínez Rodríguez, por su colaboración y tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

Al resto de los miembros de la Comisión de Tesis; Dra. Gloria Ma. González, Dra. Irma Rivera Morales y Dra. Lydia G. Rivera Morales. por su cooperación y valioso tiempo invertido en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Jesús Ancer Rodríguez, por su invaluable apoyo para poder realizar esta encomienda, sin su ayuda no lo hubiera logrado.

A la Dra. María Elena Velázquez Meza por su amistad e invaluable apoyo.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Al Dr. Corando Sáenz Aguirre, por su amistad y apoyo incondicional.

Al Dr. Javier Ramos Jiménez, por su apoyo, comentarios y sabios consejos.

A mis compañeros y amigos del camino de otros tiempos, especialmente a Margarita Collazo Rodríguez, por su amistad, apoyo y porras...Gracias!

AGRADECIMIENTO

Y por supuesto a todas las personas que colaboraron para la recolección de las cepas de *Streptococcus pneumoniae*

HOSPITAL UNIVERSITARIO

Dr. Amador Flores Aréchiga
Dr. Fernando Pérez Chávez
QCB. Jorge Canizales Oviedo
QCB. Jorge LLaca
QCB. Irasema Moyar Chávez

HOSPITAL INFANTIL DE MONTERREY

Dr. Carlos Díaz Olachea
QFB. Leticia Esparza Elizondo
QFB. Bertha E. De la Cruz Hdz.

LABORATORIO PRIVADO

Dr. Luis René Garza González
QCB. Isabel Esquivel Berlanga

HOSPITAL SAN JOSÉ

QFB. Claudia Guajardo Lara
QCB. Myriam Garza

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CLÍNICA NOVA

QFB. Engracia Castillo Ayala

CLÍNICAS DEL SEGURO SOCIAL

CLÍNICA 25: QCB. Norma Garza Palacios
CLÍNICA 34: QFB. Yolanda Rivera Hernández

INDICE

| CAPÍTULO | Página |
|--|--------|
| RESUMEN..... | xvii |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Aspectos Microbiológicos..... | 2 |
| 1.1.1 Factores de virulencia..... | 3 |
| 1.1.1.1 Cápsula bacteriana..... | 3 |
| 1.1.1.2 Neumolisina..... | 4 |
| 1.1.1.3 Amidasa..... | 5 |
| 1.1.1.4 Neuraminidasa..... | 6 |
| 1.1.1.5 Proteínas de superficie..... | 6 |
| 1.1.1.6 Proteasas..... | 6 |
| 1.2 Colonización por <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 7 |
| 1.3 Fisiopatología..... | 8 |
| 1.4 Manifestaciones clínicas..... | 10 |
| 1.4.1 Neumonías..... | 10 |
| 1.4.2 Meningitis..... | 11 |
| 1.4.3 Otitis media..... | 13 |
| 1.4.4 Sinusitis..... | 13 |
| 1.5 Diagnóstico por el Laboratorio..... | 14 |

| CAPITULO | Página |
|---|-----------|
| 1.6 Epidemiología de las infecciones neumocócicas..... | 17 |
| 1.7 Serotipos..... | 19 |
| 1.8 Resistencia bacteriana..... | 22 |
| 1.9 Tratamiento antimicrobiano..... | 23 |
| 1.10 Epidemiología Molecular..... | 24 |
| JUSTIFICACIÓN | 27 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 27 |
| Objetivos específicos..... | 28 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 29 |
| 2.1 Estrategia general..... | 30 |
| 2.2 Recolección de las cepas..... | 31 |
| 2.3 Muestras Clínicas..... | 31 |
| 2.4 Identificación de <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 32 |
| 2.4.1 Susceptibilidad al disco de optoquina..... | 32 |
| 2.4.2 Prueba de solubilidad en bilis..... | 33 |
| 2.5 Pruebas de Susceptibilidad antimicrobiana..... | 33 |
| 2.5.1 Susceptibilidad a la penicilina (oxacilina)..... | 33 |
| 2.5.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria..... | 34 |
| 2.5.3 Prueba E (E- Test)..... | 36 |
| 2.6 Serotipificación (reacción de Neufeld)..... | 37 |
| 2.7 Análisis Molecular: Electroforesis de campo pulsado | 38 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.7.1 | Crecimiento de las cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 38 |
| 2.7.1.1 | Inoculación e Incubación..... | 38 |
| 2.7.1.2 | Obtención de la cosecha celular..... | 38 |
| 2.7.2 | Lavado de la pastilla..... | 39 |
| 2.7.3 | Ajuste de la concentración celular del neumococo..... | 39 |
| 2.7.4 | Elaboración de los discos de agarosa..... | 40 |
| 2.7.5 | Lisis celular <i>in-situ</i> | 40 |
| 2.7.6 | Digestión celular..... | 41 |
| 2.7.7 | Preparación del gel de agarosa y colocación de las cepas..... | 41 |
| 2.7.8 | Tinción del gel..... | 42 |
| 2.7.9 | Interpretación del patrón electroforético..... | 42 |
| 3 | RESULTADOS..... | 43 |
| 3.1 | Recolección de las cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 43 |
| 3.2 | Identificación de <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 45 |
| 3.3 | Datos Sociodemográficos..... | 46 |
| 3.4 | Diagnóstico clínico..... | 47 |
| 3.5 | Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana..... | 49 |
| 3.5.1 | Susceptibilidad a la penicilina(oxacilina) en cepas aisladas de niños y adultos..... | 49 |
| 3.5.2 | Susceptibilidad a la penicilina; CMI en cepas aisladas de niños y adultos..... | 49 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.5.3 | Diagnóstico de las infecciones neumocócicas en niños, resistencia a penicilina y multirresistencia..... | 50 |
| 3.5.3.1 | Susceptibilidad de <i>Streptococcus pneumoniae</i> contra otros Antimicrobianos..... | 52 |
| 3.5.4 | Diagnóstico de las infecciones neumocócicas en adultos resistencia a penicilina y multirresistencia..... | 54 |
| 3.5.4.1 | Susceptibilidad de <i>Streptococcus pneumoniae</i> aislados de Adultos contra otros antimicrobianos..... | 55 |
| 3.6 | Serotipificación..... | 57 |
| 3.6.1 | Serotipos aislados de niños y adultos..... | 57 |
| 3.6.2 | Susceptibilidad a la penicilina y multirresistencia..... | 58 |
| 3.6.3 | Serotipos implicados en las infecciones de niños..... | 59 |
| 3.6.4 | Serotipos implicados en las infecciones en adultos..... | 60 |
| 3.6.5 | Serotipos más frecuentemente implicados en las infecciones neumocócicas..... | 61 |
| 3.6.6 | Serotipos implicados en la mortalidad de niños y adultos..... | 62 |
| 3.7 | Análisis Molecular; electroforesis de campo pulsado (PFGE)..... | 63 |
| 3.7.1 | Selección de las cepas..... | 63 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.7.2 | Criterios de Tenover..... | 64 |
| 3.7.3 | Geles de primer análisis..... | 64 |
| 3.7.4 | Geles de análisis final..... | 68 |
| 3.7.4.1 | Gel del serotipo 23F..... | 69 |
| 3.7.4.2 | Gel de los serotipos 6A, 6B y 19F..... | 70 |
| 3.7.4.3 | Gel de los serotipos 14 y 9..... | 72 |
| 3.7.4.4 | Gel del serotipo 35B..... | 74 |

| | | |
|---|----------------|----|
| 4 | DISCUSIÓN..... | 75 |
|---|----------------|----|

| | | |
|---|-------------------|----|
| 5 | CONCLUSIONES..... | 85 |
|---|-------------------|----|

| | | |
|---|-------------------|----|
| 6 | PERSPECTIVAS..... | 88 |
|---|-------------------|----|

| | | |
|---|------------------|----|
| 7 | REFERENCIAS..... | 89 |
|---|------------------|----|

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

| Tabla | Página |
|--|--------|
| 1. Cepas recolectadas en el período 1997-2003..... | 43 |
| 2. Procedencia clínica de las cepas aisladas de niños y adultos..... | 44 |
| 3. Identificación de <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 45 |
| 4. Cepas de <i>S. pneumoniae</i> aisladas de niños y adultos..... | 46 |
| 5. Diagnóstico clínico en niños y adultos..... | 48 |
| 6. Infecciones no-invasivas en niños, resistencia a penicilina y multirresistencia..... | 50 |
| 7. Neumonía en niños resistencia a penicilina y multirresistencia..... | 51 |
| 8. Infecciones invasivas en niños, resistencia y multirresistencia..... | 51 |
| 9. Porcentaje de la susceptibilidad de <i>Streptococcus pneumoniae</i> aislados de niños y probados contra 11 antimicrobianos..... | 53 |
| 10. Diagnóstico de las infecciones neumocócicas en adultos, resistencia [®] a penicilina y multirresistencia..... | 54 |
| 11. Porcentaje de la susceptibilidad de <i>Streptococcus pneumoniae</i> aislados de adultos y probados contra 11 antimicrobianos..... | 55 |
| 12. Principales serotipos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> resistentes a la penicilina y multirresistentes aislados de niños y adultos..... | 59 |
| 13. Serotipos más frecuentemente implicados en enfermedades neumocócicas en niños y adultos..... | 62 |
| 14. Serotipos implicados en la mortalidad de niños y adultos..... | 63 |

LISTA DE FIGURAS

Figura Página

1. Esquema de la estrategia general.....30
2. Serotipos aislados de niños y adultos.....57
3. Serotipos implicados en las infecciones neumocócicas en niños.....60
4. Serotipos implicados en las infecciones neumocócicas en adultos....61
5. Gel de 1er. Análisis de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 23F.....70
6. Geles de 1er. Análisis de los serotipos 6A, 6B, 9A, 9V, 14, 19F, 19A y 35B.....68
7. Gel de análisis final de *S. pneumoniae* serotipo 23F.....70
8. Gel de análisis final de *S. pneumoniae* serotipo 6A, 6B, y 19F.....72
9. Gel de análisis final de *S. pneumoniae* serotipo 14 y 9.....73
10. Gel de análisis final de *S. pneumoniae* serotipo 35B.....74

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|-------------------------------------|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| °C | Grados centígrados |
| FNT | Factor de necrosis tumoral |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| Nan A | Neuraminidasa A |
| Psp A | Proteína de superficie A |
| Psp C | Proteína de superficie C |
| Psa A | Adhesina de superficie neumocócica |
| IgA | Inmunoglobulina A |
| FAP | Factor activador de plaquetas |
| IL-1 | Interleucina 1 |
| IL-12 | Interleucina 12 |
| LyT A | Autolisina A |
| Pln | Neumolisina |
| SpxB | Piruvato oxidasa |
| CbpA | Colina enlazada a la colina A |
| LCR | Líquido cefalorraquídeo |
| CIE | Contrainmunolectroforesis |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PFGE | Pulsed field gel electrophoresis |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------|--|
| MLST | Multi locus sequence typing |
| VIH/SIDA | Virus de la inmunodeficiencia humana/Síndrome de inmunodeficiencia adquirida |
| SIREVA | Sistema regional de vacunas |
| PAHO | Panamerican Health Organization |
| SENTRY | Red de Vigilancia epidemiológica de resistencia a antimicrobianos |
| LASER | Red de vigilancia epidemiológica de resistencia en América Latina |
| PPV-23 | Vacuna neumocócica polisacárida 23 valente |
| PNCRM-7 | Vacuna heptavalente conjugada |
| Pip's | Proteínas ligadoras a penicilina |
| CMI | Concentración mínima inhibitoria |
| µg/mL | Microgramos por mililitro |
| Multi-R | Multirresistencia |
| PMEN | Red de epidemiología molecular neumocócica |
| h | Hora |
| ASM | American Society for Microbiology |
| ATCC | American type culture collection |
| UFC/mL | Unidades formadoras de colonias por mililitro |
| E | Eritromicina |
| IPM | Imipenem |
| CTX | Cefotaxima |

LISTA DE ABREVIATURAS

SXT Sulfametoxazol trimetoprim

VAN Vancomicina

CL Cloranfenicol

TE Tetraciclina

LV Levofloxacina

LZ Linezolid

Q/R Quinuprostín/Dalfopristín

CH Claritromicina

NCCLS National Committee for Clinical Laboratory Standards

DO Densidad óptica

E-C EDTA y cloruro de sodio

E-S EDTA y sarcosil

ESP EDTA sarcosil y proteinasa K

TE Tris EDTA

Sma 1 *Serratia marcescens* 1

TBE Tris borato EDTA

RESUMEN

Rosa María Hinojosa Robles

Fecha de obtención del Grado: Julio de 2005

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Titulo del Estudio: RESISTENCIA-SUSCEPTIBILIDAD DE *Streptococcus pneumoniae*: SEROTIPIFICACIÓN Y ANÁLISIS MOLECULAR.

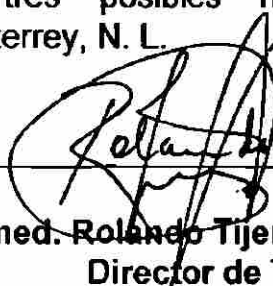
Número de páginas: 106

Candidato al Grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología Médica.

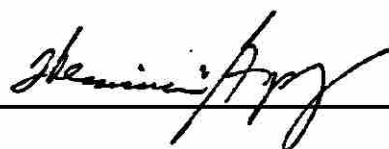
Área de estudio: Microbiología.

Propósito y Método de estudio: *Streptococcus pneumoniae*, actualmente es considerado como un problema de salud pública a nivel mundial, por sus altos índices de morbilidad y mortalidad. El objetivo del presente trabajo fue determinar los patrones de resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a los antimicrobianos más utilizados en la práctica médica, la distribución de los serotipos circulantes y el análisis molecular de las cepas resistentes a penicilina, aisladas de pacientes con enfermedades neumocócicas y atendidos en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León. Para realizar este estudio se analizaron 207 cepas de *Streptococcus pneumoniae* recolectadas de siete Instituciones de salud, se identificaron por métodos convencionales y se probaron contra 12 antimicrobianos, por medio de las técnicas de difusión del disco de oxacilina, microdilución en placa y la prueba E. Se serotipificaron de acuerdo a la clasificación Danesa y las cepas resistentes a penicilina se sometieron a la electroforesis de campo pulsado para su análisis molecular.

Contribuciones y Conclusiones: Las infecciones más frecuentes se presentaron en niños menores de 5 años y el mayor índice de mortalidad se presentó en adultos mayores de 60 años. La resistencia a penicilina en las cepas de *Streptococcus pneumoniae* se presentó en el 66% y la multirresistencia en el 54%, los antimicrobianos con mayor actividad fueron levofloxacina, linezolid, quinupristín/dalfopristín y vancomicina. Lo anterior podrá orientar al médico en la elección adecuada del terapéutica antimicrobiana. Los serotipos más frecuentes fueron 3, 4, 6A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F, 23F y 35B lo que permitirá estimar las posibles coberturas de las inmunizaciones neumocócicas utilizadas en niños y adultos. Se demostró la diseminación de cinco clonas de resistencia a antimicrobianos, de otros países hacia nuestra ciudad, así como la presencia de tres posibles nuevas clonas nativas del área metropolitana de Monterrey, N. L.



Dr. med. Rolando Tijerina Menchaca
Director de Tesis



Dra. Herminia Martínez Rodríguez
Co-Directora de Tesis

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Mundialmente, las infecciones respiratorias siguen siendo una de las principales causas de muerte en menores de 5 años, pues se estima que anualmente 4 millones de niños mueren por neumonía y que la mayoría de estas muertes ocurren en niños menores de un año, quienes, viven principalmente en países en vías de desarrollo (1, 2, 3). Según datos reportados por la Organización Panamericana de la Salud, en los Estados Unidos Mexicanos, la mortalidad por infecciones respiratorias incluyendo la neumonía y la influenza, registró una tasa de 43/100 000 habitantes (4). En el 2003, la mortalidad por infecciones respiratorias agudas en los adultos mayores de 65 años, fue de 7 939 casos con una tasa de 151.8/100 000 habitantes (5).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Indudablemente, en México, las infecciones respiratorias tanto en niños menores de 5 años, como en los adultos mayores de 65 años, son un problema grave y ocupan los primeros lugares de morbilidad y mortalidad. Solamente, en el estado de Nuevo León y de acuerdo al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, durante la semana 10 del 2005 se reportaron 22 805 nuevos casos de infecciones respiratorias agudas y un total acumulado de 248 629 casos (6). Los principales agentes etiológicos de estas infecciones son los virus y las bacterias; los virus de la Influenza, Sincicial Respiratorio, Adenovirus y

Rinovirus, ejercen un efecto citopático destruyendo los cilios de la mucosa respiratoria y la alteración de este mecanismo de defensa, favorece la presencia de ciertas bacterias; *Haemophilus influenzae tipo b*, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis*. Estos tres microorganismos tienen varias características en común, tales como, poseer una cápsula bacteriana que los hace eludir la acción de la fagocitosis, ser resistentes a los antimicrobianos, en mayor o menor grado, y ser prevenibles por vacunas, sin embargo, *Streptococcus pneumoniae* es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, lo que, asociado con el gran desarrollo de resistencia a múltiples antimicrobianos, se constituye hoy día como uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial (7).

1.1 Aspectos microbiológicos

Streptococcus pneumoniae ha sido uno de los microorganismos más intensamente estudiado desde que, simultánea e independientemente Sternberg, en Estados Unidos y Pasteur en Francia, lo aislaran por primera vez en 1881 (8). Ha sido uno de las bacterias que más contribuciones ha hecho al campo de la Química, la Genética y la Medicina. En 1928, Griffith observó que cuando una mezcla de *Streptococcus pneumoniae* encapsulados y muertos por calor, más, cepas vivas y sin cápsula eran inyectados a ratones, los neumococos sin cápsula se habían convertido en la forma encapsulada del mismo tipo que la muerta por calor, a este fenómeno se le conoció como el

principio de transformación, el cual, quince años más tarde, Avery, McLeod y McCarty demostraron que se debía al ácido desoxirribonucleico (ADN) (9, 10).

Sin embargo, a más de 120 años de distancia, aún sigue siendo considerado como uno de los principales agentes causantes de serias manifestaciones clínicas. *S. pneumoniae* es un coco grampositivo dispuesto en pares o cadenas cortas, encapsulado y anaerobio facultativo, requiere para su desarrollo *in vitro* de medios de cultivo que contengan sangre, desarrollándose en 20-24 horas a una temperatura de 35 °C y en una atmósfera con un 5% de CO₂, por lo que es considerado un microorganismo fastidioso. Forma colonias redondas, mucosas alfa hemolíticas, de 1 a 3 mm de diámetro, las que después de 48 horas presentan un aspecto umbilicado, con una depresión central producida por una autólisis celular progresiva. La cápsula de este microorganismo está compuesta por polisacáridos, los que, debido a su capacidad antigénica estimulan en el hospedero la producción de anticuerpos protectores específicos para el serotipo que los indujo. *S. pneumoniae*, es sensible a la optoquina y en presencia de sales biliares, como el desoxicolato o taurocolato de sodio, se produce una lisis bacteriana después de 4 horas de incubación (11).

1.1.1 Factores de virulencia

1.1.1.2 Cápsula

La cápsula de polisacáridos es el factor de virulencia más importante de este microorganismo, ya que durante la infección las cepas encapsuladas son capaces de eludir la acción fagocitaria de los macrófagos en ausencia de

anticuerpos específicos. Inhibe también la activación del complemento por la vía alterna y degrada el fragmento C3b unido a la superficie bacteriana, por medio de proteínas específicas. La cápsula es polianiónica y modula el paso de moléculas y iones al interior de la bacteria, la adherencia a superficies biológicas e inorgánicas, así como la formación de biofilms y microcolonias (12). La virulencia de *Streptococcus pneumoniae* está basada en la composición química y el tamaño de la cápsula (13). La variabilidad antigénica en las diversas cepas ha permitido agrupar a esta especie en 46 serogrupos y 90 serotipos (14).

1.1.1.3 Neumolisina

Es una toxina citolítica tiol – activada, unida a la membrana celular a través de receptores de colesterol y es una de las principales proteínas involucradas en la virulencia. Contribuye a la respuesta inflamatoria al estimular la liberación del factor de necrosis tumoral (FNT) y las interleucinas producidas por los macrófagos y enlazarse inespecíficamente a la IgG para activar la cascada del complemento y activar la fosfolipasa A2 en las células endoteliales. En los pulmones, la neumolisina inhibe la función ciliar incrementando la permeabilidad vascular dañando así al endotelio, pudiendo ser responsable de la hemorragia alveolar durante la infección neumocócica, por lo tanto, la contribución de la neumolisina a la patogénesis de la enfermedad neumocócica es multifactorial (13).

1.1.1.4 Amidasa

La N-acetilmuramil-L-alanina amidasa, es una poderosa autolisina (LytA) que degrada diferentes enlaces en el peptidoglicano de la pared celular del *Streptococcus pneumoniae* por lo que puede causar eventualmente la lisis y la muerte de este microorganismo. Esta hidrolasa es codificada por el gen *lyt A* y es fuertemente dependiente de la presencia de residuos de colina en el ácido teicoico de la pared celular de esta bacteria. Hoy se sabe que *Streptococcus pneumoniae* es uno de los raros microorganismos que contienen colina en la pared celular. La lisis de este microorganismo con desoxicolato de sodio (utilizado como prueba de identificación) ocurre por medio de la hidrólisis de esta enzima (13).

La amidasa participa al final de la división celular (en la separación de las células hijas) y en el desarrollo de la transformación genética natural. Esta enzima también es indispensable para la inserción de nuevos fragmentos de B-1,4-N-acetil glucosamil-N-acetil muramil dentro del peptidoglicano de la pared celular. Se ha comprobado que contribuye al daño tisular lisando al neumococo y liberando sus sustancias dañinas (peptidoglicano y ácido teicoico). Se ha observado que a mutantes a las que les falta el gen de la autolisina, o neumolisina han reducido su virulencia y que los anticuerpos son parcialmente protectores. También se ha sugerido que es responsable del efecto irreversible causado por los antibióticos beta-lactámicos (15).

