

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



RESISTENCIA-SUSCEPTIBILIDAD DE
Streptococcus pneumoniae
SEROTIPIFICACION Y ANALISIS MOLECULAR

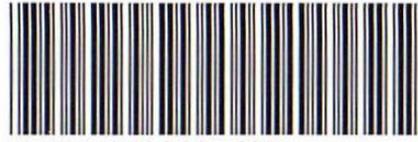
Por
ROSA MARIA HINOJOSA ROBLES

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 MARIA HINOJOSA ROBLEFS



1080127617

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



RESISTENCIA-SUSCEPTIBILIDAD DE

RESISTENCIA-SUSCEPTIBILIDAD DE

Streptococcus pneumoniae
Streptococcus pneumoniae

SEROTIPIFICACION Y ANALISIS MOLECULAR AR

Por

Por

ROSA MARIA HINOJOSA ROBLES
ROSA MARIA HINOJOSA ROBLES

Como requisito parcial para obtener el Grado de

Como requisito **DOCTOR EN CIENCIAS** de DOCTOR EN

con Especialidad en Microbiología Médica

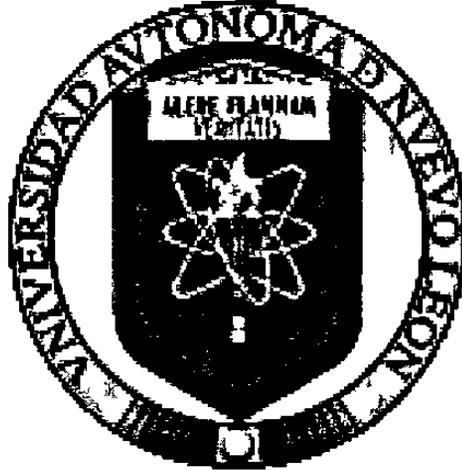
Julio, 2005

Julio, 2005





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



RESISTENCIA-SUSCEPTIBILIDAD DE
Streptococcus pneumoniae
SEROTIPIFICACIÓN Y ANÁLISIS MOLECULAR

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

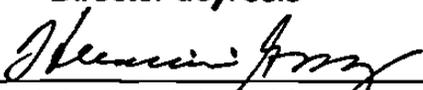
FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

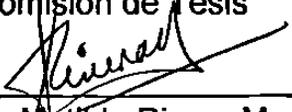


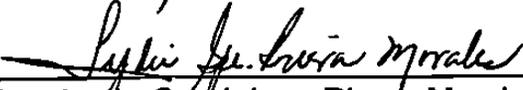
COMISIÓN DE TESIS


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. Lydia 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.

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

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
1.1.1.2 Cápsula bacteriana.....	3
1.1.1.3 Neumolisina.....	4
1.1.1.4 Amidasa.....	5
1.1.1.5 Neuraminidasa.....	6
1.1.1.6 Proteínas de superficie.....	6
1.1.1.7 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

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 <i>Streptococcus pneumoniae</i> 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 <i>S. pneumoniae</i> serotipo 23F.....	70
8. Gel de análisis final de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 6A, 6B, y 19F.....	72
9. Gel de análisis final de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 14 y 9.....	73
10. Gel de análisis final de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 35B.....	74

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
Plp'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	Tetracicilina
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	<i>Serratia marcescens</i> 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.

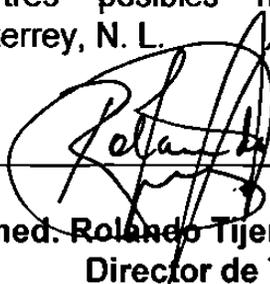
Número de páginas: 106

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

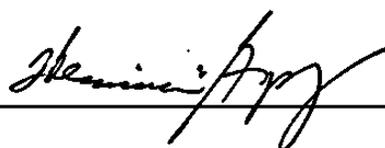
Área de estudio: Microbiología.

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).

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).

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 hematológica 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 calloso, 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 clonas 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).

