



FACULTAD
DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A ERITROMICINA DE *Streptococcus pneumoniae*
SEROTIPO 19A EN HOSPITALES PERTENECIENTES A LA RED GIVEBPV_{ac} DURANTE EL
PERIODO 1993-2019

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

SEMINARIO DE INVESTIGACION II Y III
QUE PARA-OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L Ó G O

P R E S E N T A:

DANIEL LÓPEZ PASTRANA

Directora: M. C MARIA NOEMI CARNALLA BARAJAS
Codirectora: DRA. IRMA GABRIELA ECHANIZ ÁVILES

CUERNAVACA, MORELOS

Febrero, 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A ERITROMICINA DE *Streptococcus pneumoniae*
SEROTIPO 19A EN HOSPITALES PERTENECIENTES A LA RED GIVEBPV_{ac} DURANTE
EL PERIODO 1993-2019**

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS
SEMINARIO DE INVESTIGACION II Y III
QUE PARA-OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:**

DANIEL LÓPEZ PASTRANA

**Directora: M. C MARIA NOEMI CARNALLA BARAJAS
Codirectora: DRA. IRMA GABRIELA ECHANIZ ÁVILES**

ÍNDICE

ÍNDICE	2
1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	5
3. MARCO TEÓRICO.....	6
3.1 EPIDEMIOLOGÍA	6
3.2 <i>S.pneumoniae</i> serotipo 19A.....	7
3.3 ASPECTOS HISTÓRICOS	8
3.4 CLASIFICACION TAXONÓMICA	8
3.5 CARACTERISTICAS GENERALES	8
3.6 FACTORES DE VIRULENCIA.....	9
3.7 PRINCIPALES FACTORES DE VIRULENCIA.....	9
4. IDENTIFICACIÓN.....	10
4.1 Morfología.....	11
4.2 Condiciones de cultivo	11
4.3 Condiciones atmosféricas:.....	11
4.4 Tinción de Gram.....	11
4.5 Susceptibilidad a la optoquina.....	11
4.6 Solubilidad en bilis.....	12
5. SEROTIPIFICACIÓN.....	12
6. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA	13
6.1 Resistencia a β -lactamicos (Penicilinas y Cefalosporinas):	14
6.2 Resistencia a Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina y Levofloxacina):	14
6.3 Resistencia a Macrólidos (Eritromicina):	14
7. VACUNAS.....	17
8. JUSTIFICACIÓN.....	21
9. HIPOTESIS	22
10. OBJETIVOS.....	23
11. METODOLOGÍA	25
11.1 PRUEBA DIFUSION DE DOBLE DISCO	27
11.2 PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA).	28
11.3 ANALISIS DE DATOS	29
12. RESULTADOS	30
13. DISCUSIÓN.....	35
14. CONCLUSIÓN	38
15. REFERENCIAS	40

Abreviaturas y acrónimos:

XDR: Resistencia extendida a los antimicrobianos (por sus siglas en inglés)

MDR: Multirresistencia a los antimicrobianos (por sus siglas en inglés)

PCV: Vacuna neumocócica conjugada (por sus siglas en inglés)

PCV7: Vacuna neumocócica conjugada 7-valente

PCV13: Vacuna neumocócica conjugada 13-valente

CIM: Concentración inhibitoria mínima

PPSV: Vacuna neumocócica polisacárida (por sus siglas en inglés)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)

RMSP: Resistencia a macrólidos en *Streptococcus pneumoniae*

SIREVA: Sistema regional de vacunación

CLSI: Instituto de estándares de laboratorios clínicos (por sus siglas en inglés)

GIVEBPVac: Grupo Interinstitucional para la Vigilancia de Enfermedades Bacterianas Prevenibles por Vacunación

CPS: Cápsula de polisacáridos (por sus siglas en inglés)

UFC: Unidades formadoras de colonias

ATCC: Cepa de control americana (American Type Culture Collection, por sus siglas en inglés)