1.1.1.5 Neuraminidasa

Existen por lo menos dos tipos; la neuraminidasa A (NanA) y la neuraminidasa B. La NanA, la más estudiada, es un enzima que hidroliza las glucoproteínas y los glucolípidos celulares, está implicada en la diseminación y multiplicación de este microorganismo en los tejidos infectados, principalmente en los pulmones, por lo que puede también contribuir a la patogenicidad. Se ha demostrado una reducción de la virulencia en presencia de anticuerpos anti-neuraminidasa (15).

1.1.1.6 Proteínas de Superficie

Existen tres proteínas de superficie; PspA, PspC y una Adhesina de superficie neumocócica; PsaA. Participan en la adherencia inicial del neumococo a la célula blanco. La PspA (proteína de superficie A) se encuentra en todos los neumococos y es capaz de producir protección contra la infección neumocócica en ratones. Por esta razón, se ha pensado que junto con la PspC, la neumolisina y la PsaA, podrían ser utilizadas en la producción de vacunas (16).

1.1.1.7 Proteasas

La proteasa para IgA hidroliza e inactiva la inmunoglobulina A₁ presente en las mucosas, lo que facilita su adherencia y colonización inicial (15).

1.2 Colonización por *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae coloniza normalmente la mucosa nasofaríngea de niños y adultos sin causar patología. Existe una relación inversamente proporcional entre la colonización y la edad del individuo, ya que el estado de portador en los niños de edad pre-escolar es del 60%, siendo aún mayor en los niños que asisten a guarderías, en los de edad escolar es del 35%, en los estudiantes de secundaria es del 25% y en los adultos en contacto con niños es del 18 al 30%, mientras que en los adultos sin niños es del 6% (17, 18). En un estudio reciente, realizado en Israel, se comparó a niños y adultos de una misma comunidad y se reportó un estado de portador del 53% en niños y sólo un 4% en adultos, sin embargo no se pudo demostrar la transmisión intrafamiliar de *Streptococcus pneumoniae* (19). En los países en vías de desarrollo los lactantes son colonizados a edad más temprana, pues se ha demostrado que la adquisición de *Streptococcus pneumoniae* sucede entre los 4 y los 18 meses de edad, con una media de 6 meses (20, 21).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El estado de portador puede durar entre 1 y 17 meses y alcanza su máximo pico en invierno y declina durante el verano (22). Los niños menores de 5 años, pueden estar colonizados hasta por 4 serotipos diferentes en el mismo período de tiempo (23). Por lo tanto, no es de extrañar que la transmisión del *Streptococcus pneumoniae* sea de persona a persona y a través de la vía aérea por pequeñas gotas de saliva.

1.3 Fisiopatología

Los factores responsables del cambio del estado de portador a enfermo no están del todo claros, pero se relacionan con la capacidad del *Streptococcus pneumoniae* de reconocimiento y fijación a las células del epitelio nasofaríngeo del hospedero, así como con la diseminación hacia otras partes del organismo. De tal manera que el epitelio nasofaríngeo es el primer sitio de colonización neumocócica, donde el enlace está dado sólo por las cepas de *Streptococcus pneumoniae* con colonias transparentes. La colonización involucra a la adhesina PspaA de la superficie del neumococo, la cual se adhiere a los receptores que exhiben carbohidratos glucoconjugados ya sea con el disacárido N-Acetil Glucosamina-4 Galactosa (GlcNAc- β 1-4 Gal) en las células nasofaríngeas, o con la N-acetil Galactosa β 1-4 Galactosa (GalNAc- β 1-4 Gal) en las células pulmonares (24).

Los neumococos se adhieren a los receptores del factor activador de plaquetas (FAP) expresados por las células activadas por citosina o trombina a través de la fosforil colina del ácido teicoico de su pared celular. La fosforilcolina modula la bioactividad del FAP, lo cual resulta en el reclutamiento de leucocitos y plaquetas en el sitio de la infección. El neumococo se enlaza al epitelio, al endotelio y a los leucocitos, disparando así la producción de interleucina-1 (IL-1) una citocina clave en la respuesta inflamatoria y de interleucina-12 (IL-12). Entre muchas funciones, la IL-1 incrementa la permeabilidad vascular y estimula la producción de plaquetas. Los

componentes de la pared celular, también aumentan la permeabilidad del endotelio cerebral y del epitelio alveolar de los pulmones, estimula la producción de citocina y activa la cascada de la coagulación dañando neuronas y afectando el flujo sanguíneo cerebral y la perfusión vascular (13, 26).

La fuerte respuesta creada por los componentes de la pared celular del neumococo (ácido teicoico, ácido lipoteicoico y neumolisina) activa al complemento por la vía alterna, antes de que se establezca la producción de anticuerpos específicos anti-capsulares (25). El resultado, en el mejor de los casos, es la fijación del complemento al neumococo, la opsonización y la destrucción del mismo, por el sistema retículo endotelial donde, el bazo juega un papel muy importante (24).

El *Streptococcus pneumoniae*, causa daño por la fuerte respuesta

inflamatoria que provocan los componentes de su pared celular, ya que si la concentración de éstos excede a 100, 000 partículas/ mL se inicia una rápida respuesta inflamatoria. Esta situación puede ser exacerbada por la lisis bacteriana producida por los antibióticos. Si un individuo es capaz de resistir a este evento, el decline en los productos bacterianos disminuiría la respuesta inflamatoria, sin embargo, el problema es que muchos pacientes, especialmente los ancianos y los niños más pequeños son incapaces de sobrevivir (13, 24, 26). Lo que sucede después de la adherencia del *Streptococcus pneumoniae* a las principales células, es el internamiento del microorganismo a una vacuola que es formada por invaginación de la membrana de la superficie celular, es

decir por endocitosis mediada por el receptor, de esta forma el complejo vacuola-bacteria viaja por el citoplasma para que posteriormente el neumococo salga al lado opuesto de la célula infectada (transmigración) iniciándose así la invasión bacteriana (25).

1.4 Manifestaciones Clínicas

1.4.1 Neumonía

La neumonía neumocócica es la más frecuente adquirida en la comunidad y su índice de mortalidad, en los casos no complicados, es aún relativamente alto; 5-7%, incluso cuando se constituye una terapia adecuada. Actualmente, la incidencia anual de neumonía causada por *S. pneumoniae* es de 5.9 millones de casos en niños menores de 5 años, 4.5 millones de casos en niños de 5-14 años, 9.3 millones de casos en el grupo de 15-59 años y de 4.8 millones de casos en personas de más de 60 años (28).

La mortalidad alcanza 40% en el grupo de edad inferior a los 5 años y 50% en las personas mayores de 60 años. En cambio, en los países en vías de desarrollo, existen 4 millones de muertes por año, en niños menores de 5 años, donde *S. pneumoniae* es causante del 20 al 25% de esas muertes (27). En América Latina; Argentina, Brasil, Colombia, Uruguay y México, en el período de 1994-1999, se realizó un estudio en niños menores de 5 años, en éste se registraron 3,393 casos de infecciones neumocócicas, de los cuales, 1,578

(46.5%) tuvieron un diagnóstico de neumonía (28). En Gambia, la incidencia de neumonías registra una tasa superior a 554/100.000 en lactantes menores de un año. Tasa 10 veces superior a la registrada en países desarrollados (29). En Monterrey, Nuevo León, no existen datos contundentes sobre incidencia de infecciones causadas por *Streptococcus pneumoniae*. Las manifestaciones clínicas de la neumonía en niños pequeños son diversas, variando desde síndromes respiratorios no específicos hasta los que ponen en peligro la vida. Actualmente, algunas complicaciones como neumonía severa (necrotizante), empiema y abscesos pulmonares parecen estar incrementando su incidencia (30, 31).

Estudios recientes han puesto de manifiesto que, ciertos factores de virulencia del *Streptococcus pneumoniae* están involucrados en los casos de neumonía severa, éstos son; la neumolisina (PIn), la piruvato oxidasa (SpxB) y principalmente la autolisina (LytA), los cuales son requeridos para la supervivencia y replicación del microorganismo en los pulmones y la sangre siendo los primeros mediadores del daño celular. También se ha documentado que la colina enlazada a la proteína A (CbpA) y la neuraminidasa A (NanA), son requeridas para que el microorganismo pase de la nasofaringe a los pulmones, marcando así el inicio de la infección neumocócica (32).

1.4.2 Meningitis

Debido a la exitosa introducción de la vacuna para *Haemophilus influenzae tipo b* para combatir la meningitis en los niños menores de 5 años

(con mayor incidencia en los menores de 2 años) *Streptococcus pneumoniae* viene a ser la principal causa de esta enfermedad, en países desarrollados y más aún, en los que están en vías de desarrollo (33). En Estados Unidos, es causa del 25% al 40% de los casos, en donde, aún con terapia antibiótica efectiva la morbilidad es alta; 20% a 30% y la mortalidad es mayor al 20% (34). Por otro lado, también es de considerar que la mitad de los sobrevivientes quedan con importantes secuelas neurológicas (35).

Para que el *Streptococcus pneumoniae* cause meningitis, éste, puede penetrar directamente a la nasofaringe, o por diseminación hematógena y debe tener la capacidad para cruzar el endotelio cerebral, para llegar al líquido cefalorraquídeo (LCR) en el espacio subaracnoideo. Según un estudio realizado por Orihuela y cols. para que esto suceda se requiere la interacción específica entre CbpA y su receptor, es decir, entre la colina de la pared celular del neumococo y el receptor del factor activador de plaquetas (FAP) (35). Un trabajo recientemente publicado por Christian Ostergaard y cols., describe que la mortalidad en los pacientes con meningitis neumocócica, el grado y patrón del daño cerebral y las alteraciones citoquímicas del LCR en una meningitis experimental, difieren de acuerdo al serotipo del *Streptococcus pneumoniae* involucrado. Los autores reportaron que el grado de mortalidad para pacientes con meningitis por serotipo 1 era del 3%, para el serotipo 3; 23% y para el serotipo 9V; 32%. El grado del daño cerebral (producido en dos modelos experimentales, conejo y rata) era; para el serotipo 1, sólo hemorragia cortical, causando menos alteraciones en LCR y el más bajo daño cerebral. Para el

serotipo 3; necrosis cortical, formación de abscesos y necrosis concentrándose el mayor número de bacterias en el LCR. Y finalmente, para el serotipo 9V; formación de abscesos subcorticales en el cuerpo caloso, promoviendo el mayor grado de crecimiento bacteriano en la sangre (36).

1.4.3 Otitis Media

A nivel mundial *Streptococcus pneumoniae* es el microorganismo más común causante de otitis media aguda en niños menores de 5 años de edad, pues sólo en los Estado Unidos, se registra una incidencia de 6 millones de casos por año. Se estima que el 25% de las visitas al pediatra, son por causa de otitis media aguda y sus secuelas (37). Esta enfermedad afecta por lo menos a 7 de cada 10 niños; una tercera parte sufre de episodios repetidos y del 5% al 10% de los casos desarrollan otitis media crónica, de tipo seroso. Las cepas de *Streptococcus pneumoniae* con resistencia a múltiples antimicrobianos y aisladas con frecuencia de otitis media, representan un serio problema, pues, entorpecen el tratamiento clínico de estas infecciones (38).

1.4.4 Sinusitis

La sinusitis viral aguda es una de las causas más comunes del tracto respiratorio superior y en la mayoría de los casos se resuelve espontáneamente aún sin tratamiento. Se ha documentado que en los individuos adultos, puede existir una complicación bacteriana en el 0.5% al 2% de los casos (39). La

población pediátrica, tiene un aproximado de infecciones virales de entre 6 y 8 por niño/ por año y presenta complicaciones bacterianas secundarias hasta en un 5% a 13% (40). Los principales patógenos bacterianos son *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, los mismos que causan más del 50% de este tipo de infecciones. El edema inflamatorio, la disminución de la actividad mucociliar, el acumulamiento de secreciones, la disminución del pH y la baja tensión de oxígeno, proporcionan el medio ambiente favorable para el desarrollo de los mencionados microorganismos (41).

1.5 Diagnóstico por el laboratorio

El diagnóstico etiológico de las infecciones causadas por *Streptococcus pneumoniae*, se obtiene cuando este microorganismo es identificado a partir de las diferentes fluidos biológicos infectados, tales como, aspirado otico, aspirado de seno maxilar, raspado ocular, expectoración ya sea espontánea o inducida, lavado o cepillado bronco alveolar, biopsias, punción transtraqueal, sangre, o bien de líquidos provenientes de cavidades cerradas como; líquido cefalorraquídeo (LCR), pleural, ascítis, sinovial, u, orina por punción suprapúbica, o, secreciones de cualesquier tipo; celulitis, absceso retroauricular, o, hígado, entre otras. La identificación de *Streptococcus pneumoniae* se puede realizar por medio de técnicas microbiológicas, inmunológicas, o técnicas de biología molecular. Las técnicas microbiológicas incluyen; tinción de Gram, la cual pone de manifiesto la presencia de cocos grampositivos en forma lanceolada, en pares, o cadenas, de no más de 4 microorganismos,

generalmente se puede apreciar un halo blanco, correspondiente a la cápsula no teñida alrededor del cuerpo bacteriano. El cultivo *in-vitro* del *Streptococcus pneumoniae* debe realizarse en medios de cultivo que contengan sangre, preferentemente de carnero o caballo, estos medios, deberán ser incubados por 20-24 horas a 35°C y en una atmósfera de un 5% de CO₂. Las pruebas básicas para la identificación de *Streptococcus pneumoniae* a partir de los cultivos incluyen; la morfología colonial, típicamente son colonias alfa hemolíticas, con el centro umbilicado, prueba de la catalasa negativa, susceptibilidad a la optoquina y solubilidad en sales biliares como el taurocolato o desoxicolato de sodio (11).

Dentro de las pruebas inmunológicas y por medio de la detección de antígenos, se puede identificar el polisacárido capsular neumocócico en los líquidos corporales infectados mediante técnicas de inmunoanálisis, como la contra inmunolectroforesis (CIE) o, bien la aglutinación de látex. Esta última, es una técnica muy rápida pues, en 15-20 minutos, a partir de un LCR[®], se puede obtener un diagnóstico de meningitis. También se puede hacer identificación por medio de la serotipificación obteniéndose una reacción a nivel capsular antígeno-anticuerpo, tipo-específica (11). (véase mas adelante).

Con respecto a la identificación por medio de biología molecular, se han descrito técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la electroforesis de campo pulsado (PFGE; pulsed field gel electrophoresis) y la técnica de tipificación de la secuencia multi-locus (MLST; multilocus sequence

typing). Esta metodología fue descrita primordialmente para relacionar entre si grupos de especies bacterianas aisladas en distintos y distantes lugares. La PFGE, involucra organismos embebidos en agarosa, lisis del organismo in-situ y digestión del ADN cromosómico con endonucleasas de restricción que cortan infrecuentemente. Pequeños discos de agarosa conteniendo al *Streptococcus pneumoniae* son introducidos en los pozos de un gel de agarosa y los fragmentos de restricción, son resueltos en un patrón de bandas discretas por un aparato que, cambia constantemente la dirección de la corriente eléctrica de acuerdo a un patrón determinado. Los patrones de restricción del ADN de los microorganismos, son entonces comparados con otros para determinar su relación genética (42).

La MLST es una técnica altamente discriminatoria que utiliza la secuenciación de fragmentos internos de aproximadamente 450 pares de bases, de siete genes constitutivos (con mayor grado de polimorfismo) para detectar, en forma directa, las variaciones en los diferentes locus, con el objetivo de identificar grupos de microorganismos con idénticos genotipos (clonas) o altamente relacionados (líneas clonales). Las combinaciones alélicas encontradas definen lo que se conoce como el tipo de secuencia, el cual, es identificado con un número empezando por el 1, continuando cronológicamente a medida que se van describiendo nuevos perfiles alélicos, por lo tanto, la secuencia permite detectar variantes que supongan tan sólo un cambio en una base, en el gen analizado (43).

1.6 Epidemiología de las infecciones neumocócicas

Streptococcus pneumoniae puede causar infecciones frecuentes a nivel de vías respiratorias bajas, causando neumonía, o, en vías respiratorias altas causando sinusitis y otitis media. Sin embargo, también es capaz de causar infecciones invasivas en el hospedero, tales como; neumonía necrotizante, meningitis y bacteremia. Estas infecciones invasivas, constituyen un grupo minoritario y a pesar de tener una adecuada terapia antimicrobiana, son las principales responsables de la morbilidad y mortalidad relacionada con este microorganismo, tanto en los países desarrollados como los que están en vías de desarrollo. Con mucho menor frecuencia *Streptococcus pneumoniae* puede causar infecciones en piel y tejidos blandos, principalmente celulitis, endocarditis, conjuntivitis, peritonitis primaria, absceso hepático y salpingitis (44).

En las últimas tres décadas se ha producido un cambio en la epidemiología de las infecciones por este agente, aumentando su incidencia a nivel mundial. En uno de los países desarrollados como lo es Estados Unidos, se registran 500,000 casos de neumonía, de los cuales de 100,000 a 135,000 requieren hospitalización y 6,000,000 casos de otitis media por año. De bacteremia y meningitis se registran 50,000 y 3,300 casos por año, respectivamente (44). Estas infecciones neumocócicas se pueden presentar a cualquier edad, sin embargo, la mayor incidencia se encuentra en los extremos

de la vida; niños menores de 5 años, principalmente en los menores de 2 años de edad y en los adultos mayores de 60 años. Es de suma importancia considerar a los grupos de alto riesgo, entre los que se encuentran individuos con cualesquier tipo de inmunosupresión, ejem. virus de la Inmunodeficiencia Humana/Síndrome de Inmunodeficiencia (VIH/SIDA), esplenía, diabetes, enfermedad de células falciformes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedades hematológicas, entre otras. Los grupos étnicos; individuos de raza negra, indios americanos y nativos de Alaska, también son considerados de alto riesgo. La manifestación más común de enfermedad neumocócica invasiva en niños menores de dos años de edad, es la bacteremia sin sitio de infección localizado (45).

En los países desarrollados, tales como Estados Unidos y Europa la incidencia de la enfermedad neumocócica invasiva en los niños menores de 5 años es de 8-75/100,000 habitantes, mientras que la incidencia en países en desarrollo, es varias veces más alta 100 a > 500/100,000 habitantes por año (44). En relación con las personas infectadas con el VIH, un estudio realizado en Estados Unidos ha puesto en evidencia, que la incidencia de enfermedad neumocócica en los niños con infección por VIH de hasta 7 años de edad, es de 6.1/100 casos por año. En forma contrastante, la incidencia de la infección neumocócica entre los adultos con VIH/SIDA es 46 veces más alta comparada con adultos sin VIH/SIDA (46).

1.7 Serotipos

A principios de 1900, se descubrió que el suero de un paciente que se había recuperado recientemente de neumonía neumocócica, aglutinaba a los neumococos aislados de otro paciente, poco después, este grupo de cepas fue reconocida por Sir Spencer Lister, en el sur de África y posteriormente por Griffith, en Estados Unidos de Norte América (9, 47). Hoy, la clasificación Danesa describe 90 serotipos y 46 serogrupos de *Streptococcus pneumoniae* identificados en base a las diferencias antigénicas de los polisacáridos capsulares y reconocidos por la reacción de Quellung (14).

La resistencia a penicilina y la resistencia múltiple, la cual se describe como la resistencia a 3, ó, más antibióticos, se asoció primeramente, a los serotipos 6A, 6B y 19A, aislados de niños hospitalizados en el Sur de África

(48). Sin embargo, estos mismos serotipos, con excepción del 6A, también fueron reportados en Estados Unidos (49). Un estudio realizado en 16 países, reportó que los serogrupos más comunes en países desarrollados, en orden descendente fueron: 14, 6, 19, 18, 9, 23, 7, 4, 1 y 15. Mientras que en los países en vías de desarrollo se reportaron: 6, 14, 8, 5, 1, 19, 9, 23, 18, 15 y 7. Los serogrupos 14, 6 y 19 fueron los más frecuentemente aislados de sitios normalmente estériles, en niños con infecciones neumocócicas (2). Jae-Hoon Song y Peter C. Appelbaum encabezaron un estudio en 11 países asiáticos en el período de Septiembre de 1996 a Junio de 1997, en el que se demostró que

los serotipos 23F y 19F, eran los más frecuentes (50). Un grupo de expertos, evaluaron los cambios temporales en la distribución de serogrupos/serotipos de *Streptococcus pneumoniae* encontrando que de 1928 a 1998, la proporción de infecciones neumocócicas causadas por los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F (los mismos que están incluidos en la vacuna PNCRM-7 heptavalente conjugada utilizada en niños) se incrementó significativamente de 15% a 59% en 13 estudios realizados en adultos, y de 53% a 87% en 19 estudios pediátricos. Reportaron también que la proporción de infecciones causadas por los serogrupos "epidémicos" (1, 2, 3 y 5) disminuyeron significativamente de 71% a 7% en los estudios de los adultos y de 18% a 2% en los estudios de los niños (51).