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 ($\text{CMI} \leq 0.06\mu\text{g/mL}$) 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 quinupristín/dalfopristín, 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

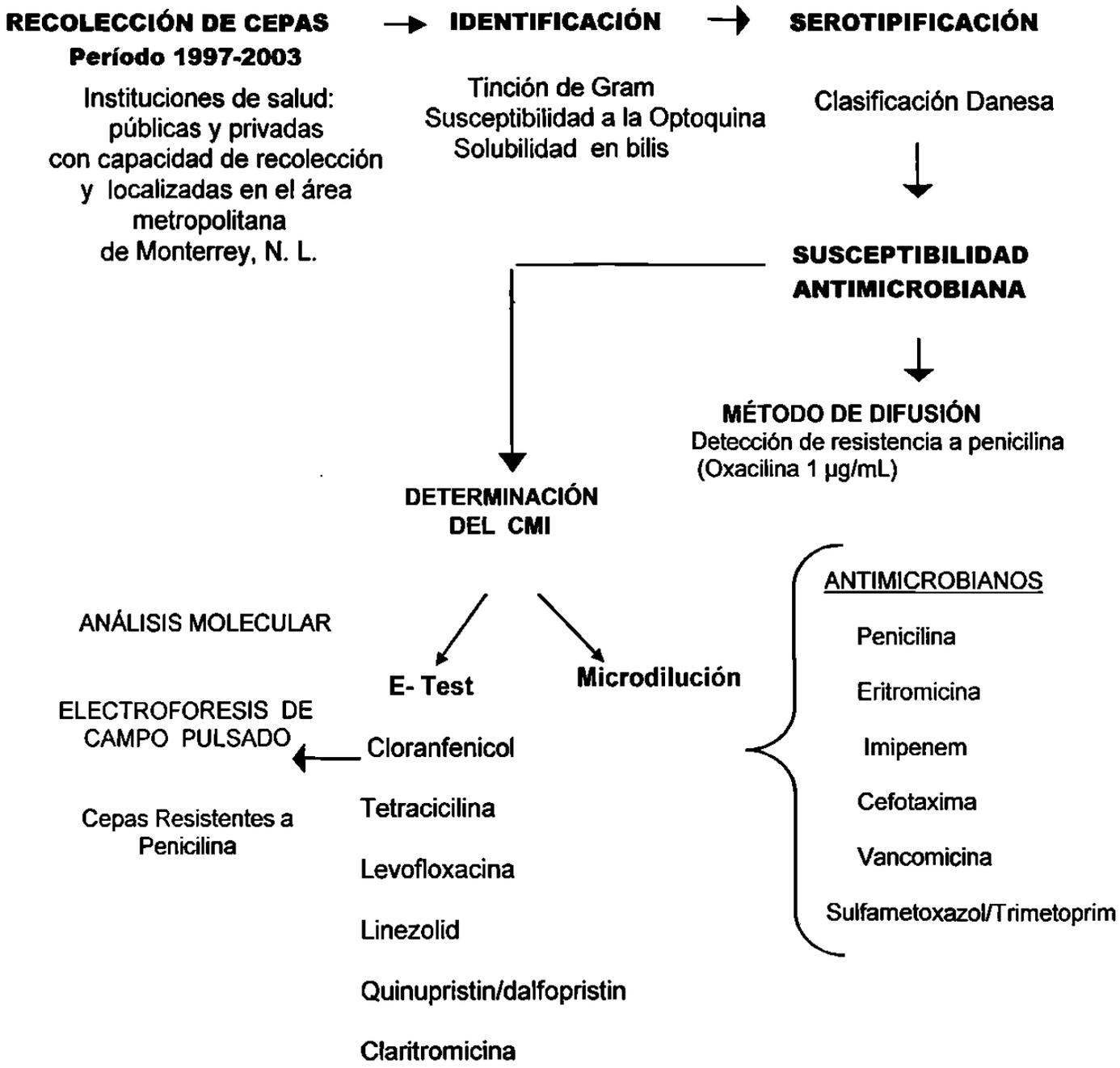
- 1. Recolectar e Identificar las cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas de niños y adultos con enfermedades neumocócicas y atendidos en Instituciones de salud, en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León desde diciembre de 1997 a febrero del 2003.**
- 2. Determinar los patrones de resistencia 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 fórmula:

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

2.7.4 Elaboración de los discos de agarosa

Los tubos conteniendo 150 μ L 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 μ L de agarosa LMP al 1.5% disuelta en PIV. De esta mezcla se colocaron 20 μ L 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 μ L/mL de aquí se tomaron 75 μ L 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%		
VÍAS RESPIRATORIAS BAJAS			
n =31		n= 47	
NEUMONÍA	23.3%	NEUMONÍA	50 %
EMPIEMA 2o.	1.6%	EMPIEMA 2o.	10.3%
INFECCIONES INVASIVAS			
n= 29		n= 14	
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
sistencia 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

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

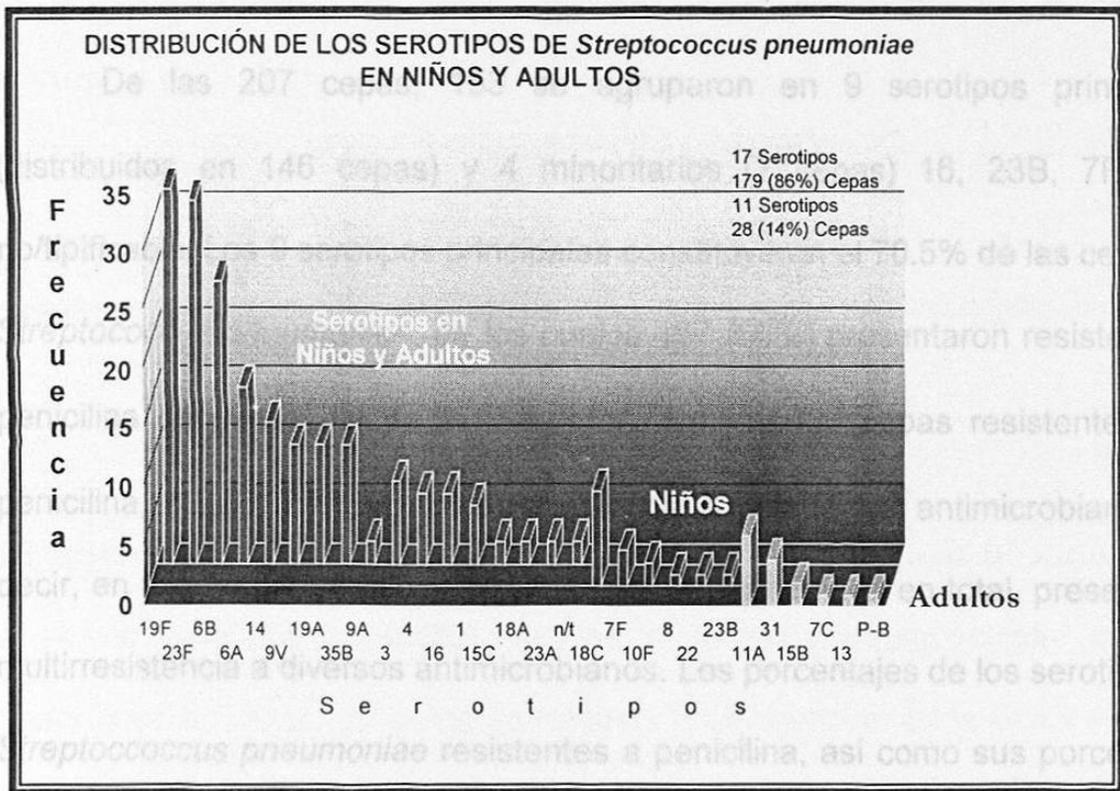
Antimicrobiano	Susceptible	Intermedio	Resistente
	%	%	%
IPM	71	28	1
E	72	1	27
CH	72	1	27
TE	68	2	30
SXT	46	6	48
CL	78	0	22
LV	99	0	1
LZ	100	0	0
Q/R	100	0	0
VAN	100	0	0
CTXno-m	80	14	6
CTXm	33	17	50

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.