1. RESUMEN

Streptococcus pneumoniae es el principal patógeno implicado en las neumonías adquiridas en la comunidad, así como otras enfermedades invasivas como lo son; meningitis, bacteriemia, septicemia, además de enfermedades no invasivas como otitis media aguda y sinusitis. Estas enfermedades son la principal causa de morbilidad y mortalidad en los niños menores de 5 años y en los adultos mayores, se estima que el neumococo es responsable de 1.6 millones de muertes alrededor del mundo anualmente, por lo que sigue siendo una de las principales causas de muerte prevenible por vacunación. Actualmente se han identificado 100 serotipos capsulares de *S. pneumoniae*, su distribución varía según la región geográfica, así como también su capacidad de causar enfermedades y su capacidad de presentar resistencia a los antibióticos.

Para tratar las enfermedades causadas por este patógeno se utilizan antimicrobianos con espectro de acción en los Gram positivos, sin embargo, la resistencia de *S. pneumoniae* a los antibióticos es un problema creciente, el desarrollo de cepas resistentes a penicilina, macrólidos, entre otros antibióticos ocurre gradualmente, la resistencia se puede deber a mutaciones genéticas repetidas en la bacteria y por presión selectiva por el uso no regulado de antibióticos, la principal preocupación es la resistencia a β -lactámicos y a los macrólidos. La resistencia a eritromicina en *S. pneumoniae* es conferida principalmente por dos mecanismos, la bomba de eflujo codificada por el gen (*mef*) y la metilación del sitio blanco por el gen (*erm*), además algunas cepas de *S. pneumoniae* pueden expresar ambos genes de resistencia, lo que está relacionado con concentraciones mínimas de inhibición (CIM) a los macrólidos, muy elevadas.

Existen vacunas conjugadas compuestas cuya formulación es específica para controlar a los principales serotipos causantes de enfermedades invasivas, sin embargo, desde la introducción de las vacunas neumocócicas conjugadas, en casi todo el mundo, se ha observado un fenómeno de remplazamiento de serotipos, los serotipos no vacunales han sido cada vez más frecuentes. El serotipo 19A emergió en muchos países después de la introducción de la PCV7, que no lo contenía (vacuna neumocócica conjugada), y su presencia está bien relacionada con casos de enfermedades invasivas complicadas, con alta resistencia a antibióticos, principalmente betalactámicos y macrólidos. El objetivo del presente trabajo fue analizar las características fenotípicas y genotípicas de las cepas de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19A resistentes a eritromicina antes y después de la introducción de la vacuna neumocócica conjugada PCV13 en México, durante el periodo de 1993-2019. Se analizaron un total de 334 muestras de *S. pneumoniae* serotipo 19A resistentes a eritromicina, provenientes de los hospitales que forman parte de la red GIVEBPVac (Grupo Interinstitucional para la Vigilancia de Enfermedades Bacterianas Prevenibles por Vacunación). En el periodo prevacunal, se identificó el fenotipo de un total de 98 aislamientos, el 87.7% (86/98) presentaron el fenotipo MLSB, mientras que el 12.3% de las muestras (12/98), presentaron el fenotipo M. En el periodo post vacunal con un total de 236 aislamientos, el 95% (224/236) presentaron el fenotipo de resistencia MLSb, mientras que el 5% (12/236) resultaron con el fenotipo de resistencia M.

La resistencia a eritromicina en *S. pneumoniae* serotipo 19A se ha incrementado a través del tiempo, principalmente después de la introducción de las PCVs, encontrando en este estudio la presencia del fenotipo MLSB en mayor cantidad con respecto al fenotipo M.

2. INTRODUCCIÓN

Streptococcus pneumoniae es un patógeno considerado un problema prioritario de salud pública ya que es la principal causa de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años y en adultos mayores [1]. A nivel mundial y anualmente se estima que cerca de 0.8 a 1 millón de niños mueren de enfermedades invasivas causadas por *S. pneumoniae*. [2,3].