Actualmente, un número elevado de reportes referentes a la distribución de los serogrupos/serotipos de *Streptococcus pneumoniae* aislados de

infecciones invasivas, así como su resistencia a penicilina y multirresistencia, han sido publicados en diferentes partes del mundo; América del Norte, Europa, diversas regiones de Asia y África (52-59). En América Latina los pocos datos existentes se empezaron a publicar después del 1993, cuando se instituyó el Sistema Regional para Vacunas (SIREVA-VIGIA) auspiciado por la Pan American Health Organization (PAHO). Los países que integran este sistema de vigilancia son: Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Uruguay y la ciudad de México. Poco tiempo después, en 1997 se estableció, SENTRY, otro sistema de vigilancia antimicrobiana, en donde los países participantes son; Argentina, Venezuela, Brasil, Chile, Colombia, Uruguay y la ciudad de México. En el

estudio realizado por el grupo SIREVA-VIGIA, se analizaron 4,105 cepas de *Streptococcus pneumoniae* causantes de infecciones invasivas, obtenidos de 1993 a 1999, donde los 13 serotipos predominantes fueron; 14, 6A/ 6B, 5, 1, 23F, 19F, 18C, 19A, 9V, 7F, 3, 9N y 4. Estos serotipos constituyeron el 86.1% de los aislados clínicos (60). El grupo de vigilancia SENTRY, solamente realizó estudios de susceptibilidad (61).

En México, uno de los primeros estudios encaminado a la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana, y a la distribución de los serotipos predominantes, fue el realizado en 1997 por Echániz y cols., donde se reportó al serotipo 23F como el más frecuente, seguido por el 6A/B, 14 y 19 (62). Sin embargo, estos resultados no son representativos del país ya que este estudio fue hecho en pacientes atendidos, solamente, en dos hospitales de la ciudad de México. Hoy se sabe que, los neumococos de ciertos serotipos capsulares son más proclives a desarrollar resistencia a antimicrobianos, ejem: 23F, 19F, 19 A, 14, 6B y 9V, los mismos que actualmente han formado clones de resistencia a diversos antimicrobianos (63).

La distribución geográfica de los 90 serotipos es universal y heterogénea, existiendo variaciones de país a país, incluso entre distintas regiones de un mismo país. Debido a esto, la verdadera eficacia de una vacuna reside en el conocimiento de los serotipos circulantes en un región dada, sin embargo la llegada de las vacunas neumocócicas sorprende a los países en vías de desarrollo, en una situación de desconocimiento total de su problemática

epidemiológica, lo que hace muy difícil adoptar decisiones racionales sobre la posible utilización de las vacunas. El conocimiento oportuno de la prevalencia y distribución de los serotipos en nuestro país nos permitirá en un futuro cercano, conocer la cobertura de las vacunas anti-neumocócicas; polisacárida 23 valente (PPV23) para adultos y la 7 valente conjugada (PNCRM-7) para niños, ya disponibles y utilizables en el mercado mexicano.

1.8 Resistencia bacteriana

A finales de los 60's, se aislaron las primeras cepas de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina, antibiótico considerado el tratamiento de elección en las enfermedades neumocócicas, lo que ha constituido un impacto de gran magnitud, ya que la resistencia a penicilina se asocia en forma heterogénea con resistencia a múltiples antimicrobianos, dificultando así la terapia en estas infecciones. En los siguientes 20 años, el problema se intensificó en Europa, particularmente en España, y en los 90's se magnificó en Estados Unidos y América Latina (61, 64, 65). De tal manera que, hoy la prevalencia de neumococos resistentes a penicilina y otros antibióticos se ha incrementado en todo el mundo.

En América Latina, específicamente en México, los neumococos resistentes a penicilina se reportaron por primera vez en 1981, por Guiscafré y colaboradores, reportando una resistencia a la penicilina del 10.5% (66).

Desde entonces, la susceptibilidad disminuida a la penicilina (la resistencia intermedia más la resistencia de alto nivel) ha sido reportada por varios grupos de estudio, entre ellos, el grupo LASER, SIREVA-VIGIA Y SENTRY, quienes han reportado susceptibilidades disminuidas del 23.6%, 28.6% y 30.7%, respectivamente (60, 61, 67).

El mecanismo de resistencia del *Streptococcus pneumoniae* a la penicilina se debe a las alteraciones que presentan las proteínas ligadoras a penicilina (Plp's) las cuales, han reducido su afinidad por la penicilina y por lo tanto a otros antibióticos beta-lactámicos relacionados. Las proteínas Plp's 1A, 2B y 2X son las responsables de la resistencia de alto nivel a la penicilina (68).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



1.9 Tratamiento antimicrobiano

Debido a la alta prevalencia de la resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a los diferentes antimicrobianos, se ha propuesto que, el tratamiento clínico sea emitido en base al conocimiento del patrón de susceptibilidad de *Streptococcus pneumoniae* a la penicilina, es por esto que para aquellos individuos con infecciones neumocócicas causadas por neumococos susceptibles a penicilina ($CMI \leq 0.06\mu\text{g/mL}$) se recomienda como

primera elección; penicilina o amoxicilina y como alternativas ya sea un macrólido como eritromicina, o una cefalosporina de 2ª generación, como cefuroxima y que los neumococos con resistencia intermedia a penicilina (CMI 0.12 – 1.0µg/mL) se traten con, amoxicilina (doble dosis) o, claritromicina como primera elección, y como alternativa cefalosporinas de 2ª, ó, 3ª generación; cefuroxime o ceftriaxona, o quinolonas, tales como, levofloxacin o moxifloxacin, si la infección es más severa. En relación con los *Streptococcus pneumoniae* altamente resistentes a la penicilina, es decir, aquellos con una CMI $\geq 2.0\mu\text{g/mL}$ se recomienda como primera elección, vancomicina y/o ceftriaxone, o bien como alternativa, levofloxacin, imipenem, o en su defecto una oxazolidinona como el linezolid, o bien, una estreptogramina B como el quinupristin/dalfopristin, ambas con excelente actividad contra *Streptococcus pneumoniae* (69, 70).

1.10 Epidemiología Molecular

Actualmente, la epidemiología molecular permite reconocer características genéticas de las bacterias, que de otra manera no podrían ser reveladas por las técnicas de identificación tradicionales. *Streptococcus pneumoniae*, desde sus inicios, ha demostrado que es naturalmente competente para la transformación genética. Es bien sabido que este mecanismo le permite incorporar ADN extraño, el mismo que es incorporado a su genoma a través de recombinación, la cual es clave para su proceso de supervivencia y evolución (71).

Como ya se ha mencionado, el fenómeno de resistencia del *Streptococcus pneumoniae*, ha surgido casi simultáneamente en diversas regiones geográficas distantes, afortunadamente, las técnicas de epidemiología molecular han puesto en evidencia que esa resistencia, es el resultado de eventos independientes entre si y que es una combinación de la diseminación de clonas, la adquisición y pérdida de genes de resistencia dentro de esas relaciones clonales, así como la diseminación de esos genes a nuevas clonas (71).

En medio de esa diversidad han surgido clonas que han alcanzado rápidamente una difusión intercontinental como la primera descrita en España; Spain 23F-1, altamente resistente a los antibióticos beta-lactámicos, cotrimoxazol, cloranfenicol y tetraciclina y que actualmente se ha diseminado al resto de los países de Europa, Estados Unidos de América, América Latina (México, entre ellos), Asia, África y Australia. La clona Spain 6B-2 se reportó inicialmente en Islandia, diseminándose al resto de Europa en poco tiempo. Se ha documentado que esta misma clona, se ha encontrado en Estados Unidos de Norte América. En América Latina, en sólo dos países; Colombia y Brasil, así como, en Asia y Australia (71). En 1997, se estableció la Red de Epidemiología Molecular Neumocócica (PMEN), bajo los auspicios de la Unión Internacional de Sociedades de Microbiología, con el objetivo de estandarizar la nomenclatura y clasificación de las clonas neumocócicas resistentes, que van

surgiendo en las diferentes regiones del mundo. Actualmente, se han identificado 26 clonas de resistencia a antimicrobianos (72).

Las técnicas que más han sido utilizadas como herramientas para poner de manifiesto las relaciones genéticas entre los *Streptococcus pneumoniae*, son; electroforesis de campo pulsado, o, pulsed field gel electrophoresis (PFGE) y la técnica de Multilocus, o, multi locus sequence typing (MLST). La PFGE es altamente discriminatoria y detecta, en el microorganismo, pequeñas variaciones que se acumulan rápidamente en el genoma bacteriano (42). La MLST se describió en 1998 y desde entonces se ha utilizado con mayor frecuencia, para detectar la secuenciación del ADN en fragmentos de genes seleccionados permitiendo la identificación de grupos de microorganismos, ya sea con genotipos altamente relacionados, o idénticos (43).

Justificación

Es necesario conocer; los patrones de resistencia-susceptibilidad, la distribución de los serotipos circulantes en nuestra región, así como, las relaciones genéticas entre los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina y la identificación de las clonas de resistencia.

El conocimiento de lo anterior:

Orientará al médico hacia una mejor elección de la terapia empírica utilizada en las enfermedades neumocócicas. Permitirá detectar la presencia de clonas de *Streptococcus pneumoniae* de resistencia a antimicrobianos circulando en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León. Permitirá estimar los grados de cobertura de la inmunización de las vacunas neumocócicas; PPV-23 polisacárida valente, utilizada en adultos y la PNCRM-7 heptavalente conjugada, utilizada en niños, de reciente introducción en la práctica médica mexicana.

Objetivo General

Determinar los patrones de resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a los antimicrobianos más utilizados en la práctica clínica, la distribución de los serotipos circulantes y el análisis molecular de las cepas resistentes a penicilina, aisladas de pacientes con enfermedades neumocócicas y atendidos en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León.

Objetivos específicos

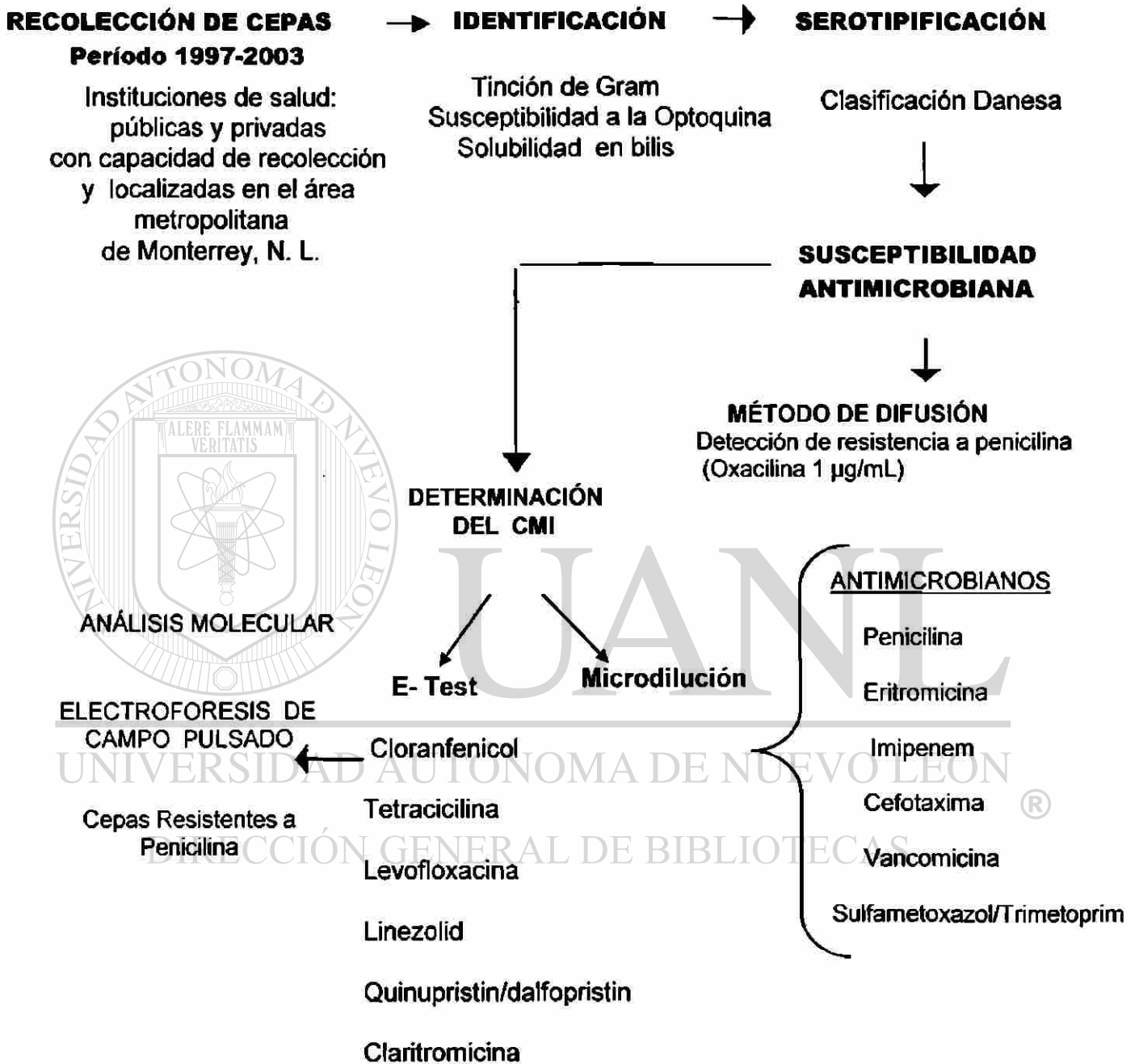
1. Recolectar e Identificar las cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas de niños y adultos con enfermedades neumocócicas y atendidos en Instituciones de salud, en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León desde diciembre de 1997 a febrero del 2003.
2. Determinar los patrones de resistencia de *Streptococcus pneumoniae* contra 12 antimicrobianos de uso clínico; tradicional y reciente.
3. Identificar los serotipos de las cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas de pacientes con enfermedades neumocócicas.
4. Obtener los patrones electroforéticos de las cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina por medio de electroforesis de campo pulsado (PGFE) y determinar la presencia de clones de resistencia a antimicrobianos, presentes en nuestra región.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Estrategia general

En el Esquema No.1, se muestra la estrategia general que se siguió para cumplir con los objetivos que se plantearon. Las cepas de *Streptococcus pneumoniae* se obtuvieron de niños y adultos, quienes fueron atendidos en siete Instituciones de salud; públicas y privadas (con capacidad de recolección) ubicadas en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León, durante el período 1997-2003. Estas cepas fueron subcultivadas y re-identificadas en el laboratorio con pruebas, como la tinción de Gram, la susceptibilidad a la optoquina y la solubilidad en sales biliares. Una vez identificadas, se procedió a la realización de la serotipificación de acuerdo a la clasificación Danesa, para la obtención de los serogrupos y serotipos de *Streptococcus pneumoniae*. Posteriormente, se realizaron las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, primeramente, una prueba de tamizaje para detectar la susceptibilidad de los microorganismos a la penicilina por medio de un disco de oxacilina de 1µg/mL y después la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para 12 antimicrobianos, utilizando las técnicas de microdilución y la prueba E. Todas las cepas con resistencia a la penicilina fueron sometidas al análisis molecular, por medio de la electroforesis de campo pulsado.



Esquema No.1. Estrategia general

2.2 Recolección de las cepas

Se obtuvieron 228 cepas de *Streptococcus pneumoniae*, aisladas de niños y adultos con infecciones neumocócicas, atendidos en Instituciones de Salud; públicas y privadas, del área metropolitana de Monterrey, N. L., durante el período de diciembre de 1997 a febrero del 2003. Las cepas de *Streptococcus pneumoniae* después de su recolección, se visualizaron por medio de la tinción de Gram, para verificar su pureza y se subcultivaron en placas de agar sangre de carnero al 5%, incubándose por 24 horas a 35°C y 5% de CO₂ para su posterior re-identificación.

2.3 Muestras clínicas

En general, la procedencia clínica de las cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas de niños y adultos, así como el resto de los datos clínicos, que acompañaba a cada cepa, fueron proporcionados por el personal de laboratorio de cada una de las Instituciones de salud. Las muestras clínicas fueron las siguientes; exudados óticos, conjuntivales y faríngeos, aspirados de senos maxilares, expectoraciones, lavados, o cepillados broncoalveolares, líquidos pleurales, secreciones de celulitis y absceso de hígado, sangre y líquido cefalorraquídeo.

2.4 Identificación de *Streptococcus pneumoniae*

2.4.1 Susceptibilidad al disco de optoquina

La optoquina es una sustancia química, hidrocloreto de etil hidrocupreína, al cual *Streptococcus pneumoniae* es susceptible. Para la prueba de la optoquina se utilizan discos de 6 mm de diámetro impregnados con 5µg de etilhidrocupreína y placas de agar sangre de carnero al 5%. Para este procedimiento, se obtuvo un cultivo puro de *Streptococcus pneumoniae* desarrollado en placas de agar sangre de carnero al 5%, se preparó una suspensión bacteriana en solución salina (0.9%) con una densidad igual al 0.5 del estándar de Mc Farland, posteriormente se inoculó de manera homogénea en una placa de agar sangre de carnero al 5%, con la ayuda de un hisopo. Se colocó un disco de optoquina en el centro del área inoculada, presionando suavemente el disco, para que se adhiriera a la superficie. Finalmente, las cajas se invirtieron y se incubaron por 24 hrs. a 35 °C y un 5% de CO₂. La interpretación de la prueba, se realizó de acuerdo a lo establecido por el manual de procedimientos de la American Society for Microbiology (ASM) (11). Si el halo de inhibición era mayor o igual a 14 mm de diámetro se le consideró como *Streptococcus pneumoniae*, pero, todas aquellas cepas que presentaron un halo menor o ninguno, fueron sometidas a la prueba de solubilidad en bilis.

2. 4. 2 Prueba de la solubilidad en bilis

Las sales bilares, específicamente el desoxicolato y taurocolato de sodio tienen la capacidad de lisar selectivamente a *Streptococcus pneumoniae* cuando el reactivo se incorpora a las células bacterianas que se desarrollan en un medio de cultivo artificial. Para realizar este procedimiento, se obtuvo un cultivo puro de 24 h de *Streptococcus pneumoniae*, se marcaron dos tubos de 13 x 100, uno como prueba y otro como control, a cada uno se le agregó 0.5 mL de caldo cerebro-corazón. Ambos tubos se inocularon con una asada ligera de *Streptococcus pneumoniae*, al tubo de prueba se le agregó 0.5 mL de desoxicolato de sodio al 10%, mientras que al tubo control se le adicionó 0.5 mL de caldo cerebro-corazón. Se agitaron ambos tubos suavemente y se incubaron 3 h a 35 °C, observándolos cada hora. Una reacción positiva se interpretó cuando se visualizó una aclaración de la turbidez en el tubo de la prueba, lo que significó que el *Streptococcus pneumoniae* estuvo presente y que fue lisado por la sal biliar, mientras que, el tubo control permaneció turbio después de tres horas de incubación (11).

2.5 Pruebas de Susceptibilidad antimicrobiana

2.5.1 Susceptibilidad a la penicilina (Oxacilina 1µg/mL)

Todas las cepas fueron sometidas a la prueba cualitativa de la difusión del disco de oxacilina en agar y para esto, se preparó un cultivo joven de *Streptococcus pneumoniae* y se hizo una solución bacteriana comparable al 0.5 de Mc

Farland, posteriormente, con un hisopo se inoculó uniformemente sobre cada una de las placas de agar sangre de carnero. Individualmente se colocó el disco de 1 µg/mL de oxacilina sobre la superficie de las placas. Estas se incubaron por 20-24 h a 35 °C. Para la Interpretación de la lectura, se midió el halo de inhibición con un vernier, cuando el halo era ≥ 20 mm, se consideró que *Streptococcus pneumoniae* era susceptible a penicilina (11). La cepa de *S. aureus* de la American Type Culture Collection (ATCC) 25923 y la cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 se utilizaron como controles de calidad. Sin embargo, para una determinación cuantitativa del antimicrobiano se realizaron las técnicas de dilución seriada en placa de microtitulación y la prueba E para todas las cepas.

2.5.2 Susceptibilidad a la Penicilina; Determinación de la CMI

Las 207 cepas de *Streptococcus pneumoniae* fueron sometidas a la técnica de microdilución en placa de titulación y para esto, se llevó a cabo el siguiente procedimiento: las placas de microdilución de 96 pozos fueron preparadas previamente, con las diferentes concentraciones del antibiótico y congeladas hasta su uso. Se obtuvo un cultivo joven de las cepas de *S. pneumoniae* en estudio y de los controles; *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, se incluyeron también dos cepas; una sensible y otra resistente a la penicilina. Por otro lado, la sangre de caballo se sometió a un procedimiento especial de congelación y descongelación por tres ocasiones (para hemolizar la sangre). Posteriormente se tomó una alícuota

de esta sangre y se preparó una solución al 50% y de aquí, se agregaron 5 mL a 100 mL de caldo Mueller-Hinton, esta suspensión se guardó en refrigeración para que, en su momento, se hiciera la suspensión bacteriana. Para la solución de trabajo del antibiótico se preparó una solución concentrada de 10,000 µg/mL de penicilina. Se hizo una dilución 1:10 con agua estéril, para tener una concentración final de 1000 µg/mL. Se agregó 0.1 mL del concentrado de penicilina (1000 µg/mL) a 6.15 mL de caldo Mueller-Hinton con sangre de caballo, obteniéndose 6.25 mL de solución de trabajo de penicilina (concentración de 16 µg/mL). Luego se hicieron las diluciones de penicilina (16 a 0.015 µg/mL) en caldo de Mueller-Hinton suplementado con sangre de caballo. Se colocó en cada pozo (11 de los 12 de cada fila de la microplaca) 50 µL de las diferentes concentraciones de penicilina preparada en caldo Mueller-Hinton suplementado, el último pozo solo contenía medio de cultivo. Se preparó el inóculo bacteriano a partir de un cultivo puro y se emulsificó el microorganismo en 3 mL de solución salina estéril a una densidad igual al estándar de 0.5 de Mc Farland, equivalente a 10^8 UFC/mL.