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.

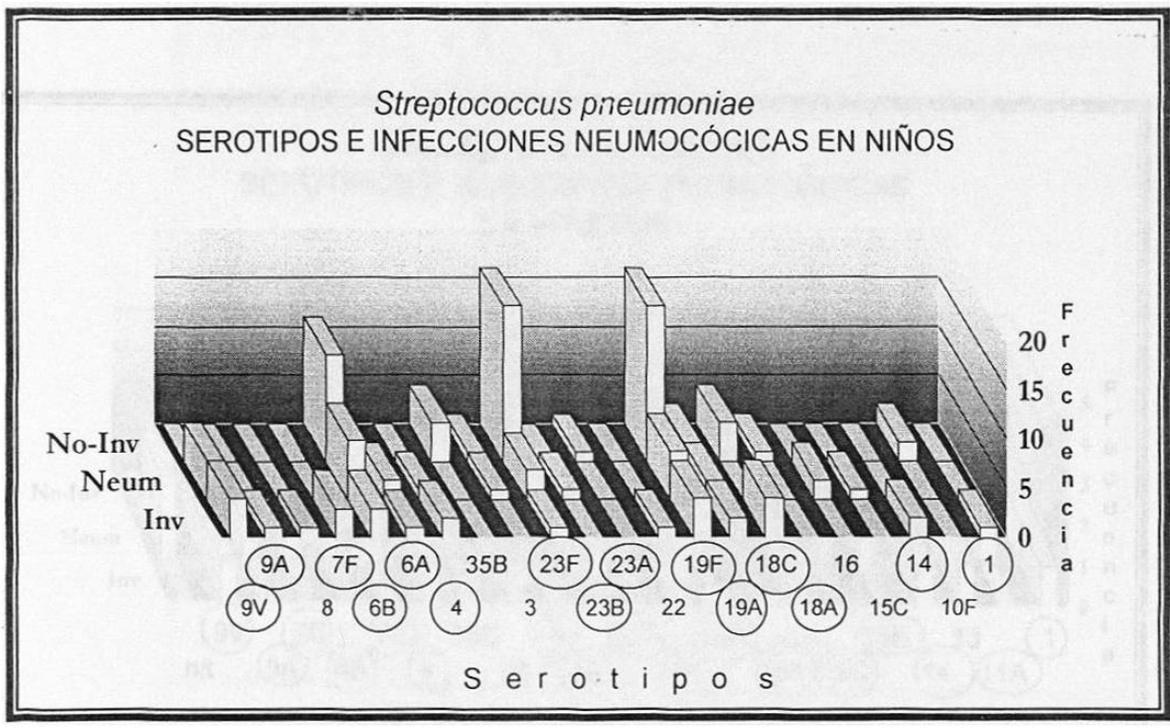
Tabla No. 12 Principales serotipos de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la penicilina y multirresistentes obtenidos de niños y adultos durante un período de 6 años en Monterrey. N. L.

Serotipos de <i>S. pneumoniae</i>	CMI (µg/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

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.