Este microorganismo se encuentra comúnmente como comensal en la nasofaringe de los humanos, además es un patógeno oportunista que causa diversas enfermedades, conocidas como enfermedades neumocócicas que se dividen en invasivas y no invasivas. Las enfermedades neumocócicas invasivas causadas por este patógeno son aquellas que penetran los sitios estériles del cuerpo como; bacteriemia, meningitis y neumonía, mientras que las enfermedades no invasivas son las que afectan a las mucosas del organismo, otitis media, sinusitis y conjuntivitis. La transmisión ocurre por el contacto directo de un individuo a otro, el patógeno se adhiere y coloniza la nasofaringe y una vez que esto ocurre puede replicarse localmente o diseminarse a otros tejidos [4].

Este patógeno a través de los años ha adquirido una importante y creciente resistencia a los antibióticos más comúnmente utilizados, en 1980 la penicilina era el tratamiento principal contra este patógeno, sin embargo, en 1990 se comenzó a usar la eritromicina como tratamiento alternativo debido a la presencia de una importante resistencia, desafortunadamente la resistencia a macrólidos evoluciona rápidamente siendo que el nivel de resistencia a macrólidos superó al de la penicilina [5].

La resistencia a antibióticos por *S. pneumoniae* es un problema creciente debido a que la mortalidad aumenta proporcionalmente a la resistencia a antibióticos, la resistencia antimicrobiana se puede deber a mutaciones genéticas repetidas en las bacterias, por presión selectiva, presión por competencia, transferencia horizontal de genes y por el uso indiscriminado de antibióticos [6].

Los macrólidos son un grupo de antibióticos cuya estructura química comprende un anillo lactónico macrocíclico de gran tamaño, tiene un amplio espectro antimicrobiano, principalmente empleados en el tratamiento de infecciones respiratorias, otorrinolaringológicas, cutáneas, y de tejidos blandos. Son compuestos bacteriostáticos que inhiben la síntesis de proteínas al ligarse de forma reversible a la subunidad ribosomal 50S de los microorganismos sensibles. A este grupo pertenecen la eritromicina, azitromicina, claritromicina, oleandomicina, kitasamicina, entre otros [7].

La resistencia a eritromicina por *S. pneumoniae* ha sido reportada en todo el mundo desde 1968 [2], en los últimos 20 años la Resistencia a Macrólidos en *Streptococcus pneumoniae* (RMSP) ha aumentado debido al indiscriminado uso de macrólidos. Son dos los principales mecanismos de resistencia, el eflujo o bombeo del antibiótico al exterior de la célula, este mecanismo es codificado por los genes *mef*, el segundo mecanismo consiste en la modificación del sitio diana codificado por los genes *erm*. Existen otros mecanismos menos comunes que consisten en mutaciones en los genes que codifican a proteínas ribosomales como L4, L22 o rRNA 23S [8].

La resistencia antimicrobiana del neumococo difiere entre sus serotipos y la distribución de estos serotipos difiere en todo el mundo. Los serotipos de *Streptococcus pneumoniae*, son variantes que se distinguen unos de otros de acuerdo con los antígenos que se exhiben en su cápsula, por eso mismo cada serotipo es identificado de manera diferente por el sistema inmune.

El serotipo 19A de *S. pneumoniae* emergió como el serotipo predominante en varios países después de la introducción de la PCV7 (formulada con los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) afectando tanto a niños como adultos. Se cree que esto ocurrió debido al fenómeno de remplazamiento de serotipos después de la introducción de la vacuna; sin embargo, en países sin la introducción de la PCV7 en sus programas de vacunación también se reportó el aumento del serotipo 19A [9]. Además de su mayor prevalencia, el serotipo 19A ha demostrado ser más virulento que otros serotipos al presentar mayor potencial de generar enfermedades invasivas y el factor más alarmante del serotipo 19A es su alta resistencia a los antibióticos más comunes [10].

La vigilancia de la resistencia a macrólidos de *S. pneumoniae* serotipo 19A es muy importante, así como la identificación de los mecanismos de resistencia de las cepas circulantes, la implementación de estrategias como el uso prudente de antibióticos y la vigilancia de los serotipos causantes de enfermedades neumocócicas podría ayudar a controlar a este patógeno, disminuyendo el incremento de la resistencia en los casos de enfermedades neumocócicas [1].