Se diluyó la suspensión bacteriana 1:100 agregando 0.1 mL a 9.9 mL de caldo Mueller-Hinton suplementando con sangre de caballo. Luego, se agregaron 50µL del inóculo bacteriano, a cada uno de los 12 pozos dispuestos horizontalmente en la microplaca, el último pozo solo contenía *Streptococcus pneumoniae* y el diluyente, y, actuó como control de crecimiento. La concentración del *Streptococcus pneumoniae* en el pozo fue de 5×10^4 UFC/mL. En el último pozo, dispuesto horizontalmente en la microplaca, solo

contenía medio de cultivo y sirvió como control de esterilidad. Finalmente las placas se incubaron por 24 h a 35 °C. Para la interpretación de las lecturas primero se revisaron los pozos de los controles de crecimiento y después los controles de esterilidad. Posteriormente se observaron los controles de susceptibilidad y resistencia, por último, se analizaron los resultados de los aislamientos clínicos, indicando la concentración del antibiótico en la que ya no se presentó crecimiento bacteriano, lo cual, se determinó como la CMI (73). El mismo procedimiento, sólo variando las diluciones, se utilizó para la realización de la CMI de los antibióticos; Eritromicina(E), Imipenem (IPM), Cefotaxima CTX), Sulfametoxazol/ Trimetoprim (SXT)y Vancomicina (VAN).

2.5.3 Prueba E

Para la realización de esta prueba se utilizaron las tiras E (AB Biodisk NA, Piscataway, N. J.) de los siguientes antimicrobianos; Cloranfenicol (CL), Tetraciclina (TE), Levofloxacina (LV), Linezolid (LZ), Quinupristín/Dalfopristín (Q/R) y Claritromicina (CH). Para el procedimiento, se obtuvo un cultivo joven para cada una de las cepas de *Streptococcus pneumoniae* y se realizó una suspensión bacteriana equivalente al 0.5 de Mc Farland. Se inocularon una a una, las diferentes cepas de *Streptococcus pneumoniae* sobre la superficie de placas de 150 mm de agar con sangre de carnero al 5% y se dejaron secar al medio ambiente. Posteriormente, se colocaron las tirillas de los antimicrobianos ya descritos. Se invirtieron las placas y se incubaron por 24 h a 35 °C y a una atmósfera de 5% de CO₂. La interpretación de las lecturas se hizo en la

intersección de la última dilución del antimicrobiano, que fue capaz de inhibir el desarrollo del microorganismo, y el inicio del crecimiento bacteriano, determinándose así, la CMI. Para las interpretaciones de las lecturas de la dilución seriada en microplaca y de la Prueba E, se tomaron en cuenta los criterios establecidos por el National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (73).

2.6 Serotipificación (reacción de Neufeld)

En las 207 cepas de *Streptococcus pneumoniae*, se llevó a cabo la serotipificación, con el siguiente procedimiento ; primero, se obtuvo un cultivo joven de *Streptococcus pneumoniae* de 24 h. Por otro lado, en un portaobjetos previamente rotulado con el número de la cepa, se colocó una gota del amortiguador de fosfatos pH 7.2. Posteriormente, se agregaron de 1-3 colonias bacterianas y se le adicionó solamente una gota de suero (Omni, Statens Serum Institut, Dinamarca) conteniendo los serogrupos en las mezclas de la A - I. Se cubrió la preparación con un cubreobjetos, se colocó una gota de aceite de inmersión y se observó con objetivo de 40x y 100x para visualizar el hinchamiento capsular (reacción de Neufeld). Para el serotipo, se emplearon sueros específicos del grupo y de factores tipo. Con esta metodología existe la oportunidad de identificar 46 serogrupos y 90 serotipos diferentes de *Streptococcus pneumoniae* (14).

Análisis Molecular: Electroforesis de campo pulsado (PFGE)(74).

130 cepas de *Streptococcus pneumoniae* con susceptibilidad disminuida a la penicilina fueron sometidas al análisis molecular

2.7.1 Crecimiento de las cepas de *Streptococcus pneumoniae*

2.7.1.1 Inoculación e Incubación

Se inoculó una cuarta parte de una placa de un cultivo joven y puro de *Streptococcus pneumoniae*, en 10 mL de caldo Todd Hewitt. Para la incubación, los tubos se colocaron en un baño de hielo, el cual fue programado para que cambiara su temperatura a 37 °C a las 3:00 h y los tubos se quedaron incubando toda la noche, al día siguiente se sacaron y se colocaron en un recipiente con hielo.

2.7.1.2 Obtención de la cosecha celular

Se calibró el espectrofotómetro previamente. La cosecha celular se obtuvo cuando los tubos se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm y dieron una densidad óptica (DO) entre 0.7 y 0.9 (fase logarítmica). Los tubos fueron colocados nuevamente en un recipiente con hielo y ahí mismo fueron transferidos a tubos Falcon de 15 mL. Para la centrifugación, primero se verificó que los cilindros estuvieran perfectamente bien equilibrados pesándolos en una balanza granataria, una vez realizado lo

anterior, se procedió a centrifugar los tubos por 15 min. a 4,000 revoluciones por minuto (rpm) y a 4 °C. Mientras tanto, se colocó en un recipiente con hielo un tubo con 30 mL. de PIV.

2.7.2 Lavado de la pastilla

Después de la centrifugación se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1 mL del amortiguador PIV pH 8, luego, se transfirió en un microtubo y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se resuspendieron las células en 200 µL de PIV, se homogenizaron bien y se colocaron en hielo.

2.7.3 Ajuste de la concentración celular del neumococo

Se rotularon dos celdas para espectrofotómetro, uno como blanco o control y el otro como problema. A cada uno se le agregó un 1 mL de PIV y sólo al problema se le adicionó 5 µL del concentrado celular de *Streptococcus pneumoniae*, ambos tubos se agitaron por inversión y se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm. La primera celda fungió como control y con ella se calibró el aparato y la segunda fue la lectura del primer problema anotándose la D. O. obtenida, la cual debería caer entre 0.05 y 0.25. Este procedimiento se repitió para cada uno de los neumococos estudiados. A cada tubo, se le agregó un diferente volumen de PIV para ajustar a una D. O. de 5, el volumen adicional se obtuvo con la siguiente formula:

$$V \text{ ad } \mu\text{L} = D.O. \text{ de c/cepa} \times 40 \times 240-240$$

2.7.4 Elaboración de los discos de agarosa

Los tubos conteniendo 150 μL de la suspensión bacteriana, se colocaron en un baño María a 42 °C por 1^{1/2} min. Inmediatamente después, se les adicionó a cada uno de los tubos 150 μL de agarosa LMP al 1.5% disuelta en PIV. De esta mezcla se colocaron 20 μL en un portaobjetos, formándose así un pequeño disco, el portaobjetos se metió al congelador de -20 °C solamente por 5 minutos. De esta manera se obtuvieron de 14 a 15 discos de agarosa por cada cepa.

2.7.5 Lisis Celular *in-situ*

Para esto, se descongeló previamente el stock de RNAasa de 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de aquí se tomaron 75 μL y se depositaron en un tubo con 15 mL de E-C (EDTA y cloruro de sodio) para hacer la suspensión de lisis E-C [6.0 mM]. Posteriormente, se colocaron todos los discos en un tubo de 15 mL que contenía 1 mL de la suspensión de lisis E-C, los tubos se incubaron a 37 °C por 3 h. Mientras tanto, se preparó la proteinasa K; se pesaron 0.015 mgr y se disolvieron en 15 mL de E-S (EDTA y Sarcosil) pH 9.0 [1mg/mL]. Luego, se realizó una segunda lisis cuando se les agregó 1 mL de la solución ESP (EDTA, Sarcosil y Proteinasa K) a cada tubo y se incubaron nuevamente a 50 °C por toda la noche. Al día siguiente se lavaron los discos con amortiguador TE (Tris-

EDTA) [10mM] para eliminar los posibles residuos celulares. El lavado de los discos se hizo 5 veces, al término de ello se guardaron a 4 °C.

2.7.6 Digestión celular

Se tomó, solamente un solo disco, de cada una de las cepas y se le agregó 500 µL del amortiguador de restricción *preSma I*, se incubó a 25 °C durante 30 minutos. Posteriormente se le retiró el amortiguador y se le adicionaron 50 µL de la enzima de restricción *Sma I*, se incubó toda la noche en baño María a 25 °C. Al día siguiente, se detuvo la reacción adicionando 10 µL del buffer de carga.

2.7.7 Preparación del gel de agarosa al 1% y colocación de las cepas

Primero, se hicieron 3 litros del amortiguador de corrida Tris Borato EDTA (TBE; Trizma base, ácido bórico, EDTA) con una concentración de 0.5X. De este buffer se tomaron 100 mL para hacer el gel, el resto se utilizó en la cámara para correr el gel. Todas las piezas de la cámara se habían enjuagado previamente con agua bidestilada. En la preparación del gel, se pesó 1 g de agarosa (Seaken LE) y se disolvió en 70 mL del amortiguador, una vez disuelto, se le agregaron los 30 mL restantes. Se depositó la agarosa en el molde y se esperó de 30 minutos a una hora hasta que el gel se solidificó completamente. Posteriormente, el marcador de peso molecular lambda ladder (rango 50-1000 Kb), los controles correspondientes y las cepas de *Streptococcus pneumoniae*

se depositaron cuidadosamente en los pozos del gel, procediéndose inmediatamente a sellarlos con agarosa. En seguida, el gel se sometió a la cámara de electroforesis de campo pulsado, con las siguientes condiciones: Tiempo de corrida = 23 h, Voltaje 200 V= 6.0, tiempo inicial = 1 seg., con un tiempo final de 30 seg.

2.7.8 Tinción del gel

El gel se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/mL por 30 min. Se destiñó el gel con agua por 30 minutos y se tomó una fotografía con película polaroid 667 positivo.

2.7.9 Interpretación del patrón electroforético

El análisis de los fragmentos del ADN cromosomal de *Streptococcus pneumoniae* obtenidos en la electroforesis de campos pulsados se interpretó siguiendo los criterios de Tenover (42).

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS

3.1 Recolección de las cepas de *Streptococcus pneumoniae*

En el período de estudio; 1997-2003, se recolectaron 228 cepas de *Streptococcus pneumoniae*, De estas cepas, 16 fueron descartadas por los motivos descritos en la Tabla No.1, de tal manera que el total de cepas recuperadas fueron 212. La procedencia clínica de las cepas aisladas de niños y adultos, así como sus porcentajes se observan en la Tabla No. 2

Tabla No.1 Cepas recolectadas en el período 1997-2003

| | |
|---|------------|
| Cepas obtenidas durante el período | 228 |
| Cepas Contaminadas | - 6 |
| Cepas sin crecimiento en el subcultivo | - 7 |
| Cepas sin datos clínicos suficientes | - 3 |
| Total de cepas recuperadas | 212 |

Tabla No. 2 Procedencia clínica de las cepas aisladas de niños y adultos

| Procedencia clínica | Niños % | Adultos % |
|---------------------|---------|-----------|
| Ex. Otico | 22.5 | 2.6 |
| Lavado bronquial | 21.7 | 16.7 |
| LCR | 14.7 | 7.7 |
| Ex. Conjuntival | 13.2 | 11.5 |
| Ex. Faríngeo | 10.9 | 2.6 |
| Ex. Nasofaríngeo | 4.7 | — |
| Sangre | 4.7 | 6.4 |
| Líqu. Pleural | 2.3 | 10.3 |
| A Sen. Maxilar | 2.3 | 3.8 |
| Expectoración | 1.6 | 33.3 |
| Otros | 1.6 | 5.2 |

3.2 Identificación de *Streptococcus pneumoniae*

Las 212 cepas recolectadas fueron sometidas a las pruebas de optoquina y solubilidad en bilis, previa tinción de Gram. En la Tabla No. 3, se observa que las cepas susceptibles a la optoquina fueron 198 y las resistentes 14, de las cuales, 5 resultaron insolubles y presentaron contaminación cuando se observaron con la tinción de Gram, lo que significó que realmente no eran *Streptococcus pneumoniae*, por lo que fueron descartadas quedando, 207 cepas a estudiar.

Tabla No. 3 Identificación de *Streptococcus pneumoniae*

| Identificación de <i>Streptococcus pneumoniae</i> | | | |
|--|-----|-----------------------------------|---|
| Prueba de la Optoquina | | Prueba de la Solubilidad en bilis | |
| Susceptibles | 198 | Solubles | 9 |
| Resistentes | 14 | Insolubles | 5 |
| Cepas confirmadas como <i>Streptococcus pneumoniae</i> ... 207 | | | |

3.3 Datos Socio-demográficos

De las 207 cepas identificadas como *Streptococcus pneumoniae* ; 129 provenían de pacientes pediátricos y 78 de pacientes adultos. El número de pacientes masculinos y femeninos, el intervalo de edad y la media, se presentan en la Tabla No.4.

Tabla No. 4 Cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas de niños y adultos

| CEPAS DE <i>Streptococcus pneumoniae</i> Aisladas de niños y adultos | | |
|---|-----------------|--------------|
| | DE NIÑOS | DE ADULTOS |
| | n= 129 | n= 78 |
| MASCULINOS | 76 | 51 |
| FEMENINOS | 53 | 27 |
| EDAD | 1 mes – 16 años | 20 – 86 años |
| X | 4 años | 50 años |

La procedencia hospitalaria de las 207 cepas de *Streptococcus pneumoniae*, fue; Instituciones privadas; 53%, Instituciones públicas; 47% en el caso de las cepas aisladas de niños, mientras que, las cepas de los adultos

provenían de Instituciones privadas; 27% y de Instituciones públicas; 73%. La procedencia geográfica de los niños fue; área metropolitana 116, con un porcentaje de 90%, mientras que 13 (10%) pacientes provenían de áreas aledañas al área metropolitana. Los pacientes adultos, 64 (82.3%) provenían del área metropolitana y 14 (17.7%) de los Estados de Coahuila, Tamaulipas, San Luis Potosí y Veracruz. Se administró tratamiento antimicrobiano previo a la recolección de la cepas a 67 (51.9%) niños, en 6 (4.7%) no se documentó y en 56 (43.4%) no se administró alguno.

En adultos, el tratamiento antimicrobiano fue administrado en 18 (23.1%) pacientes, en 6 (7.7%) no se documentó, mientras que en 54 (69.2%) pacientes no se administró tratamiento alguno. De los 129 niños; 77 (59.7%) fueron hospitalizados y 52 (40.3%) fueron pacientes externos. De los 78 pacientes adultos, la mayoría, 60 (76%), fueron hospitalizados, 14 (17.9%) fueron pacientes externos y sólo de 4 (6.1%) no se documentó el dato de hospitalización.

3.4 Diagnóstico clínico

El diagnóstico de las infecciones neumocócicas, se describió como infecciones de vías respiratorias altas (no-invasivas), infecciones de vías respiratorias bajas (neumonías) e infecciones invasivas, tanto en niños como

en adultos. En la tabla No. 5, se muestran los diagnósticos representados en porcentajes, reportados en niños y adultos.

Tabla No.5 Diagnóstico reportado en niños y adultos

| NIÑOS | | ADULTOS | |
|---------------------------------|-------|----------------|-------|
| n= 69 | | n= 17 | |
| VÍAS RESPIRATORIAS ALTAS | | | |
| No- Invasivas | | | |
| OTITIS | 22.5% | OTITIS | 2.6% |
| FARINGITIS | 15.5% | FARINGITIS | 3.8% |
| CONJUNTIVITIS | 13.2% | CONJUNTIVITIS | 11.5% |
| SINUSITIS | 2.3% | SINUSITIS | 3.8% |
| A. RETROAURICULAR | 0.8% | | |
| n =31 | | n= 47 | |
| VÍAS RESPIRATORIAS BAJAS | | | |
| NEUMONÍA | 23.3% | NEUMONÍA | 50 % |
| EMPIEMA 2o. | 1.6% | EMPIEMA 2o. | 10.3% |
| n= 29 | | n= 14 | |
| INFECCIONES INVASIVAS | | | |
| MENINGITIS | 14.5% | MENINGITIS | 7.7% |
| BACTEREMIA | 4.7% | BACTEREMIA | 6.4% |
| EMPIEMA 1o. | 0.8% | ARTRITIS | 1.3% |
| CELULITIS | 0.8% | A. HEPÁTICO | 1.3% |
| | | PERITONITIS | 1.3% |

En general, los porcentajes de los diagnósticos en niños y adultos fue el siguiente; vías respiratorias altas; 54.3% y 21.7%, vías respiratorias bajas; 24.9% y 60.3% y para las infecciones invasivas fue; 20.8% y 18.0%, respectivamente.

3.5 Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana

3.5.1 Susceptibilidad a la penicilina (oxacilina) en cepas aisladas de niños y adultos

La susceptibilidad de las cepas a la oxacilina, aisladas de niños y adultos, fue de 31 (24%) y 39 (50%) y la resistencia fue de 98 (76%) y 39 (50%) respectivamente.

3.5.2 Susceptibilidad a la penicilina; Determinación de la CMI en cepas aisladas de niños y adultos

La susceptibilidad disminuida a la penicilina, se describe como la suma de la resistencia intermedia (0.1-1 μ g/mL) y la resistencia de alto nivel (\geq 2.0 μ g/mL). En las cepas aisladas de niños se detectó una susceptibilidad a la penicilina (\leq 0.06 μ g/mL) de 31 (24%), una resistencia intermedia de 48 (37%) y una resistencia de alto nivel de 50 (39%). Para las cepas de los adultos, 39 (50%) fueron susceptibles, 19 (24%) presentaron resistencia intermedia y 20 (26%) cepas con resistencia de alto nivel. La multirresistencia (Multi-R) se describe como la resistencia a 3, ó, más antimicrobianos.

La susceptibilidad disminuida, en general, a la Penicilina fue del 66%.

3.5.3 Diagnóstico de las infecciones neumocócicas en niños, resistencia a penicilina y multirresistencia.

En la tabla No. 6, 7, y 8 se presenta el diagnóstico de las infecciones de vías respiratorias altas (no-invasivas), de vías respiratorias bajas (neumonías), y el de infecciones invasivas, el rango de edad de los niños en los que se presentó y la resistencia a penicilina y multirresistencia de las cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas de esas infecciones. Observándose que el mayor porcentaje de resistencia a penicilina y multirresistencia se observó en las cepas aisladas de otitis. La mayoría de los niños, eran menores de 5 años.

Tabla No. 6 Infecciones no-invasivas en niños resistencia a penicilina y multirresistencia

| INFECCIÓN | RANGO EDAD | R- a- PENI | MULTI-R |
|--|-----------------------------------|---------------------|---------|
| FARINGITIS SINUSITIS A. R-AURICULAR (n= 23) | 9m - 9 años (\bar{X} =4.9) | 78% | 65% |
| OTITIS (n= 29) | 3m - 14 años (\bar{X} =3.5) | 93% | 76% |
| CONJUNTIVITIS (n= 17) | 2m - 7 años (\bar{X} =1.8) | 70% | 70% |
| TOTAL= 69 (54%) | | 82% ≤ 5 años | |

Tabla No. 7 Infecciones de vías respiratorias bajas en niños resistencia a penicilina y multirresistencia

| INFECCIÓN | RANGO EDAD | R- a- PENI | MULTI-R |
|--|---|---------------------|----------------|
| NEUMONÍA y EMPIEMA (n=31) | 4m – 17 años (\bar{x} =5.4) | 81% | 68% |
| TOTAL = 31 (25%) | | 65% ≤ 5 años | |

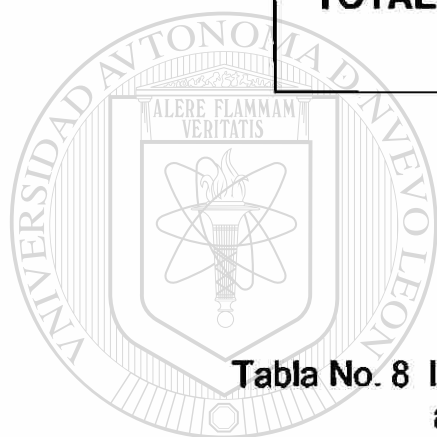


Tabla No. 8 Infecciones invasivas en niños, resistencia a penicilina y multirresistencia

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

| INFECCIÓN | RANGO-EDAD | R- a- PENI | MULTI-R |
|--|---|-----------------------|----------------|
| MENINGITIS (n=19) | 2m – 17 años (\bar{x} =2.9) | 58% | 53% |
| BACTEREMIA EMPIEMA 1o. Y CELULITIS (n=10) | 2 – 13 años (\bar{x} = 4.3) | 40% | 10% |
| TOTAL = 29 (21%) | | 89.6% ≤ 5 años | |

3.5.3.1 Susceptibilidad de *S. pneumoniae* contra otros antimicrobianos

En la Tabla No. 9 se presenta la susceptibilidad de las cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas de niños, probadas contra once antimicrobianos. Los antimicrobianos con mayor actividad sobre los neumococos aislados de niños fueron CL, Q/R, LZ, LV y VAN. Mientras que los de menor actividad fueron SXT, E, CH y TE. El punto de corte para la cefotaxima, cefalosporina de 3^a. generación con penetración a líquido cefalorraquídeo, es diferente para los *Streptococcus pneumoniae* no-causantes de meningitis (S \leq 1 μ g/mL, I= 2 μ g/mL y R= 4 μ g/mL) y los causantes de meningitis, (S \leq 0.5 μ g/mL, I= 2 μ g/mL y R= 2 μ g/mL) éstos nuevos criterios de interpretación fueron establecidos por el NCCLS documento No. M 100-S12. 2003. Las cepas aisladas de niños no-causantes de meningitis fueron (110; 85%) y las causantes de meningitis fueron (19;15%) y en la tabla 9 se observan como CTXno-m y CTXm, respectivamente.