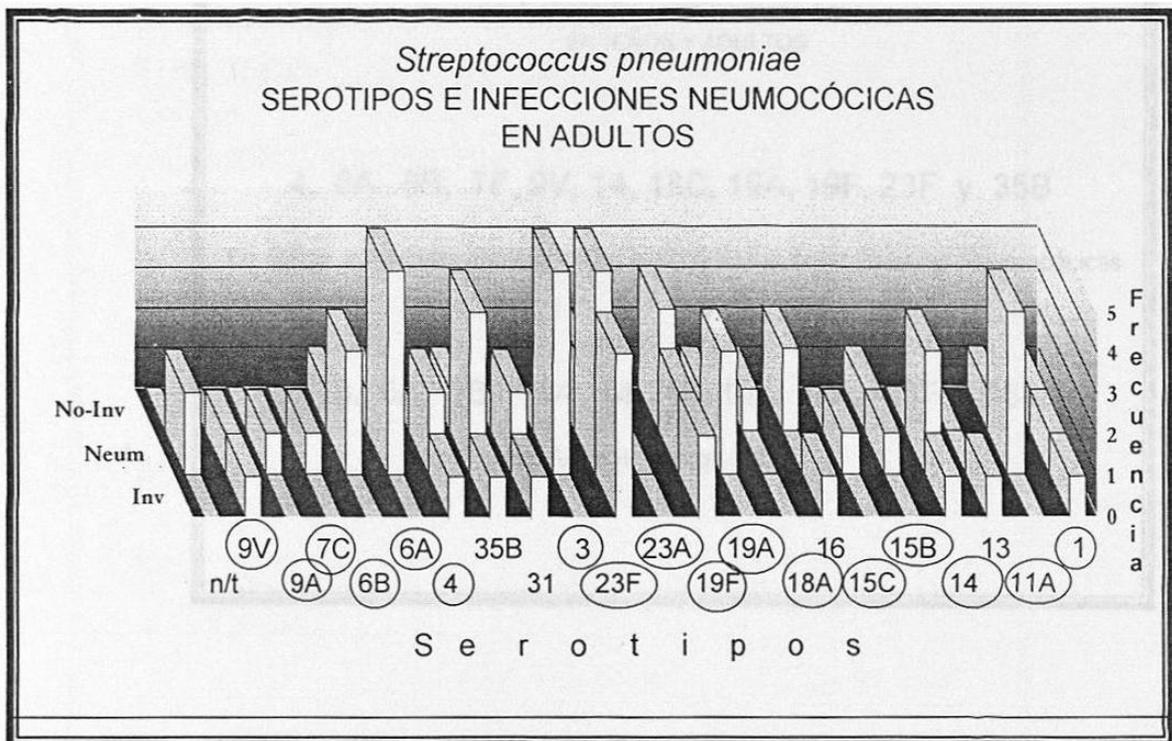


Gráfica No.3 Serotipos de *Streptococcus pneumoniae* implicados en la infección neumocócica en niños

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%

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 Y OTROS	1 / 10	2 / 8
	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.