3. MARCO TEÓRICO

3.1 EPIDEMIOLOGÍA

En el mundo *S. pneumoniae* constituye la principal causa de las neumonías adquiridas en la comunidad y de enfermedades invasivas y no invasivas como meningitis, bacteriemia, otitis media aguda y sinusitis, principalmente en niños menores de 5 años y adultos mayores de 65 años, con altas tasas de morbilidad y mortalidad que en las últimas décadas se ha visto agravada por la cada vez mayor incidencia de cepas resistentes a los antibióticos más comunes. [5].

S. pneumoniae es un comensal común de la nasofaringe y la orofaringe, la tasa de colonización es de 27-65% en niños [11,4] y en la población en general es del 20 a 40% [12]. La vía de transmisión de este patógeno es aérea, a través de gotas de saliva de individuos portadores o de enfermos, este organismo es susceptible al calor, el frío y la desecación por lo que es necesario de un contacto estrecho [13].

La Organización Mundial de la Salud en el 2015 estimó un total de 8.9 millones de casos de neumonía causadas por *S. pneumoniae*, de las cuales 3.5 millones fueron severas. De las muertes ocasionadas por este patógeno el 81% corresponde a neumonías y el 12% restante a meningitis [14].

El CDC (Centro de control de enfermedades por sus siglas en inglés) en Estados Unidos reporta que hay más de 2 millones de infecciones neumocócicas al año resultando en más de 6,000 muertes y más del 30% de las infecciones el *S. pneumoniae* es resistente a más de un antibiótico, en los adultos se estima que hay 150,000 hospitalizaciones anualmente [15].

En Estados Unidos *S. pneumoniae* causa 40,000 infecciones fatales al año [16]. Mientras que, en Latinoamérica, se estimó la incidencia del neumococo en 358 casos por cada 100, 000 niños y un total de 5700 muertes estudios realizados en muchos países acerca de la distribución de serotipos prevalentes en las comunidades han demostrado que la frecuencia varía con respecto al tiempo, el cuadro clínico, edad y la región geográfica [12].

Este patógeno representa un problema mundial en la salud pública, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año mueren 700 mil niños menores de 5 años a causa del

neumococo, y es considerado como la mayor causa de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años y en adultos mayores, los grupos más vulnerables son los niños inmunocomprometidos por el VIH, reportando un estimado de 23,300 muertes este grupo a nivel mundial. En los últimos años *S. pneumoniae* ha presentado un incremento a la resistencia de diversos antibióticos. En respuesta a esta problemática se ha resaltado la necesidad de una eficiente vigilancia como estrategia para el combate a la resistencia a macrólidos, las vigilancias internacionales juegan un papel muy importante al determinar la extensión del problema de la resistencia. Además, un análisis internacional puede proveer la información para la selección antibacteriana, ayudar en el desarrollo de políticas para el uso de antibióticos esto según la información regional de las susceptibilidades antimicrobianas [14]. En la lista del 2017 de los patógenos multirresistentes a antibióticos de la OMS, se considera a *S. pneumoniae* como una prioridad mediana debido a las vacunas implementadas

3.2 *S. pneumoniae* serotipo 19A

El amplio uso de la PCV7 (vacuna neumocócica conjugada heptavalente) disminuyó exitosamente la enfermedad neumocócica de los serotipos contenidos en esta vacuna; a través de los años, la prevalencia de los serotipos no vacunales empezó a incrementarse. El serotipo 19A emergió como un serotipo importante en algunos países y tanto en niños como adultos después de la introducción de la PCV7.

S. pneumoniae serotipo 19A es el serotipo no vacunal más prevalente después de la introducción de PCV7 y se ha documentado que ha desarrollado multirresistencia a antibióticos, sin embargo, paralelamente en las regiones donde las PCVs no están disponibles la incidencia sigue en aumentando por lo que se ha propuesto que el aumento de la incidencia del serotipo 19A puede ocurrir de manera independiente y el uso de las PCVs de alguna manera han acelerado y reforzado esta tendencia [9].