Tabla No. 9 Porcentaje de la susceptibilidad de las cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas de niños y probadas contra 11 antimicrobianos

| Antimicrobiano | Susceptible | Intermedio | Resistente |
|-----------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| | % | % | % |
| IPM | 68 | 28 | 4 |
| E | 60 | 0 | 40 |
| CH | 60 | 0 | 40 |
| TE | 60 | 0 | 40 |
| SXT | 27 | 12 | 61 |
| CL | 85 | 0 | 15 |
| LV | 100 | 0 | 0 |
| LZ | 99 | 0 | 1 |
| Q/R | 98 | 2 | 0 |
| VAN | 100 | 0 | 0 |
| CTXno-m | 70 | 22 | 8 |
| CTXm | 69 | 5 | 26 |

3.5.4 Diagnóstico de las infecciones neumocócicas en adultos, resistencia a penicilina y multirresistencia.

El diagnóstico de la infecciones neumocócicas de los pacientes adultos, el rango de edad, y la resistencia a penicilina, así como, la resistencia a múltiples antibióticos en las cepas de *Streptococcus pneumoniae* causantes de estas infecciones es apreciado en la Tabla No. 10

Tabla No. 10 Diagnóstico de las infecciones neumocócicas en Adultos, resistencia a penicilina y multirresistencia

| INFECCIÓN | RANGO EDAD | R- a- PENI | MULTI-R |
|--|-----------------------------------|------------|---------|
| FARINGITIS SINUSITIS OTITIS CONJUNTIVITIS (n=17) | 20 – 85 años (\bar{x} = 44) | 35% | 41% |
| NEUMONIA Y EMPIEMA (n=47) | 22 - 86 años (\bar{x} = 54) | 51% | 43% |
| MENINGITIS (n=6) | 33 – 72 años (\bar{x} 47) | 84% | 84% |
| BACTEREMIA Y OTROS (n=8) | 30 – 73 años (\bar{x} = 47) | 38% | 38% |

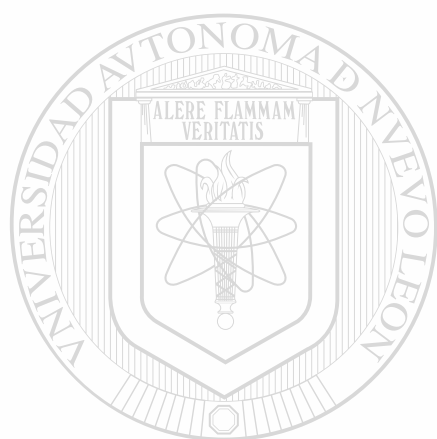
3.5.4.1 Susceptibilidad de *Streptococcus pneumoniae*, aislados de adultos, contra otros antimicrobianos

En la Tabla No. 11, se observa la susceptibilidad de las cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas de adultos, probadas contra 11 antimicrobianos. Los antimicrobianos de mayor actividad fueron CL, LV, LZ, Q/R y VAN y CTXno-m. Los de menor actividad fueron CTXm, SXT y TÉ. Las recomendaciones para los puntos de corte para la cefotaxima son los mismos que se aplicaron para las cepas aisladas de niños.

Tabla No. 11 Porcentaje de la susceptibilidad de *Streptococcus pneumoniae* aisladas de adultos y probadas contra 11 antimicrobianos

| Antimicrobiano | Susceptible | Intermedio | Resistente |
|----------------|-------------|------------|------------|
| | % | % | % |
| IPM | 71 | 28 | 1 |
| E | 72 | 1 | 27 |
| CH | 72 | 1 | 27 |
| TE | 68 | 2 | 30 |
| SXT | 46 | 6 | 48 |
| CL | 78 | 0 | 22 |
| LV | 99 | 0 | 1 |
| LZ | 100 | 0 | 0 |
| Q/R | 100 | 0 | 0 |
| VAN | 100 | 0 | 0 |
| CTXno-m | 80 | 14 | 6 |
| CTXm | 33 | 17 | 50 |

Las cepas aisladas de adultos no-causantes de meningitis fueron 72 (92%) y las causantes de meningitis fueron 6 (8.3%) y en la anterior tabla se observan como CTXno-m y CTXm, respectivamente.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

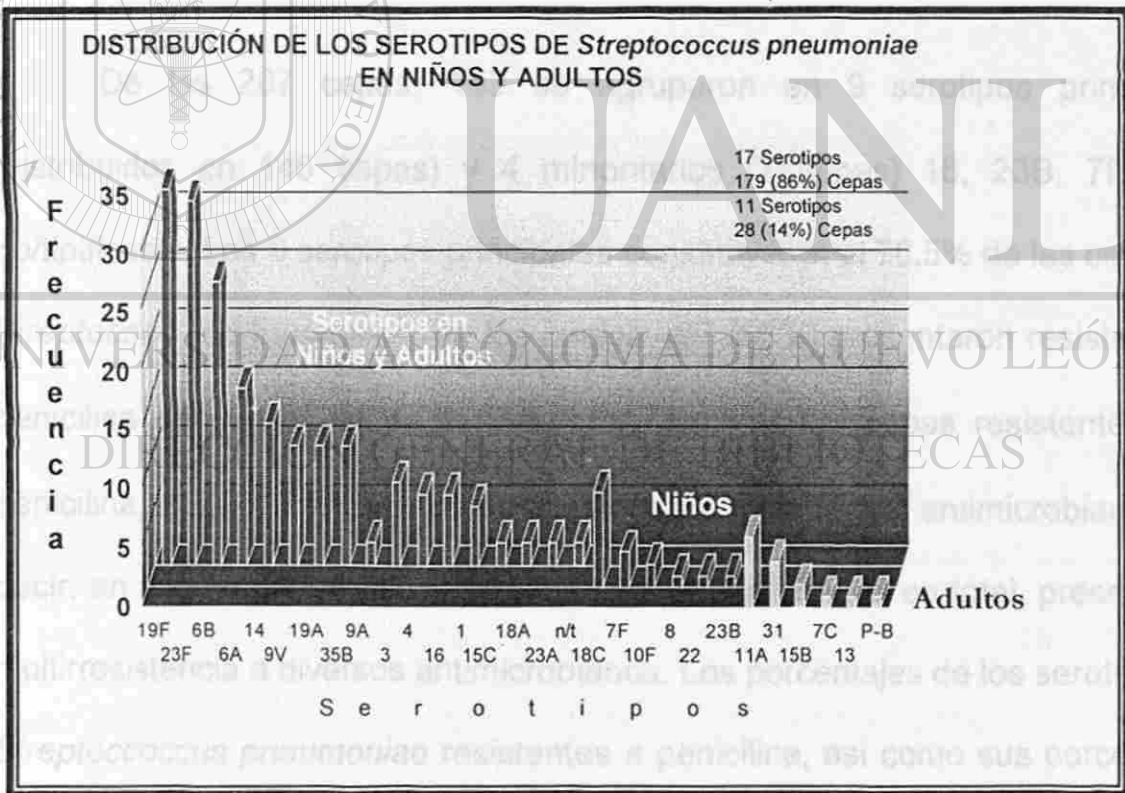


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.6 Serotipificación de *Streptococcus pneumoniae*

3.6.1 Serotipos aislados de niños y adultos

Se identificaron 29 serotipos diferentes en las 207 cepas de *Streptococcus pneumoniae* estudiadas; 17 (86.5%) estuvieron implicados en las infecciones neumocócicas tanto en niños como en adultos y de los 12 (13.5%) serotipos restantes 6 estuvieron implicados en infecciones neumocócicas sólo en adultos y 6 serotipos más, exclusivamente aislados de infecciones en niños. Gráfica No.2



Gráfica No. 2 Serotipos de *Streptococcus pneumoniae* aislados de niños y adultos

Los 17 serotipos, aislados de niños y adultos, así como, su frecuencia fueron los siguientes: 19F (32), 23F (31), 6B (24), 6A (15), 14 (12), 9V (10), 19A (10), 35B (10), 9A (2), 1 (4), 3 (7), 4 (6), 15C (2), 16 (5), 18A (2), 23A (2), n/t (5). Los seis serotipos y su frecuencia aislados sólo en niños fueron; 7F (3), 8 (1), 10F (1), 18C (8), 22 (1), 23B (1). Mientras que, la frecuencia de los seis serotipos aislados solamente en adultos fue; 7C (1), 11A (5), 13 (1), 15B (2), 31 (3), y Pool B (1).

3.6.2 Serotipos; Susceptibilidad a la penicilina y multirresistencia en cepas aisladas de niños y adultos

De las 207 cepas, 153 se agruparon en 9 serotipos principales (distribuidos en 146 cepas) y 4 minoritarios (7 cepas) 16, 23B, 7F y un no/tipificable. Los 9 serotipos principales constituyeron el 70.5% de las cepas de *Streptococcus pneumoniae*, de los cuales 137 (66%) presentaron resistencia a penicilina con una CMI de 0.12-8µg/mL. De las 137 cepas resistentes a la penicilina, 112 (81.7%) exhibieron resistencia a más de tres antimicrobianos. Es decir, en términos generales el 54% de las cepas, de 207 en total, presentaron multirresistencia a diversos antimicrobianos. Los porcentajes de los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina, así como sus porcentajes de la multirresistencia se observan en la Tabla No.12.

Tabla No. 12 Principales serotipos de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la penicilina y multirresistentes obtenidos de niños y adultos durante un período de 6 años en Monterrey. N. L.

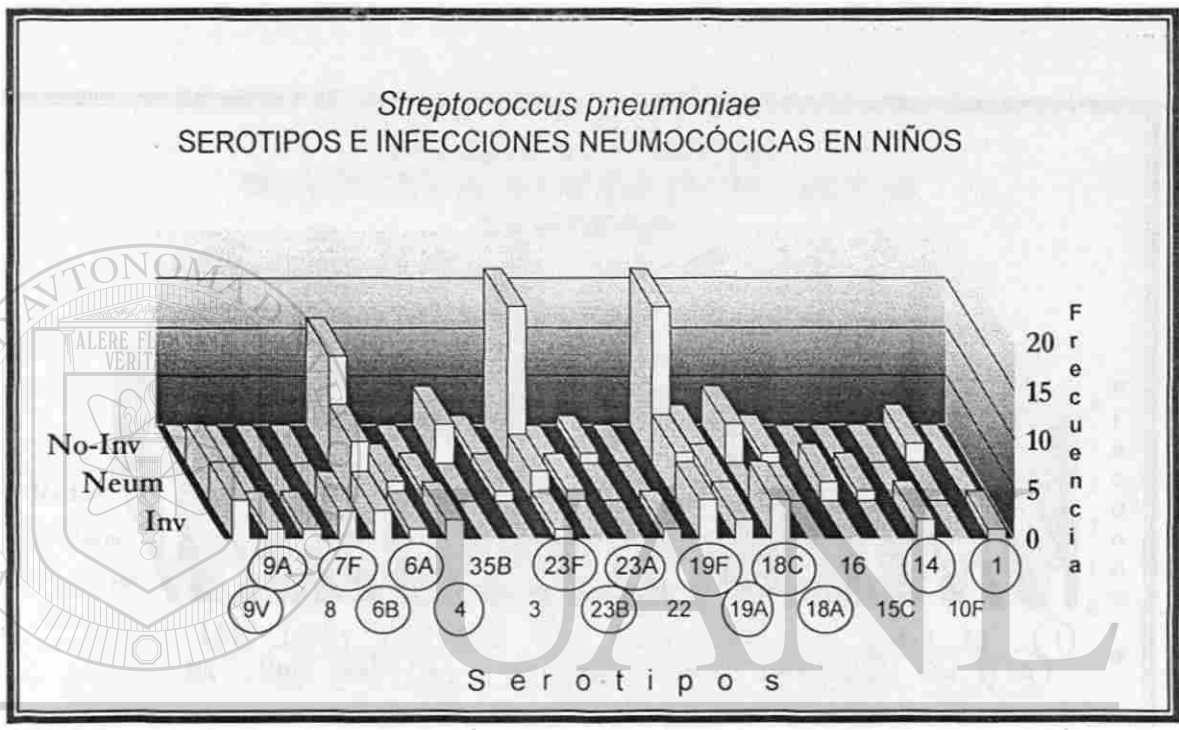
| Serotipos de <i>S. pneumoniae</i> | CMI ($\mu\text{g/mL}$) rango | Susceptible % | Resistente % | M-R % |
|-----------------------------------|--------------------------------|---------------|--------------|-------|
| 19F (n=32) | 0.12 - 8.0 | 19 | 81 | 81 |
| 23F (n=31) | 0.12 -8.0 | 13 | 87 | 74 |
| 6B (n=24) | 0.25 – 8.0 | 0 | 100 | 58 |
| 6A (n=15) | 0.5 – 8.0 | 7 | 93 | 40 |
| 14 (n=12) | 0.5 – 8.0 | 17 | 83 | 83 |
| 9V/A (n=12) | 2.0 – 4.0 | 0 | 100 | 90 |
| 19A (n=10) | 0.25-2.9 | 20 | 80 | 60 |
| 35B (n=10) | 0.12-4.0 | 10 | 90 | 80 |

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.6.3 Serotipos implicados en las infecciones neumocócicas en niños.

Los serotipos implicados en las infecciones neumocócicas que se presentaron en niños, así como su frecuencia se aprecian en la Gráfica No. 3. Los serotipos implicados en las infecciones invasivas que se encontraron con mayor frecuencia fueron; 9V (4), 7F (3), 6B (3), 19F (4), 18C (4) y 14 (2). En las neumonías; 9V (4), 6B (6), 19F (5) , 23F (3) y 16 (2). Mientras que en las infecciones no-invasivas los más frecuentes fueron 6B (11), 35B (4), 23F (16),

19F (16) y 18C (4). En ésta gráfica, se puede observar que los serotipos marcados en círculos son los que están incluidos en la vacuna PNCRM-7 heptavalente conjugada y los relacionados a los de la vacuna. El 71% de los serotipos están incluidos en la vacuna conjugada heptavalente.

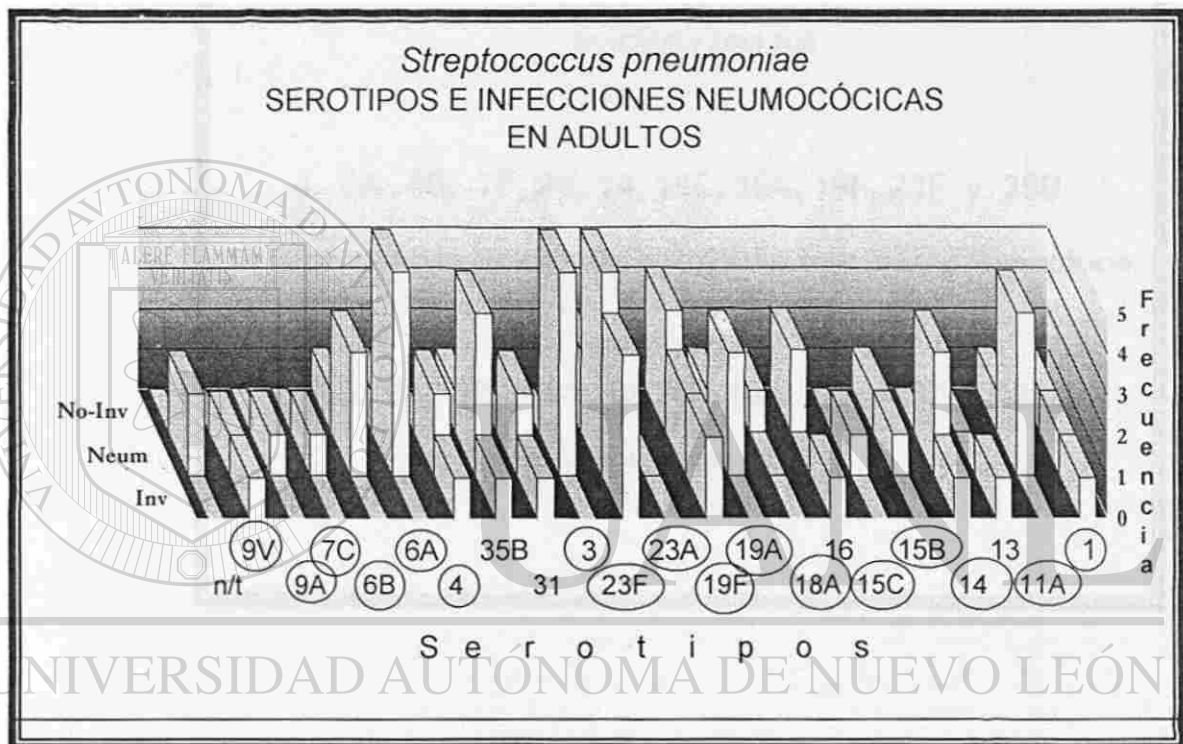


Gráfica No.3 Serotipos de *Streptococcus pneumoniae* implicados en la DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS infecciones neumocócicas en niños

3.6.4 Serotipos implicados en la infecciones neumocócicas de adultos

Los serotipos implicados en las infecciones neumocócicas que se presentaron en adultos, así como su frecuencia se aprecian en la Gráfica No.4. Los serotipos que se encontraron con más frecuencia en la infecciones invasivas fueron; 23F (4), 19F (2), en las neumonías los serotipos fueron; 6A (5), 4 (2), 35B (4), 31 (2), 3 (5), 23F (5), 19A (3), 14 (3) y 11A (4). Mientras que, en las

infecciones no-invasivas los principales serotipos fueron; 19F (3), 16 (2) y 23F (2). En esta gráfica se puede observar que algunos de los serotipos incluidos en la vacuna (11 de 23) así como los serotipos relacionados a los mismos están marcados en círculos. El 64% de los serotipos están incluidos en la vacuna PPV-23 polisacárida valente.



Gráfica No. 4 Serotipos implicados en las infecciones neumocócicas en adultos

3.6.5 Serotipos mas frecuentemente implicados en las infecciones neumocócicas de niños y adultos

En la siguiente Tabla No. 13, se observan los 11 serotipos más frecuentemente implicados en las infecciones neumocócicas tanto en niños como en adultos.

Tabla No 13 Serotipos más frecuentemente implicados en enfermedades neumocócicas en niños y adultos

| SEROTIPOS MÁS FRECUENTES CAUSANTES DE ENFERMEDADES NEUMOCÓCICAS EN NIÑOS Y ADULTOS | |
|--|--|
| 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F y 35B | En Niños, estuvieron implicados en el 89% de las Enfermedades Neumocócicas |
| 1, 3, 6A, 6B, 11A, 14, 16, 19A, 19F, 23F y 35B. | En Adultos en el 74% |

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.6.6. Serotipos implicados en la mortalidad de niños y adultos

El Diagnóstico y los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* implicados en la mortalidad de niños y adultos se observa en la tabla No. 14.

Tabla No. 14 Infecciones Neumocócicas y Serotipos de *Streptococcus pneumoniae* implicados en la mortalidad de niños v adultos

| INFECCIÓN | NIÑOS | ADULTOS |
|---------------|--------------|---------------|
| | Frec / n | |
| FARINGITIS | | |
| SINUSITIS | | |
| OTITIS | | |
| CONJUNTIVITIS | 0 / 69 | 0 / 17 |
| NEUMONÍA | 2 / 31 | 9 / 47 |
| MENINGITIS | 3 / 19 | 0 / 6 |
| BACTEREMIA | 1 / 10 | 2 / 8 |
| Y OTROS | | |
| | 83% ≤ 2 años | 78% ≥ 60 años |
| MORTALIDAD | 6 (5%) | 11 (14%) |

3.7 Análisis Molecular; Electroforesis de campo pulsado (PFGE)

3.7.1 Selección de las cepas

Sólo las cepas resistentes a penicilina (130) se sometieron al análisis molecular (siete cepas no fueron sometidas debido a que no eran agrupables en serotipos). Éstas, se agruparon en 9 serotipos; 19F, 23F, 6B, 6A, 14, 19A,

9V, 35B y 9A. Los criterios de Tenover fueron utilizados para identificar y nombrar las relaciones clonales entre las diferentes cepas de *Streptococcus pneumoniae*.

3.7.2 Criterios de Tenover; criterios de interpretación

Las bandas que se observaron en el gel, correspondieron a los fragmentos de ADN obtenidos por las enzimas de restricción, estas bandas, representaron las diferencias de los fragmentos comparados con la cepa patrón. Para designar la nomenclatura de las clonas, se utilizaron las letras del alfabeto y para designar los subtipos se utilizaron los números ordinales en forma secuenciada. Las cepas que tuvieron el patrón electroforético indistinguible, en relación con la cepa patrón, se consideraron como clona A, las cepas que tuvieron de 1 a 3 diferencias contra el patrón, se consideraron estrechamente relacionadas y se les nombró como subtipo A1, y, las cepas con 4 a 6 diferencias, contra la cepa patrón, se tomaron como posiblemente relacionada y se nombraron subtipo A2, las cepas que fueron totalmente diferentes, se reportaron como clona B, o, clona C, sucesivamente.

3.7.3 Geles de 1er. Análisis

Los resultados de los geles de 1er. análisis fueron los siguientes:
Serotipo 19F; de 32 cepas, se analizaron sólo las resistentes a penicilina; 26 (81%). Nueve cepas (35%) se agruparon en una clona mayoritaria denominada H y subtipos y 17 (65%) cepas presentaron diversos patrones electroforéticos.

Clona identificada; H. El 78% de las cepas fueron aisladas de niños y el 22% de adultos.

Serotipo 23F; de 31 cepas, se analizaron 27 (87%). Los neumococos del serotipo 23F, se agruparon en dos patrones clonales; A y B, de los cuales 17 (63%) cepas conformaron la clona A y subtipos y 10 (37%) cepas, la clona B.

Clonas identificadas; A y B. El 65% de las cepas procedió de niños y el 35% de adultos.

Serotipo 6B; de 24 cepas se analizaron 24 (100%), todas fueron resistentes a penicilina, de las cuales 7 (29%) formaron la clona C, 4 (17%) la clona D y 13 (54%) en diversas clonas. **Clonas identificadas; C y D.** El 83% de las cepas se aisló de niños y el 17% de adultos.