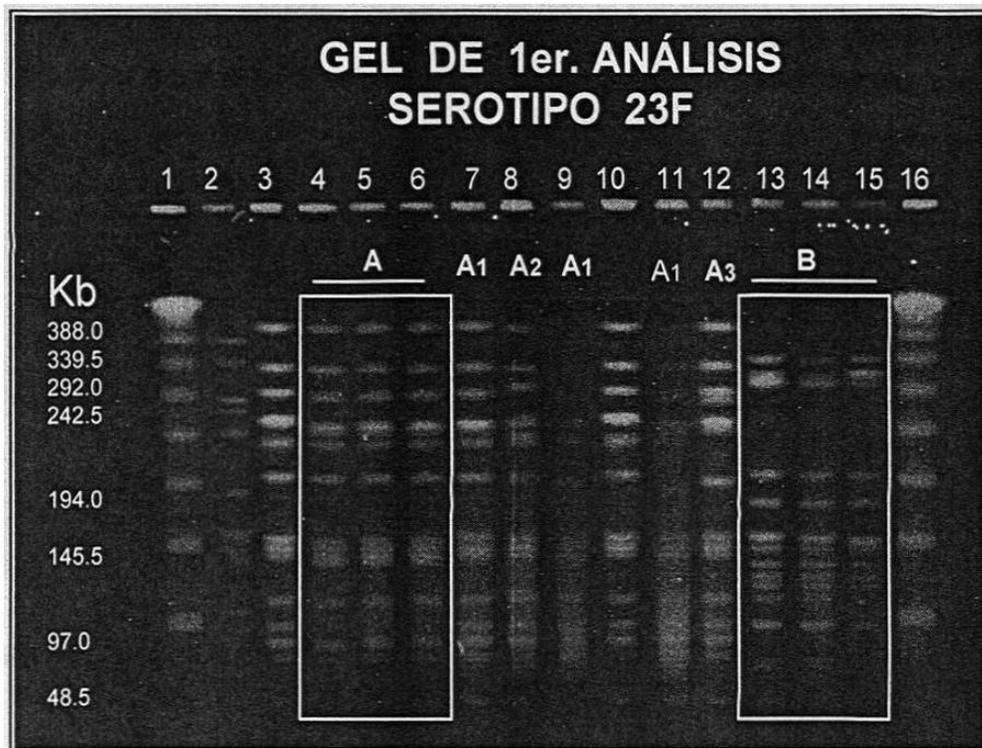


Figura 5. Electroforesis de campo pulsado de *S. pneumoniae* 23F. Carriles 1 y 16 ; MPM DNA lambda, carril 2; cepa control R6 , carril 3 y 10; Control Cleveland-2 Serotipo 23F, carriles 4-9,11 y 12; clona A y subtipos, carriles 13-15 patrón B. **Clonas Mayoritarias A y B**

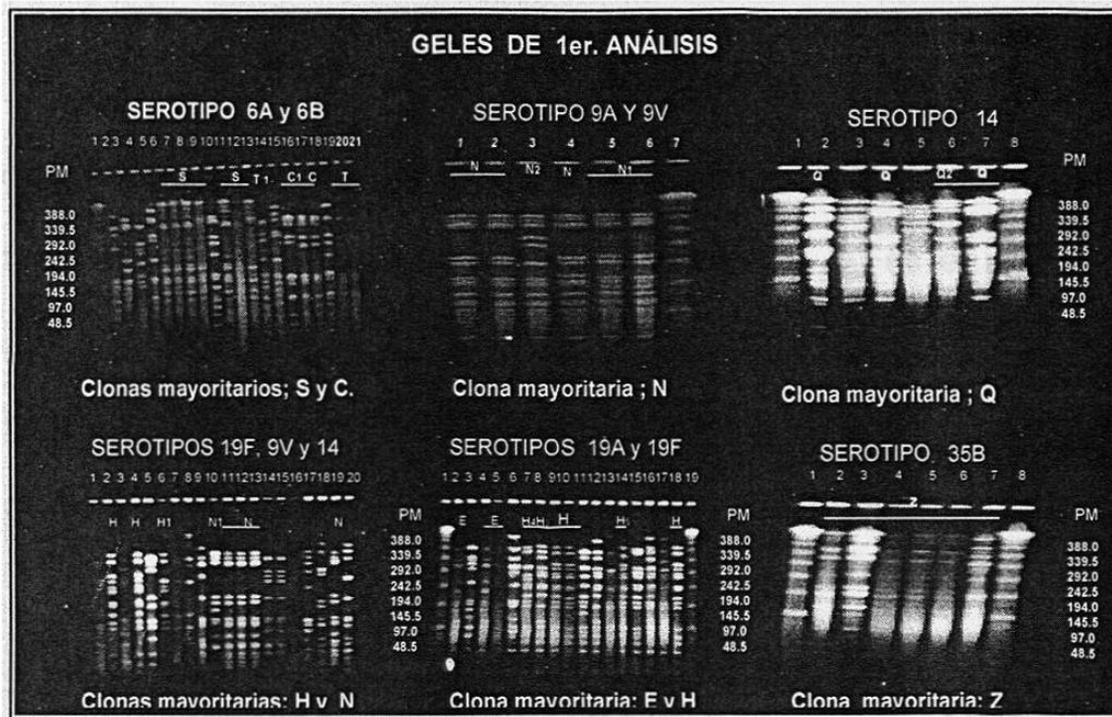


Figura No. 6 Geles de 1er. Análisis de *Streptococcus pneumoniae* serotipos 6A, 6B, 9A, 9V, 14, 19A y 35B

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.