En general *S. pneumoniae* es un microorganismo que tiene una patogenicidad variable según sus serotipos, que es capaz de generar enfermedades neumocócicas tanto invasivas como no invasivas, en los principales grupos vulnerables. Sin embargo, posterior a la introducción de la PCV7 en muchos países, el serotipo 19A se posicionó como el de mayor importancia para la salud, debido a que posee una prevalencia mayor a la de cualquier otro serotipo y que con el paso de los años se ha adaptado por medio de presión selectiva y presión por los antibióticos con características bioquímicas y genéticas que dificultan el control y tratamiento. Dichas características son: Multirresistencia (resistencia a tres o más grupos de antibióticos) a los principales antimicrobianos para su tratamiento, prevalencia en todas las regiones y climas en casi todos los grupos de edad (dificultando su control incluso con las vacunas conjugadas) y mayores probabilidades que cualquier otro serotipo para generar enfermedades invasivas. Estas características convierten al serotipo 19A en el serotipo más problemático a pesar de la implementación de las PCV. [17,9]

3.3 ASPECTOS HISTÓRICOS

S. pneumoniae fue descubierto por primera vez de manera casi simultánea en 1881, por Louis Pasteur y George Miller Sternberg, fue denominado “microbio septicémico de la saliva” por Pasteur y *Micrococcus pasteuri* por Sternberg en ese mismo año en el cual ambos investigadores lo aislaron, Sternberg lo aisló mediante la inoculación de conejos con su propia saliva, por su parte Pasteur aisló la bacteria de ratones a los que había inoculado con la saliva de un niño muerto por el virus de la rabia. Pasteur publicó sus observaciones antes que las de Sternberg en enero de 1881 en la Academia Francesa de Medicina en París [18], mientras que Sternberg las publicó en abril de ese año [19]. Desde entonces ha recibido varios nombres en 1884 fue denominado *Micrococcus pneumoniae*, posteriormente fue nombrado *Diplococcus pneumoniae* debido a su morfología, y finalmente fue denominado *Streptococcus pneumoniae* en la octava edición del Manual de Bacteriología de Bergey cuya denominación sigue vigente [20].

3.4 CLASIFICACION TAXONÓMICA

S. pneumoniae pertenece a la familia Streptococcaceae, género *Streptococcus*, especie *pneumoniae*, son alfa hemolítica, esto debido a su característica formación de un halo por hemólisis alfa alrededor de sus colonias, la mayoría de las especies de este género son anaerobios facultativos. *S. pneumoniae* destaca del grupo por ser un importante patógeno humano.

3.5 CARACTERISTICAS GENERALES

S. pneumoniae es una bacteria Gram positiva con morfología de diplococos lanceolados con una cápsula externa a la pared celular, de 0.5-1.25 μm de diámetro, generalmente se encuentra en cadenas cortas o en parejas, es inmóvil, no forma esporas, su genoma es circular cerrado que contiene generalmente entre 2.0 y 2.1 millones de pares de bases, el genoma puede variar en un 10% según la cepa. Para su crecimiento y desarrollo se requieren condiciones y nutrientes específicos [5,11]. Para su cultivo existen medios artificiales que contienen los nutrientes necesarios para el crecimiento, son medios enriquecidos como agar soya tripticasa o agar infusión cerebro/corazón con 10% de sangre ovina. En la placa de cultivo se observan generalmente colonias lisas, pequeñas de 1-3 mm de diámetro, brillantes rodeados por un halo verde por una marcada α -hemólisis. Es anaerobio facultativo, su crecimiento y desarrollo es favorecido en un ambiente con 5 a 7% de CO_2 , es catalasa y oxidasa negativo [21].

La nasofaringe es el principal reservorio de *S. pneumoniae* esto debido a que la nasofaringe es colonizada sin que los individuos portadores presenten síntomas, pero migra a tejidos y órganos causando infección, los principales portadores son los niños, quienes transmiten el patógeno a los adultos mayores [22].