Serotipo 6A; de 15 cepas, se analizaron 14 (93%). De este serotipo se detectó la clona S, la que estuvo constituida por 7 (50%) cepas, a dos cepas se les denominó clona G y V (no mostradas en el gel), el resto estuvo conformado por otros patrones electroforéticos. **Clona identificada; S.** El 60% de las cepas se aisló de niños y el 40% de adultos.

Serotipo 14; de 12 cepas se analizaron 10 (83%). Sólo 4 (40%) se agruparon en clona Q y subtipos, 2 (20%) cepas presentaron el mismo patrón llamándoseles clona R, las 4 (40%) cepas restantes presentaron patrones

diferentes. **Clona identificada; Q.** El 67% de las cepas se obtuvo de niños y el 33% se aisló de adultos.

Serotipo 9V; de 10 cepas se analizaron 10 (100%), todas resultaron resistentes a penicilina. De éstas, 9 (90%) cepas se agruparon como clona N y subtipos. Mientras que 1 (10%) cepa formó un patrón diferente. **Clona identificada; N.** El 80% de las cepas se aisló de niños y 20% de adultos.

Serotipo 19A; de 10 cepas, se analizaron 8 (80%). Tres cepas (37%) se identificaron como clona E. Sin embargo en 5 cepas (63%) no se identificó un patrón común. **Clona identificada; E.** El 60% de las cepas provino de niños y el 40% de adultos.

Serotipo 35B; de 10 cepas, se analizaron 9 (90%). Un patrón electroforético común fue identificado en 6 (67%) cepas denominándosele clona Z, mientras que 3 (33%) cepas no fueron agrupables. **Clona identificada; Z.** El 40% de las cepas se aisló de niños y el 60% de adultos.

Serotipo 9A; Este serotipo, sólo contenía dos cepas, las mismas que fueron resistentes a la penicilina y sólo 1 (50%) representó a la clona N. Una cepa fue aislada de un niño y una de un adulto.

En las figuras No. 5 y 6, se puede observar los patrones electroforéticos más representativos de los diversos serotipos ya mencionados.

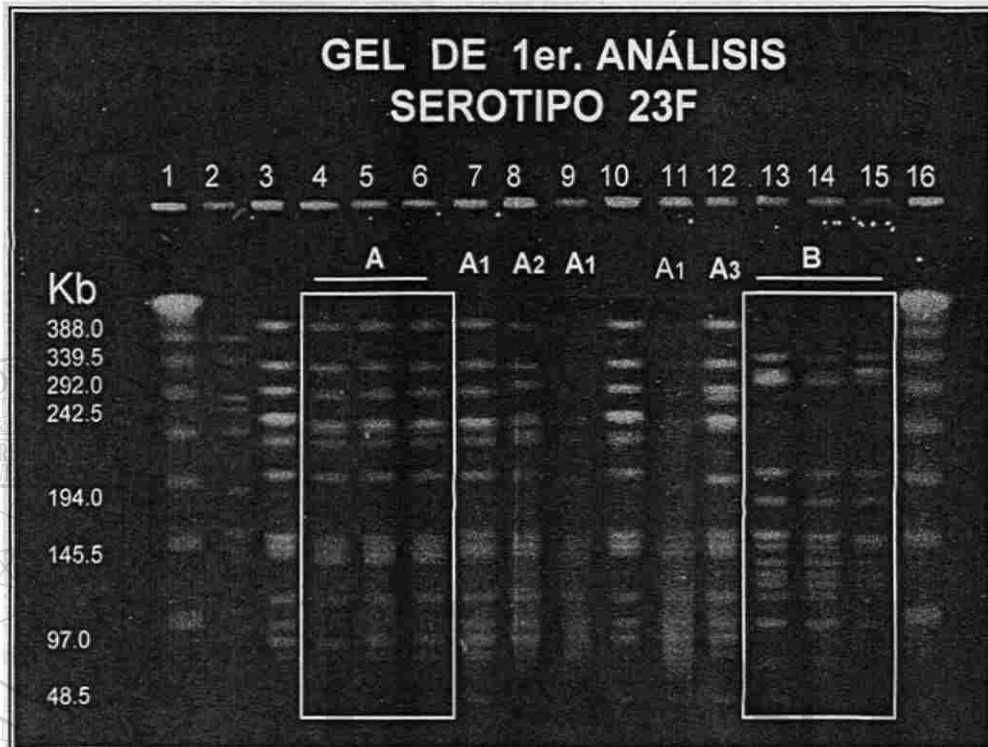


Figura 5. Electroforesis de campo pulsado de *S. pneumoniae* 23F. Carriles 1 y 16 ; MPM DNA lambda, carril 2; cepa control R6 , carril 3 y 10; Control Cleveland-2 Serotipo 23F, carriles 4-9,11 y 12; clona A y subtipos, carriles 13-15 patrón B. **Clonas Mayoritarias A y B**

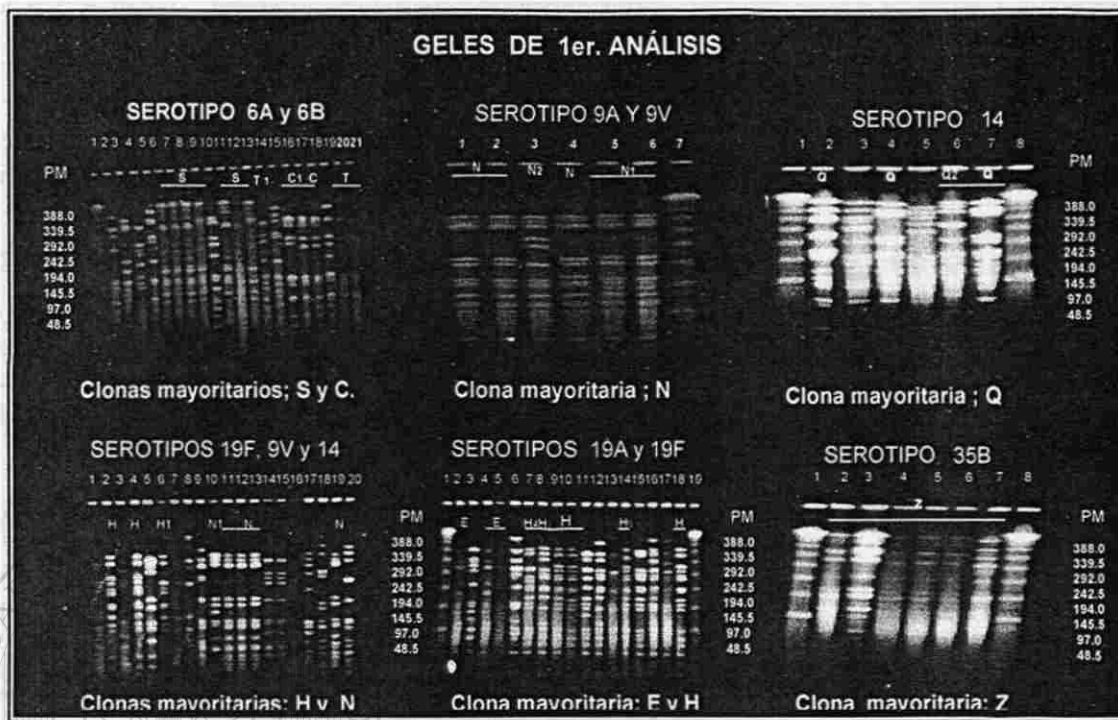


Figura No. 6 Geles de 1er. Análisis de *Streptococcus pneumoniae* serotipos 6A, 6B, 9A, 9V, 14, 19A y 35B

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.7.4 Geles de análisis final

Los resultados obtenidos en los geles de análisis final, permitieron comparar las clonas mayoritarias, encontradas en el área metropolitana de Monterrey, contra los controles de las clonas de resistencia de *Streptococcus pneumoniae*, que se encuentran distribuidas internacionalmente, con el objetivo de saber, si se está detectando alguna clona de reciente aparición y nativa del rea, o pertenecen a alguna de las clonas ya reportadas en la literatura mundial.

3.7.4.1 Gel del Serotipo 23F

En el gel de análisis final del serotipo 23F, se puede observar que el patrón electroforético del subtipo A₄ de la clona A; es el mismo que el de la clona Internacional España 23F-1 (E) y el subtipo A₁, es el mismo que el control de Cleveland 23F-2 (C) y que los subtipos A₂, A₅ y A₆, podrían ser variantes de la misma clona española, mientras que, el patrón electroforético de la clona B, es idéntico al de la clona internacional Tennessee 23F-4 (T).

La clona A y subtipos, presentaron resistencia de alto nivel a la penicilina con CMI's de entre 4-8µg/mL, presentando también resistencia a 7 antimicrobianos más, entre ellos; el 100% de las cepas presentaron resistencia a cloranfenicol (CL) sulfametoxazol/trimetoprim (SXT), tetraciclina (TE), claritromicina (CH) y el 76% de las cepas presentaron resistencia intermedia al imipenem (IPM) y la resistencia a eritromicina (E) y cefotaxima (CTX), se presentó en un 30% y 50% respectivamente. El subtipo A₄ de la clona A, estuvo implicado en la muerte, por neumonía, de un paciente adulto de 86 años de edad. El 50% de las cepas de la clona B, presentaron una resistencia intermedia a la penicilina con CMI's de entre 0.12-1.0µg/mL y el resto, una resistencia de alto nivel; CMI's de entre 2-8µg/mL, el total de las cepas presentaron resistencia a SXT, y sólo el 50% presentó resistencia a CTX con una CMI $\geq 4.0\mu\text{g/mL}$. Figura No. 7.

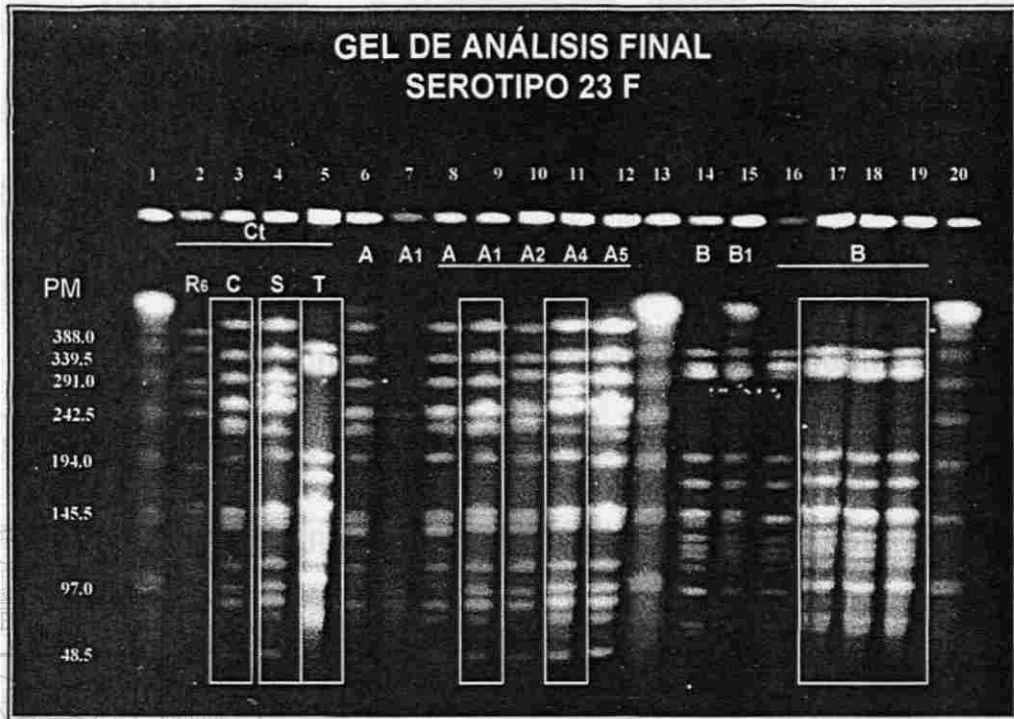


Figura 7. PFGE de cepas de *S. pneumoniae* 23F aisladas en Monterrey Carril 1, 13 y 20 Ladder lambda. Línea 2; Control R6. Línea 3; Control Cleveland 23F-2. Línea 4 ; Control España 23F-1. Línea 5; Control Tennessee 23F-4. Líneas 6-12 y 14-19 *S. pneumoniae* 23F. Clonas Mayoritarias A y B.

3.7.4.2 Gel de los serotipos 6A, 6B y 19F

En el gel de análisis final de los serotipos 6A, 6B y 19F, se observa que los patrones electroforéticos, representando a las clonas S y C de los serotipos 6A y 6B, respectivamente, no se les encontró ninguna relación genética, por

PFGE, con los controles que estaban representando a las clonas internacionales España 6B-2, (E) y Sudáfrica 6B-8, (SA). Por lo que, estas clonas podrían ser nativas del área metropolitana de Monterrey. También se puede apreciar que el patrón electroforético del serotipo 19F; clona H, es idéntico a la clona Internacional Taiwán 19F-14 (T). Figura No. 8.

La clona S, es uniformemente resistente intermedia a penicilina, presentando una CMI entre 0.5-1 μ g/mL, se presentó también resistencia total a E y CH con una CMI de 4-8 μ g/mL para ambas. La clonas denominadas G y V (no mostradas en el gel por ser únicas) también con resistencia intermedia a la penicilina, fueron resistentes a CL, SXT, TE y CH y estuvieron implicadas en la muerte por neumonía de dos pacientes adultos, mayores de 60 años.

La clona H, presentó CMI's desde 0.5 hasta 8 μ g/mL a la penicilina.

Además fue altamente resistente a E, a SXT, TE y CH. El 66% de las cepas mostraron una resistencia intermedia a IPM y el 55% tuvieron una resistencia intermedia a la CTX.

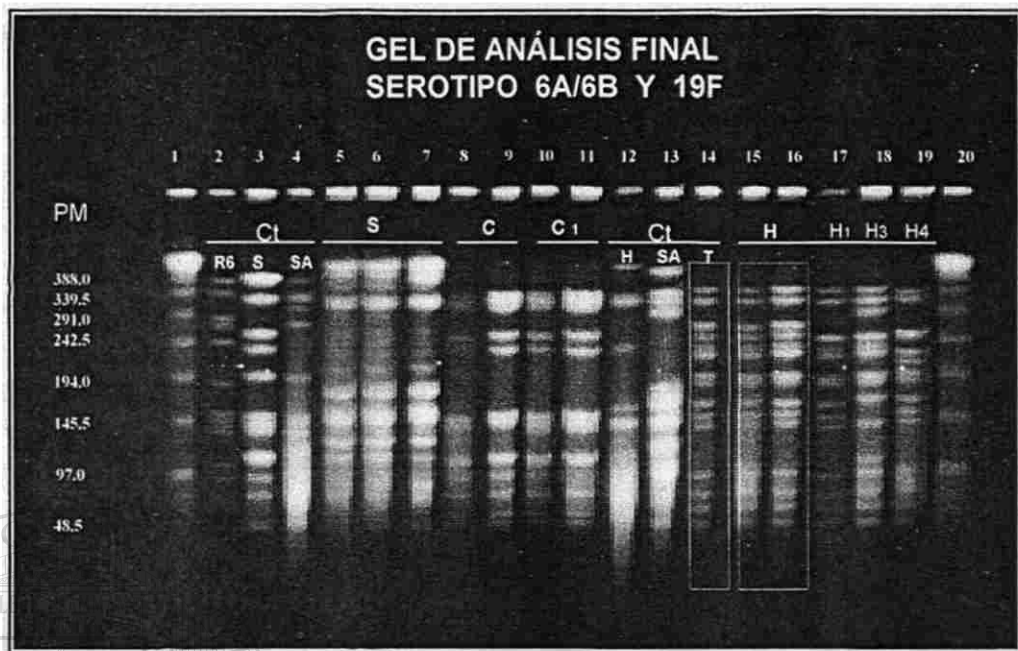


Figura 8. PFGE de cepas de *S. pneumoniae* serotipo 6B y 19F aisladas de Monterrey Carril 1 y 20 Ladder lambda. Carril 2; Control R6. Carril 3; Control España 6B-2 Carril 4 ; Control S. Africa 6B-8. Carriles 5-11; *S. pneumoniae* 6A/B clonas Sy C Carril 12; Control Hungría 19A-6. Carril 13; Control S. Africa 19A-13. Carril 14; Control Taiwan 19F-14. Carriles 15-19; *S. pneumoniae* 19F. Clonas Mayoritarias; C, S, y H

3.7.4.3 Gel de los serotipo 14 y 9V

En el gel de análisis final de los serotipos 14 y 9V, se observa que, las clonas Q y N, comparten el mismo patrón electroforético, a pesar de tener distintos serotipos, lo cual explica el fenómeno de transformación capsular de un serotipo en otro. Las clonas Q y N, poseen un patrón estrechamente relacionado con la clona control de distribución internacional; España 9V-3 ya reportada en la PMEN. Figura No. 9.

La clona Q, presentó una resistencia de alto nivel a la penicilina, con una CMI de 2-8µg/mL, resultando también, total y uniformemente resistente a E,

SXT, CH, IPM y TE. En el 75% de las cepas, se observó una variación entre intermedios y resistentes a la CTX con una CMI de 2-4 μ g/mL. Sin embargo, la clona N del serotipo 9V, exhibió una resistencia de alto nivel a la penicilina con una CMI de 2-4 μ g/mL. Se observó una resistencia uniforme al SXT. El 67% de las cepas, presentaron resistencia intermedia a la CTX con un CMI de 2 μ g/mL y el resto fueron netamente resistentes con una CMI de 4 μ g/mL. El 67% presentó resistencia intermedia al IPM. El subtipo N₂ estuvo implicado en la muerte por neumonía, de un adulto de 56 años de edad.

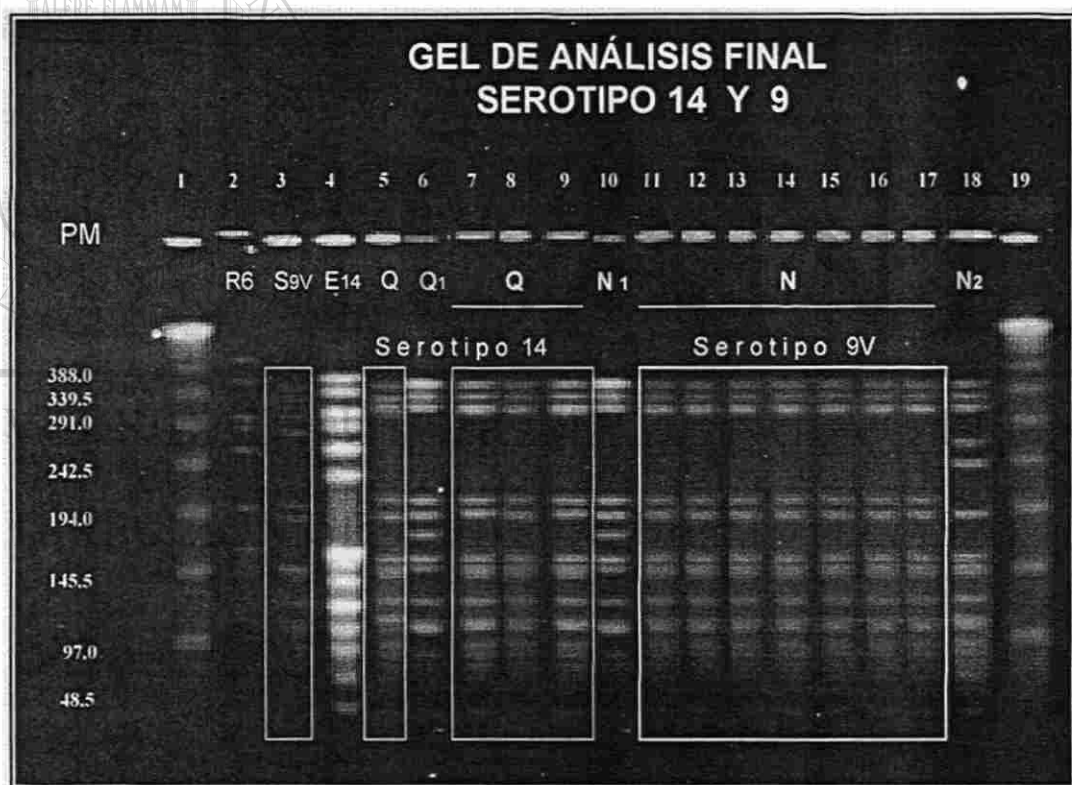


Figura 9. PFGE de cepas de *S. pneumoniae* serotipo 14 y 9 aisladas de Monterrey Carril 1 y 19 Ladder lambda. Carril 2; Control R6. Carril 3; Control España 9V-3 Carril 4 ; Control Inglaterra 14-9. Carril 5-9; *S. pneumoniae* 14 Carril 10- 18 ; *S. pneumoniae* 9V. Clonas Q y N.

3.7.4.4 Gel del serotipo 35B

En el gel de análisis final del serotipo 35B, todos los patrones electroforéticos de las cepas formaron una clona a la que se le denominó Z, sin embargo, ésta no pudo ser comparada con ninguna clona control internacional, ya que hasta el momento en la Red de Epidemiología Molecular Neumocócica no se ha reportado alguna, por lo que, podría ser nativa del área metropolitana de Monterrey, N. L. La clona Z, presentó resistencia de alto nivel a la penicilina; CMI de 2-4 μ g/mL y una resistencia intermedia a SXT, e IPM, con CMI's de (1/19-2/38 μ g/mL) y (0.25- 0.5 μ g/mL) respectivamente. El 50% de las cepas, presentó resistencia intermedia a la CTX; CMI de 2 μ g/mL. Una cepa, estuvo implicada en la muerte de un adulto de 66 años de edad, con diagnóstico de absceso hepático. Figura No.10.

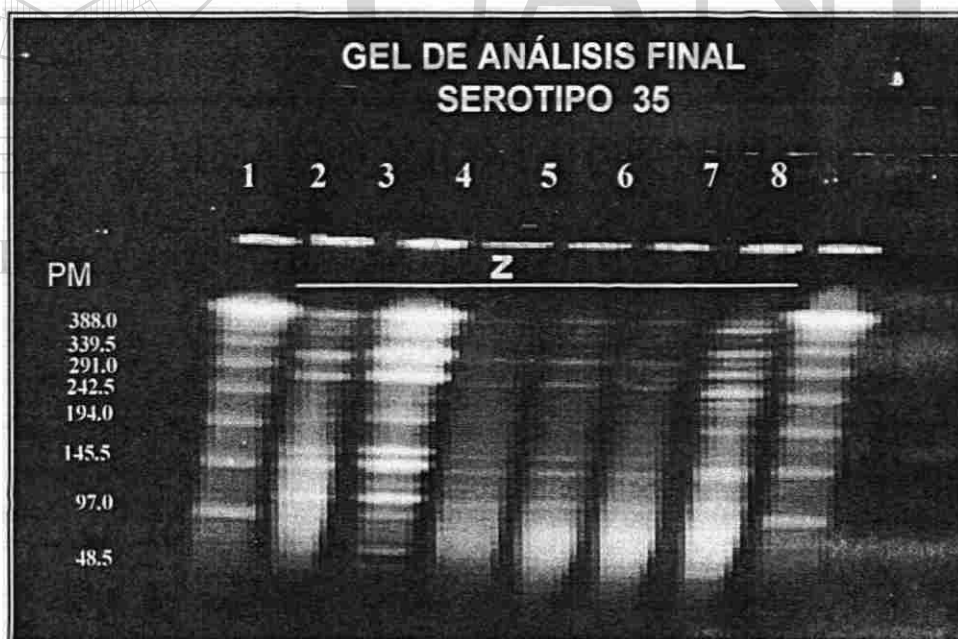


Figura 10. Electroforesis de campo pulsado de cepas de *S.pneumoniae* 35B. Carriles 1 y 8: Ladder lambda. Carriles 2 - 7; Cepas de *S.pneumoniae* 35B. Clona mayoritaria: Z

CAPITULO 4

DISCUSIÓN

Streptococcus pneumoniae continúa siendo una causa común de neumonía, meningitis, bacteremia, otitis media aguda y sinusitis, particularmente en niños, ancianos e individuos con enfermedades subyacentes. Sin embargo, en países en vías de desarrollo la problemática de las infecciones neumocócicas es aún mayor (75). Los primeros reportes acerca de la vigilancia epidemiológica en América Latina (incluyendo la ciudad de México) fueron hechos a través del grupo SIREVA-Vigía (60) y recientemente por el programa de Vigilancia Antimicrobiana SENTRY (61). En la ciudad de México Echániz y cols. , así como Gómez y cols. han hecho contribuciones al conocimiento de la epidemiología de *Streptococcus pneumoniae* (62, 76). Sin embargo, este trabajo es el primer reporte de vigilancia epidemiológica en el Norte del País. Las infecciones neumocócicas en el área metropolitana de Monterrey se presentaron con mayor frecuencia (79%) en los niños menores de 5 años de los cuales un 45% eran menores de dos años. Esta población es la más vulnerable por lo tanto el grupo que más debe ser protegido. Este hallazgo es compatible

con otros reportes de la literatura, tanto de países desarrollados como los que están en vías de desarrollo. (62, 77, 78). *Streptococcus pneumoniae*, permanece en nuestros días como un patógeno importante y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, principalmente debido a que el curso clínico de las infecciones neumocócicas es afectado por un número de factores incluyendo el sitio anatómico de la infección, la edad del paciente, las enfermedades subyacentes, el tipo de terapia antimicrobiana indicada, y el periodo de estancia hospitalaria (78). De aquí que no es sorprendente que la mortalidad reportada en este estudio, en niños principalmente menores de dos años y en adultos mayores de 60 años, los cuales poseían serios factores subyacentes tales como desnutrición, anemia, dos o tres diagnósticos clínicos y una larga estancia hospitalaria, haya sido 5% y 14% respectivamente.

Durante los últimos 38 años, la prevalencia de *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina, se ha visto incrementada a nivel mundial (55). En América Latina la resistencia a penicilina ha fluctuado entre 23% y 47% (60, 61, 62). En México, este fenómeno no ha pasado desapercibido, desde la primera descripción de neumococos resistentes a penicilina (10.7%) la preocupación ha ido en aumento y ahora con un 76% en los *Streptococcus pneumoniae* aislados de niños y con un 50% en los aislados de adultos, esta preocupación se transformará en un corto plazo en un serio problema, ya que, estos resultados muestran un incremento importante en la prevalencia de *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina. Esta problemática es similar a la situación que vive Corea ya que, en este país se ha reportado una resistencia de 79.7%, la cual, hasta el momento, es la mayor incidencia que se

ha reportado en el mundo (50). En diversas áreas geográficas también se ha reportado resistencia elevada a macrólidos, cefalosporinas de tercera generación y sulfametoxazol trimetoprim. (79, 80, 81). La resistencia a macrólidos (35%) y a cefalosporinas de tercera generación (7%) en general, también se ha incrementado en nuestro país, ya que las últimas publicaciones reportadas fueron 18% y 2.6%, respectivamente (76). Los nuevos antimicrobianos; Levofloxacina, Linezolid y Quinupristín/Dalfopristín presentaron una excelente actividad contra las cepas de *Streptococcus pneumoniae*, lo que posiblemente permitirá al médico en un futuro cercano un manejo exitoso de las infecciones neumocócicas. Todos los *Streptococcus pneumoniae* aislados durante el período de este estudio fueron susceptibles a vancomicina.

Los resultados de este estudio indican la necesidad de mantener una vigilancia activa de los patrones de susceptibilidad que permita orientar las conductas terapéuticas, el uso prudente de antibióticos y el control de la diseminación de

Streptococcus pneumoniae resistente a penicilina.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La distribución de los serotipos neumocócicos puede variar de acuerdo al área geográfica, al tiempo de estudio y a la edad del paciente, tal como ha sido mostrado por múltiples reportes (44, 51, 82, 83). La distribución de los serotipos en América Latina es diferente comparada con la de Estados Unidos y países europeos, sobretudo en los neumococos aislados de niños. De hecho, Di Fabio y cols. mostraron en un estudio de 4071 cepas de *Streptococcus pneumoniae* aislados de procesos invasivos y obtenidos principalmente de niños de América Latina, que los 13 serotipos más frecuentes fueron; 14, 6A/B, 5, 1, 23F, 19F,

18C, 19A, 9V, 7F, 3, 9N y 4 y éstos representaron al 86.1% de las cepas (60). Mientras que los serotipos reportados en este trabajo, citados en orden de frecuencia fueron; 19F, 23F, 6B, 6A, 14, 19A, 9V, 35B, 18C, 3, 4, 16, 11A y 1, los cuales representaron el 87% de los aislados en general. En relación a lo anterior, se puede decir que el serotipo 5 es frecuente en los países de América del Sur, sin embargo, no se encontró en las cepas regiomontanas quizás, debido a la relación geográfica estrecha entre Monterrey y Estados Unidos donde, actualmente no se ha aislado a este serotipo (51). No obstante, y quizás debido también al motivo mencionado y sobre todo al flujo constante entre estas dos poblaciones, se identificó en este estudio, el serotipo 35B (10 cepas) el cual, ha sido reportado en 10 estados de la Unión Americana, incluyendo el vecino estado de Texas, como causante de infecciones invasivas sobretodo en adultos. (82). Aunque, un estudio reciente reportó el serotipo 35B en el sur de Israel (83).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

La rápida emergencia de cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistente a múltiples drogas a nivel mundial desde finales de los 70's ha enfatizado la importancia de la prevención de las enfermedades neumocócicas (84). Para este efecto, en febrero del 2000, la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos licenció la vacuna conjugada heptavalente PNCRM-7 (Prenar Wyeth-Ayerst, Laboratories) cuyos serotipos son 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Esta vacuna ofrece una protección de entre 70-88% para los serotipos prevalentes causantes de infecciones neumocócicas en niños que viven en los Estados Unidos, Canadá, Europa y Oceanía (85). Sin embargo,

estos serotipos son menos prevalentes en los países en vías de desarrollo ya que se ha demostrado que sólo son causantes de menos de la mitad de los casos en algunos lugares (44, 86). Esto fue demostrado por Di Fabio y cols. cuando reportaron una baja cobertura (58%) con la vacuna conjugada heptavalente PNCRM-7 en niños Latinoamericanos (60). Así que no es de sorprender que la cobertura de esta vacuna en los niños menores de 5 años de edad ($n=102$) con enfermedades invasivas y no-invasivas viviendo en el área metropolitana de Monterrey podría ser (si estuvieran vacunados) del 68.2%, lo cual podría incrementarse a 85% si se agregara la protección de los serotipos relacionados. Aún si sólo tomáramos en cuenta a los niños de la misma edad con infecciones invasivas ($n=29$), la cobertura podría ser de 65.5%, lo que aumentaría a 79% con la protección de los serotipos relacionados. El problema para adquirir esta vacuna en México, al igual que en otros países en desarrollo, podría ser el alto precio de la misma, por lo que sólo una pequeña parte de la población tiene acceso a ella.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Por otro lado, un 13% de los serotipos identificados en esta investigación no están relacionados con la vacuna, los que, citados en orden de frecuencia fueron; 35B, 7F, 1, 3, 16, 8, 15C y 22. Con excepción del serotipo 35 B, todos fueron aislados de infecciones invasivas y neumonía. De hecho, uno de ellos, el serotipo 7F estuvo implicado en la muerte de un niño con diagnóstico de meningitis. Por lo que resultará importante tenerlos bajo observación.

Con respecto a la posible cobertura de la vacuna neumocócica 23 polisacárida valente (PPV-23) en los adultos de 20 a 86 años de este estudio ($n=78$), sería

de 64%, lo cual podría incrementarse a 78% con la protección de los serotipos relacionados. Sin embargo, aún si tomáramos en cuenta solo a los individuos mayores de 60 años ($n=27$) la posible cobertura podría ser baja; 59%, lo que se podría incrementar a 74% con los serotipos relacionados. Nuestros resultados están en contraste con los reportes de países europeos, en los cuales la cobertura de la vacuna 23 polisacárida valente es del 80.7% en los individuos mayores de 60 años (87). Los serotipos regiomontanos sin posible cobertura por esta vacuna fueron; 35B, 31, 16 y 13, los que comprenden el 17%. Este resultado es preocupante, ya que todos los serotipos fueron aislados de infecciones invasivas y neumonía. Cabe mencionar que los serotipos 35B y 13, estuvieron implicados en la muerte de dos pacientes.

A juzgar por los resultados obtenidos en los serotipos causantes de infecciones neumocócicas en Monterrey, Nuevo León, se puede decir que debido a la variación geográfica en la distribución de los serotipos y las poblaciones diferentes de cada país, las vacunas neumocócicas actualmente recomendadas podrían no ser universalmente óptimas, como es el caso para los países en vías de desarrollo. Ya que una vacuna con un número limitado de serotipos podría ser sumamente efectiva durante un tiempo, sin embargo, paulatinamente los individuos vacunados podrían ser infectados por cepas que hubieran adquirido, por intercambio de material genético, otro (s) serotipo (s) no incluido (s) en la vacuna, manteniendo así su potencial de virulencia intacto. Por lo tanto, se hace necesario el conocimiento de los serotipos neumocócicos

prevalentes de cada región, o país y en base a ese conocimiento elaborar una vacuna adecuada a sus necesidades.

En 1991, Muñoz y cols. en España, fueron los primeros en documentar una clona multirresistente del serotipo 23F resistente a penicilina (CMI 1-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a cloranfenicol, tetraciclina y cotrimoxazole, ellos reportaron que esta clona se había diseminado intercontinentalmente desde su país de origen hasta Ohio, en los Estados Unidos (88). A partir de entonces, los datos de diseminación de la clona española hacia otras partes del mundo han sido abundantes (89, 90, 91). Existe evidencia de que un número importante de cepas de neumococos multirresistentes de Estados Unidos han evolucionado a partir del serotipo España 23 F-1 (92). Existen dos variantes de esta clona española; la primera variante reportada fue la serotipo 6B multirresistente con un patrón similar de resistencia a su antecesora pero que, sin embargo, su diseminación ha sido más lenta. En 1993, se documentó la introducción de esta clona desde España hasta Islandia (93). Posteriormente se reportó la presencia de la clona serotipo 6B, en Alaska y Estados Unidos específicamente en Houston, Texas (94). La segunda variante, o tercera clona española, es la clona serotipo 9V, la cual originalmente fue resistente a penicilina y cotrimoxazole y al igual que sus antecesoras ha tenido una diseminación global, esta variante probablemente emergió por la diseminación horizontal de los genes PBP alterados procedentes de la clona serotipo 23F-1 (95). Similarmente, la clona serotipo 19F, la cual también es una variante de la clona 23F ha sido reportada en países europeos

(96). Los reportes acerca de la introducción de la clona de *Streptococcus pneumoniae* 23F a Colombia, Brasil, Chile y México y de la clona española-francesa serotipo 14 en Uruguay y Argentina fueron hechos por la red SIREVA-Vigía la cual es auspiciada por la Pan American Health Organization (PAHO).

Los serotipos 23F, 14, 9V y 19F cuyas respectivas clonas fueron; A, B, N y H, identificados en este estudio, ponen de manifiesto las relaciones intergenéticas entre las clonas regiomontanas y las clonas de circulación internacional, España 23F-1, Cleveland 23F-2, Tennessee 23F-4, España 9V-3 y la clona Taiwán 19F-14. Para los serotipos 35B, 6B y 6A y con formación de clonas denominadas Z, C y S, respectivamente, no se ha encontrado relación genética por medio de electroforesis de campo pulsado, con alguna de las clonas ya reportadas por la Red de Epidemiología Molecular Neumocócica (PMEN), por lo que podrían ser clonas nativas de la ciudad de Monterrey, N. L. Sin embargo, esto hay que tomarlo con cautela, ya que, una investigación de la literatura

indica que la caracterización inicial de nuevas clonas en una población de neumococos resistentes debe de ser llevada a cabo usando varios métodos de tipificación molecular como Electroforesis de campo pulsado (PFGE), BOX-PCR y Tipificación de la Secuencia Multilocus (MLST). La PMEN ha establecido los siguientes criterios para la nomenclatura de las clonas de reciente formación:

1. La incipiente clona debe de tener amplia distribución geográfica a través del país (no sólo dentro de un cierto hospital) de la zona identificada, o haberse diseminado internacionalmente.
2. La clona debe estar bien establecida dentro del país por un número de años.

3. La clona debe de ser resistente a uno, o más antimicrobianos que estén en uso clínico frecuente.
4. La fecha de identificación de la clona necesita ser impresa o publicada antes de la ratificación por la PMEN.
5. La consideración de la inclusión de la nueva clona debe ser propuesta en la reunión anual de la PMEN.
6. La clona debe de estar disponible para ser tipificada y confirmada por la PMEN antes de ser aceptada en la misma.
7. La clona debe de estar disponible para ser depositada en la colección de clonas de la American Type Culture Collection (ATCC) (72).

Las clonas regiomontanas denominadas "S y C" del serotipos 6A y serotipo 6B respectivamente, no cumplen con los criterios No.1 y 2 ya que, al no tener un control con quien compararlas no se puede decir que tengan una diseminación internacional, y aunque la clona S esta establecida desde hace 3 años y la clona C, lo está desde hace 6 años en Monterrey, habría que esperar a comprobar la presencia de estas clonas, por lo menos, en algunos otros Estados de la Republica Mexicana, o quizás en algún otro país. El criterio No. 3, se cumple, ya que ambas son resistentes a penicilina y al resto de los antimicrobianos ya mencionados. Los criterios faltantes se cumplirían al consolidarse los dos primeros.

Con respecto a la clona regiomontana denominada "Z" del serotipo 35B, hasta el momento no se ha comprobado su diseminación en otros Estados Mexicanos, esta clona se estableció en Monterrey desde Marzo de 1999 a

Enero del 2003, por otro lado, la resistencia a penicilina es de alto nivel (CMI de 2.0 – 4.0 µg/mL) además de tener una resistencia intermedia a sulfametoxazol/trimetoprim e Imipenem, y el 50% de las cepas tienen una resistencia intermedia a cefotaxima, estas características le permiten a la clona Z del serotipo 35B cumplir los criterios 2 y 3, pero no el No.1. El criterio No. 4 se cumplirá en un futuro cercano al publicarse internacionalmente el artículo de este trabajo. Los criterios 5, 6 y 7, se cumplirán al consolidarse el No. 4. Sería interesante seguir documentando la presencia de este serotipo en Monterrey y poder someter estas cepas a la técnica de tipificación de secuencia multilocus (MLST). De aquí que, la vigilancia de las clonas en Monterrey requerirá el uso de diferentes métodos moleculares, a través de los cuales, se podría empezar a monitorizar los efectos de la vacunación sobre la variación genética de los neumococos así como, la identificación de los reservorios de la resistencia a antimicrobianos.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

1. Las infecciones neumocócicas en la ciudad de Monterrey se presentaron con mayor frecuencia en los niños menores de 5 años, mientras que el mayor porcentaje de mortalidad se presentó en los adultos mayores de 60 años.

2. En general, las cepas de *Streptococcus pneumoniae* identificadas en este estudio poseen una elevada resistencia (66%) a la Penicilina y una resistencia a múltiples antimicrobianos del 54%. Sin embargo, la susceptibilidad de las cepas para cefotaxima e imipenem, beta-lactámicos considerados también en el tratamiento de las infecciones neumocócicas, está arriba del 60%.

3. Para los antibióticos no-beta-lactámicos, tales como Sulfametoxazol-Trimetoprim, las cepas mostraron una resistencia del 68%, mientras que para tetraciclina, eritromicina, claritromicina y cloranfenicol la susceptibilidad fluctuó entre el 63% y el 80%.

4. La excelente actividad (100%) que mostró la Vancomicina en contra de los *Streptococcus pneumoniae* de este estudio, le permitirá al médico, seguir utilizándola como herramienta en contra de las enfermedades neumocócicas.

5. La elevada susceptibilidad (99.5%) que presentaron las cepas de *Streptococcus pneumoniae* a la Levofloxacin, Linezolid y Quinupristín-Dalfopristín, permitirá en un futuro cercano, que se coloquen como una importante alternativa terapéutica en contra de estas infecciones.

6. En general, los serotipos de *Streptococcus pneumoniae*; 6A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F, 23F y 35B, identificados en este estudio y causantes del 73.4% de las enfermedades neumocócicas en el área metropolitana de Monterrey, podrían entorpecer el tratamiento clínico de estas infecciones, por su alto porcentaje de resistencia a penicilina y la tendencia a formar clones de resistencia.

7. Los siete serotipos de *Streptococcus pneumoniae* incluidos en la vacuna heptavalente conjugada (PNCRM-7) se encuentran circulando en el área metropolitana de Monterrey, sin embargo, su prevalencia es baja, por lo tanto y en general, la cobertura teórica de la vacuna recomendada en niños podría ser del 71%, lo que aumentaría a 86% si se incluyeran los serotipos relacionados.

8. Once de los 23 serotipos de la vacuna polisacárida valente (PPV-23) utilizada en niños mayores de 5 años y adultos, se encuentran circulando en la ciudad, lo cual teóricamente podría indicar la cobertura de ésta, en un 64%, lo que se elevaría a 79.5% si se incluyeran los serotipos relacionados a la misma.

9. Los serotipos 23F, 14, 9V y 19F y cuyas respectivas clonas fueron; A, B, N y H, encontradas en este estudio, ponen de manifiesto las relaciones intergenéticas entre las clonas regiомontanas y las clonas de circulación internacional España 23F-1, Cleveland 23F-2, Tennessee 23F-4, España 9V-3 y la clona Taiwán 19F-14, así como su inminente diseminación hacia nuestra ciudad.

10. Para los serotipos 35B, 6B y 6A y con formación de clonas denominadas Z, C y S, respectivamente, no se ha encontrado relación genética, por medio de electroforesis de campos pulsados, con alguna de las clonas ya reportadas por la Red de Epidemiología Molecular Neumocócica, por lo que podrían ser clonas nativas de la ciudad de Monterrey, N. L.

CAPITULO 6

PERSPECTIVAS

Los estudios de la determinación de los patrones de resistencia a antimicrobianos, la distribución de los serotipos y las técnicas de biología molecular utilizadas para poner en evidencia las interrelaciones genéticas intercontinentales de las cepas de *Streptococcus pneumoniae* han sido abundantemente estudiadas en los países en desarrollo, y tan es así que, han podido tomar medidas en relación con la diseminación del *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina, bajando los niveles de resistencia debido al correcto manejo de los antimicrobianos, han podido elaborar vacunas ajustadas a la prevalencia de sus serotipos infectantes y han tenido conocimiento de la presencia de las clonas de resistencia de este microorganismo en diferentes parte del mundo. Sin embargo, en los países en vías de desarrollo específicamente en México, no existen suficientes datos que indiquen un control en la epidemiología del *Streptococcus pneumoniae* por lo que nuestras perspectivas a futuro son consolidar nuestro sistema de vigilancia en el área metropolitana de Monterrey y hacerlo extensivo a los Estados del Norte de nuestra República Mexicana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Williams, B., Gouws, E., Boschi-Pinto, C., Bryce, J., and Dye, C. 2002. Estimates of World wide distribution of child deaths from Acute Respiratory Infections. *Lancet Infectious Diseases* 2: 25-32.
2. Sniadack, D. H., Schwartz, B., Lipman, H., Bogaerts, J., Butler, J.C., Dagan T. Smith, A. 1995. Potential interventions for the prevention of childhood pneumonia: Geographic and temporal differences in serotype and serogrup distribution of sterile site pneumococcal isolates from children-implications for vaccine strategies. *Pediatric. Infect. Dis. J.* 14 (6): 503-510.
3. Shann, F. 1986. Etiology of severe pneumonia in children in developing countries. *Pediatr. Infect. Dis.* 5 (2): 247-252.
4. Indicadores básicos de salud. 2000. Organización Panamericana de la Salud. www.paho.org. Accesado el 24/03/2005.
5. Secretaría de Salud; INEGI; Dirección general de Información en Salud. 2003.
6. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica No. 10. semana 10; 2005. dgepi.salud.gob.mx/sinave. Accesado en marzo 2005.

7. Doern, G. V. 2001. Antimicrobial use and the emergence of antimicrobial resistance with *Streptococcus pneumoniae* in the United States. Clin. Infect. Dis. **33** (Suppl.3): S 187-192.

8. Sternberg, G.M. 1881. A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by subcutaneous injection of human saliva. An experimental research. Nat. Board Health Bull. **2**:781-783.

9. Griffith, F. 1928. The significance of pneumococcal types. J. Hyg. **27**:113-59

10. Avery OT, MacLeod CM, McCarty, M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. J. Exp. Med. **79**:137-158.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

11. Henry, D. I. Clinical Microbiology Procedures Handbook of American Society for Microbiology (ASM). 1992; (1): 1.20.19-1.20.25.

12. Jones, C. 1988. Capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. Carbohydr. Eur. **21**:10-16.

13. Tuomanen, E. I., Austrian, R., Masure, H.R. 1995. Pathogenesis of pneumococcal infection. New Engl. J. Med. **332**(19): 1280-1284.

14. Henrichsen, J. 1995. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2759-2762.
15. Musher, D. M., Breiman, R. F., and Tomasz, A. 2000. *Streptococcus pneumoniae*. At the Threshold of the 21st Century. *Streptococcus pneumoniae*; Molecular Biology and Mechanisms of Diseases: 2 ed. Mary Ann Liebert. Inc. 485-491.
16. Talkington, D.F., Crimmins D.L., Voellinger, D.C., Yother, J., and Briles, D. E. 1991. A 43-kilodalton pneumococcal surface protein, PspA: Isolation practice abilities and structural analysis of the amino terminal sequence. *Infect. Immun.* **59**: 1285-1289.
17. Fedson, D. S. Pneumococcal vaccines. En: Plotkin SA, Mortimer EAJ, ed. *Vaccine*. 1988. Philadelphia: W. B. Saunders. 271-299.
18. Ghaffar, F., Friendland, I. R., McCrake, G. H., 1999. Dynamics of nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatr. Infect Dis. J.* **18**: 638-646.
19. Regev-Yochay, G., Meir, R., Dagan, R., Porat, N. Shainberg, B., Pinco, E., Keller, N., and Rubinstein, E. 2004. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by adults and children in community and family Settings. *Clinic. Infect. Dis.* **38**:632-639.

20. Gray, B. M., Dillon, H.C. 1988. Epidemiological studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: antibody to types 3, 6, 14 and 23 in the first two years of life. J. Infect. Dis. 158:948-955.

21. Musher, D. M. 1995. *Streptococcus pneumoniae*. In: Principles and Practices of Infectious Diseases, 4th edition. Mandel GL. 1811-1826.

22. Gray, B.M., Converse, G. M. III., Dillon, H. C. Jr. 1980. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage and infection during the first 24 months of life. J. Infect. Dis. 142 (6): 923-933.

23. Austrian, R. 1986. Some aspects of the pneumococcal carrier state. J. Antimicrob. Chemother. 18 (Suppl A): 35-45.

24. Tuomanen, E. I., and Masure, R. 1997. Molecular and cellular biology of pneumococcal Infection. Microb. Drug. Resist. 3(4): 297-308.

25. Geelen, S. C., Battacharyya, C., and Tuomanen, E. 1993. Cell wall mediates pneumococcal attachment and cytopathology to human endothelial cells. Microb. Drug. Resist. 61:1538-1543.

26. Louisiana State University Medical Center. "*Streptococcus pneumoniae*". Bug Bytes 30 November 1995. 2 (15). Online. Available: [http://www.ccm.1sume.ecu/bugbytes/Volume 2/bb-v2n15.html](http://www.ccm.1sume.ecu/bugbytes/Volume%20bb-v2n15.html).
27. World Health Organization. Pneumococcal vaccine. 1999. Weekly epidemiological record. 74 :177-83.
28. Hortal, M., Ruvinsky, R., Rossi, Agudelo, C., Castañeda, E., Brandileone, C., Camout, Palacio, R., Echaniz, Di Fabio, J. 2000. Impacto de *Streptococcus pneumoniae* en las neumonías del niño latinoamericano. Grupo SIREVA-VIGIA. Rev. Panam. Salud Pública /Pan Am/Public/Health. 8 (3):185-195.
29. Usen, S., Degbola, R., Molholland, K. 1998. Epidemiology of invasive pneumococcal disease in the western region. The Gambia Pediatric. Infect. Dis. J. 17: 23-28.
30. Hardie, W., Bukolic, R., García, V. F. 1996. Pneumococcal pleural empyemas in children. Clin. Infect. Dis. 22: 1057-63.
31. Hsieh, Yu-Chia, Hsueh, Po-Ren, Yi-Lu, Chun, Lee, Ping-Ing, Lee, Chin-Yun, and Huang, Li-Min. 2004. Clinical manifestation and molecular epidemiology of necrotizing pneumonia and empyema caused by

Streptococcus pneumoniae in Children in Taiwan. *Clinic. Infect. Dis.* **38**: 830-835.

32. Orihuela, C. J., Gao, G., Francis, K. P., Jun Yu, and Tuomanen, E. I. 2004. Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *J. Infect. Dis.* **190**: 1661-1669.

33. Garpenholt, O., Hugosson, S., Fredlun, H., Giesecke, J. 2000. Invasive disease due to *Haemophilus influenzae* type b during the first six years of general vaccination of Swedish children. *Acta. Paediatr.* **89**(4) : 471-474.

34. Schuchat, A., Robinson, K., Wenger, J. D., Harrison, L. H., Farley, M., Reingold, A., Lefkowitz, and Perkins, B. A. 1997. Bacterial meningitis in the United States in 1995. *New Engl. J. Med.* **337**: 970-976.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

35. Grimwood, K., Anderson, P., Anderson, V., Tan, L., Nolan, T. 2000. Twelve years outcomes following bacterial meningitis: further evidence for persisting effects. *Arch. Dis. Child.* **83** :111-116.

36. Ostergaard, C., Brandt, C., Bossen, H., Konradsen, and Samuelsson, S. 2004. Differences in survival, brain damage and cerebrospinal fluid cytokine kinetic due to meningitis caused by 3 different *Streptococcus pneumoniae* serotypes: Evaluation in humans and 2 experimental models. *J. Infect. Dis.* **190**:1212-1220.

37. Musher, D., Dagan, R. 2000. Is the pneumococcus the one and only in acute otitis media?. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **19(5)**: 399-400.
38. Giebink, G. S. 1999. Otitis media: The chinchilla model. *Microb. Drug Resist.* **5 (1)**:57-72.
39. Sinus and Allergy Health Partnership. 2000. Antimicrobial guidelines for acute bacterial rhinosinusitis. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **123(Suppl)**: 5-31.
40. American Academy of Pediatrics. 2001. Clinical practice guideline management of sinusitis. *Pediatrics.* **108**: 798-808.
-
41. Brooks, I., Gooch, W. Mill, Jenkins, S. G. 2000. Medical management of acute bacterial sinusitis: recommendations of clinical advisory committee on pediatric and adult sinusitis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **182 (Suppl)**:2-20.
42. Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., and Swaminathan, B. 1995. Interpreting Chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing *J. Clin. Microb.* **33(9)**: 2233-2239.

43. Vázquez, J. A., y Berrón, S. 2004. Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era del Internet. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **22** (2):113-128.
44. Hausdorff, W. P., Sibe, G., Paradiso, P. R. 2001. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotypes frequency in young children. *Lancet.* **357**: 950-952.
45. Modlin, J.F. 2000. Preventing Pneumococcal disease among infants and young children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morb. Mortal. Wkly. Rep. MMWR.* **(49)**:1-35.
46. Fry, A. M., Facklam, R. R., Whitney, C. G., Plikaytis B. D., and Schuchat, A. 2003. Multistate evaluation of invasive pneumococcal diseases in adults with, Human Immunodeficiency Virus Infection: Serotype and antimicrobial resistance patterns in the United States. *Journal of Infect Dis.* **188**: 643-652.®
47. Lister, F. S. 1923. Specifics serological reactions with pneumococci from different sources. *South Africa Inst. Med. Res.* **2**: 103-114.
48. Oppenheim, B., Koornhof, H. J., and Austrian, R. 1986. Antibiotic-resistant pneumococcal disease in children at Baragwanath Hospital, Johannesburg. *Pediatr. Infect .Dis. J.* **5**: 520-524.

49. Simberkoff, M. S., Lewkaszewski, M., Cross, A., Al-Ibrahaim, M., Baltch, A. L., Smith, R. P., Geisler, P. J., Nadler, J., and Richmond, A. S. 1986. Antibiotic-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae* from clinical specimens: a cluster of serotype 19A organisms in Brooklyn, New York. *J. Infect. Dis.* **153**: 78-82.
50. Song, Jae-Hoon, Nam, Yong Lee, Ichiyama, S., Ryoji Yoshida, Hirakata, Y., Wang Fu, Chongthaleong, A., Aswapooke N., Cheng-Hsun, Lalitha, M. K., Thomas K., Perera, J., Teow, Y., Jamal, F., Jacobs, M., Appelbaum, P., and the ANSORP Study Group. 1999. Spread of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Asian Countries: Asian network for surveillance of resistant pathogens (ANSORP) *Clin. Infect. Dis.* **28**: 1206-1211.
51. Feikin, D. R., and Klugman, K. P. 2002. Historical changes in pneumococcal serogroup distribution: Implications for the era of pneumococcal conjugate vaccines. *Clin. Infect. Dis.* **35**: 547-555.
52. Appelbaum, P. C. 1992. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. *Clin. Infect. Dis.* **15**:77-83.
53. Dagan, R. P., Yagupsky, A., Goldbart, A., Wasas, and Klugman, K. 1994. Increasing prevalence of penicillin-resistant pneumococcal infection in children in southern Israel: Implications for future immunization policies. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **13**:782-786.

54. Kam, K. M., Luey, K.Y., Fung, S.M., Yiu, P. P., Harden, T J., and Cheung, M. M. 1995. Emergence of multiple-antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Honk Kong. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **39**: 2667-2670.
55. Klugman, K. P. 1990. Pneumococcal resistance to Antibiotics. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**:171-196.
56. Koornhof, H. J., Wasas, A., and Klugman, K. 1992. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: A South African perspective. *Clin. Infect. Dis* **15**: 84-94.
57. Liñares, J. R., Pallarés, T., Alonso, J. L., Pérez, J., Ayats, F., Guidol, P. F., Viladrich, and Martín, R. 1992. Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Bellvitge Hospital, Barcelona, Spain (1979-90) *Clin. Infect. Dis.* **15**:99-105.
58. Casal, J. 1982. Antimicrobial Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*. Serotype distribution of penicillin resistance strains in Spain. *Antimicrobial. Agents. Chemother.* **22**: 222-225.
59. Mason, E. O., Kaplan, L. B., Lamberth, L. B., and Tillman, J. 1992. Increased rate of isolation of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*

in a children's hospital and *in vitro* susceptibilities to antibiotics of potential therapeutic use. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **36**:1703-1707.

60. Di Fabio, J. L., Castañeda, E., Agudelo, C. I., de la Hoz, F., Hortal, M., Camou, T. Echaniz, G., Camalla, M. N., Heitmann, I., Hormazabal, J. C., Brandileone, M., Díaz, V. S., Regueira, M., Ruvinski, R. Corso, A., Lovgren, M., Talbot, J., De Cuadros, C., and the PAHO SIREVA.VIGIA Study Group. 2001. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, SIREVA-VIGIA Group, 1993 to 1999. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **20**:959-967.

61. Casthaneira, M., Gales, A. C., Mendes, R. E., Jones, R. N., and Sader, H. S. 2004. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus penumoniae* in Latin America: Result from five years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**: 645-651.

62. Echániz A. G., Velásquez, M. E., Camalla, M. Soto, A., Solórzano, F., Pérez, A., Gática, R., Di Fabio, J. L. 1997. Antimicrobial susceptibilities and capsular types of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in children in Mexico city. *Microb. Drug. Resist.* **3**:153-157.

63. Babl, F. E., Pelton, S.I., Ruest, K., Sung, J. 2001. Constancy of distribution of serogroups of invasive pneumococcal isolates among children: experience during 4 decades. *Clin. Infect. Dis.* **32**: 1155-1161.

64. Fenoll, A. C., Bourgon, M., Muñoz, R., Vicioso, D., and Casal, J. 1991. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infection in Spain, 1979-1989. *Rev Infect Dis.* **13**: 56-60.
65. Breiman, R. F., Buttler, J. C., Tenover, F. C., Elliot, J A., and Facklam, R. R. 1994. Emergence of drug-resistance pneumococcal infection in the United States. *J. Am. Med. Assn.* **271**: 1831-1835.
66. Guiscafré, G. H., García, M., Trejo, A., Hernández, R., Muñoz, O. 1981. Frecuencia de *Haemophilus influenzae* y de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina en portadores sanos. *Arch. Invest. Med. Méx.*; **12**:141-151.
67. Jacobs, M. R., and Appelbaum, P. C. 2000. Susceptibilidad de 1,100 cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas en 1997 de siete países de América Latina y el Caribe. *Antimicrob. Agents J.* **16**: 17-24.
68. Nachman, J. D., and Tomasz, A. 1989. Penicillin-binding protein families: evidence for the clonal nature of penicillin resistance in clinical isolates of pneumococci. *J. Infect. Dis.* **159**:16-25.

69. Tunkel, A., Hartman, B. J., Sheldon, L., Kaplan, Bruce, A., Kaufman, K., Roos, L. W., Scheld, M., and Whitley, R. J. 2004. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin. Infect. Dis.* **39**: 1267-1284.

70. Mandell, L. A., Bartlett, J. G., Scott F., Dowell, Thomas M. F., Musher, D. M., and Whitley, C. 2003. Update of practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in immunocompetent adults. *Clin. Infect Dis.* **37**:1405-1433.

71. Hortal, M., Camou, T. 2001. Epidemiología Molecular de *Streptococcus pneumoniae*. *Rev. Chil. Infect.* **18** (Supl.1):22-25.

72. PMEN. Pneumococcal Molecular Epidemiology Network: World Wide Spread_of Clones.

http://www.sph.emory.edu/PMEN_ww_spread_clones.html.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

73. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twelfth informational supplement. NCCLS document M100-S12, Vol. 22 Wayne, Pa: National Committee for Laboratory Standards, 2002.

74. Soares, Lefevre, J. C., Faucon, G., Sicard, A. M. 1993. DNA fingerprinting of *S. pneumoniae* strains by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). *J. Infect. Dis.* **168**: 158-163. Adaptación de la Dra. María E. Velázquez Meza.

75. Jacobs, M. R. 2004. *Streptococcus pneumoniae*; epidemiology and patterns of resistance. Am J Med. 117 (Suppl 3A): 3-15S.

76. Gómez, D., Calderón, E., Rodríguez, R., Espinosa de los Monteros, L., Juárez M. 1999 *Streptococcus pneumoniae* meningitis resistant to penicillin clinical and microbiological characteristics. Salud Publica Mex 41 (5): 397-404.

77. Shann, F., Woolcock, A., Black, R. 1999. Introduction: acute respiratory tract infection: the forgotten pandemic. Clin Infect Dis 28: 189-91.

78. Bakir, J., Gentile, S., López, G., Procopio, A., Vázquez, M. 2003 Perfil epidemiológico de las infecciones invasivas por *Streptococcus pneumoniae*. Arch Pediatr Urug. 74 (1): 43-50.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

79. Clarke, P., Murchan, S., Smyth, E., and Humphreys, H. 2004 Antimicrobial susceptibility of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Ireland. Clin Microbiol Infect. 10: 657-659.

80. Shortridge, V. D., Doern, G. V., Brueggemann, A.B., Beyer, J.N., Flamm RK.1999 Prevalence of macrolide resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* isolates from a multicenter antibiotics resistance surveillance study conducted in the United States in 1994-1995. Clin Infect Dis 29: 1186-88.

81. Kyaw, M.H., Clarke, S., Jones, I., and Campbell H. 2002 Incidence of invasive pneumococcal disease in Scotland, 1998-99. *Epidemiol Infect.* **128**: 139-147.

82. Beall, B., McEllistrem, M.C., Gertz, R., Boxrud, D., Besser, J., Harrison Lee, Jorgensen, J., and Whitney, C., and for the active bacterial core surveillance/emerging infections program network. 2002. Emergence of a novel penicillin-Nonsusceptible, invasive serotype 35B clone of *Streptococcus pneumoniae* within the United States. *J Infect Dis.* **186**: 118-22.

83. Porat, N., Barkai, G., Jacobs, M., Treflar, R., and Dagan, R. 2004. Four antibiotic resistant *Streptococcus pneumoniae* clones unrelated to the pneumococcal conjugate vaccine serotypes, including 2 new serotypes causing acute otitis media in Southern Israel. *J Infect Dis.* **189**: 000-000.

84. Zielen, S., Buhrin, I., Strnad, N., Reichenbach, J., and Hofmann, D. 2000 Immunogenicity and tolerance of a 7-valent pneumococcal conjugates vaccine in nonresponders to the 23-valent pneumococcal vaccine. *Infect and Immun.* **68**: 1435-40.

85. Black, S., Shinefield, H., Fireman, B., Lewis, E. Ray, P., Hansen, J., Elvin, L., Ensork, Hackell, J., Siber, G., Malinoski, F., Mudare, D.,

Austrian, R. 2000. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *Pediatr Infect Dis J.* **19**:187-95.

86. Hausdorff, W, Bryan, J., Paradiso, P., Siber, G. 2000. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis.* **30**: 100-21.

87. Jackson, L.A., Neuzil, K.M., Yu, O. 2003. Effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine in older adults. *N Engl J Med.* **348**: 1737-1755.

88. Muñoz, R., Coffey, T.J., Daniels, M., Dowson, Ch., Laible, G., Casal, J, Hakenbeck, Jacobs, M., Musser, J. M., Spratt, B. G., and Tomasz, A. 1991. Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23 F *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **164**: 302-306.

89. Martin, C., Sibold, C., Hakenbeck, R. 1992. Relatedness of penicillin binding protein 1a gene from different clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated in South Africa and Spain. *EMBO J.* **11**: 3831-3836.

90. Sibold, C., Wang, J., Henrichsen, J., Hakenbeck, R. 1992. Genetic relationships of penicillin-susceptible and resistant-*Streptococcus pneumoniae* strains isolated on different continents. *Infect Immun* 60: 4119-4126.

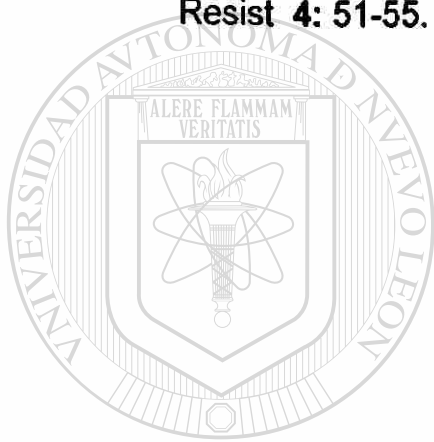
91. McGee, L., Klugman, K.P., Friedland, D., Lee, H.J. 1997. Spread of Spanish multiresistant serotype 23 F clone of *Streptococcus pneumoniae* to Seoul, Korea. *Microb Drug Resist*. 3: 253-257.

92. Mc Dougal, L.K., Facklam, R., Reeves, M. 1992. Analysis of multiresistant antimicrobial-resistant isolates *Streptococcus pneumoniae* from the United States. *Antimicrobial Agents Chemother* 36: 2176-2184.

93. Soares, S., Kristinsson, K.G., Musser, J.M., Tomasz, A. 1993. Evidence for the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980s. *J Infect Dis*. 168: 158-163.

94. Versalovic, J., Kapur, V., Mason, E.O., Shah, U., Koeth, T., and Musser, J. M. 1993. Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains recovered in Houston: identification and molecular characterization of multiples clones. *J Infect Dis*. 167: 850-856

95. Coffey, T.J., Dowson, C.G., Daniels, M., Zhou, J., Martin, C., Spratt, B. G., and Musser, J. M. 1991. Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 5: 2255-2260
96. Coffey, T., Enright, MC, Daniels M., Wilkinson, P., Berron, S., Fenoll, A., and Spratt, B. G. 1998. Serotype 19A variants of the Spanish serotype 23F multiresistant clone of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* 4: 51-55.

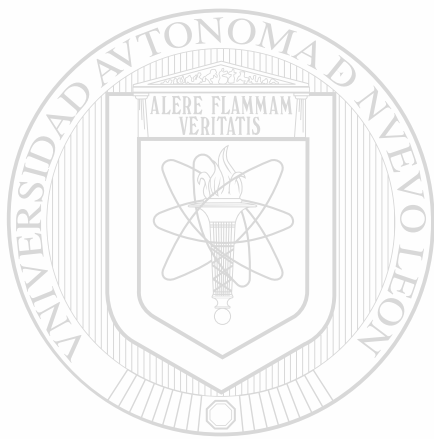


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