S. pneumoniae es un patógeno formidable y adaptable debido a que posee una amplia lista de factores de virulencia, estos promueven la invasión a los tejidos, reducen la capacidad del sistema inmune de eliminar las bacterias y producción de toxinas. *S. pneumoniae* es un patógeno oportunista ya que se caracteriza por causar infecciones en individuos con un sistema inmune débil, estos son los niños menores de 5 años, personas inmunocomprometidas y adultos mayores.

3.6 FACTORES DE VIRULENCIA

Los factores de virulencia funcionan obstruyendo la respuesta del sistema inmune, evadiendo los mecanismos de defensa o por contacto directo con los tejidos del huésped y con los receptores de las superficies celulares que interfieren con la activación de la respuesta y la erradicación bacteriana. Los factores de virulencia prevalecen y prosperan en las cepas debido a la habilidad del patógeno de adquirir nuevo material genético por medio de la transformación y recombinación [16].

La cápsula de polisacáridos es esencial para la patogenicidad del neumococo y es el factor de virulencia más importante, a partir de esta se puede obtener información bastante útil para la eficacia de las vacunas y en estudios de impacto [23]. La cápsula ayuda en la iniciación de la infección permitiendo la adherencia a las células del huésped causando inflamación, provee protección ante el sistema inmune esto por su habilidad de inhibir la fagocitosis de las células del sistema inmune innato, previene la identificación por los receptores del hospedero, los factores del complemento y neutrófilos. También manipula como las inmunoglobulinas reconocen a la bacteria y es capaz de inhibir las barreras físicas del huésped como la mucosas y cilios por medio de repulsión electrostática por su carga negativa [24].

La virulencia de la cápsula de *S. pneumoniae* se ve reforzada por su capacidad de modificarse debido a las mutaciones en los genes de síntesis (*cps*) esto produce nuevas cápsulas promoviendo el remplazamiento de serotipos, además el remplazamiento puede ocurrir si una nueva cápsula es sintetizada por adquisición de fragmentos de genes de otra cepa de neumococo o de especies relacionadas [25].

Este patógeno produce toxinas que son perjudiciales para el huésped, también posee varias proteínas superficiales que juegan un papel importante en la patogenicidad.

3.7 PRINCIPALES FACTORES DE VIRULENCIA

La neumolisina (Ply): Es una toxina citotóxica y proapoptótica importante en la virulencia de *S. pneumoniae* que tiene la capacidad de formar poros en las membranas celulares, esta es liberada mediante la lisis celular. Además de la lisis celular esta toxina induce la inflamación, promueve la formación de biopelículas, reduce el moco y puede interferir con el sistema inmune del hospedero mediante la regulación del sistema del complemento y reducción de la fagocitosis por las células inmunes [16].

Autolisina (LytA): Esta enzima es responsable de la autólisis bacteriana al digerir la pared celular, actúa como mediadora en el desprendimiento de la cápsula en la invasión celular y promueve la colonización de las células de la nasofaringe por medio de la liberación de la neumolisina, los ácidos teóicos y otros componentes provenientes de la célula [24].

Proteínas superficiales: *S. pneumoniae* posee varias proteínas en su superficie que ayudan en la patogénesis al actuar como adhesinas en las células del huésped además de evadir la respuesta inmune del hospedero especialmente la respuesta del complemento.

Pili: Estas estructuras localizadas en la superficie de la bacteria asisten en el ataque y la colonización de las células epiteliales, la nasofaringe y los pulmones del hospedero, también ayuda a evitar la fagocitosis, además es muy importante para la transferencia horizontal de genes (conjugación) [26].

Inmunoglobulina A1 proteasa: Esta enzima actúa al fragmentar la IgA humana reduciendo la unión de la región efectora de la IgA en la cadena pesada, obstaculizando la muerte de la bacteria por estos anticuerpos.

Peróxido de hidrógeno: *S. pneumoniae* secreta peróxido de hidrógeno (H₂O₂) que genera afectaciones en el ADN hospedero, esto solamente se observa en las cepas que presentan actividad de piruvato oxidasa mediada por el gen (SpxB), la producción de H₂O₂ también tiene efectos bactericidas que *S. pneumoniae* utiliza para reducir el crecimiento competitivo de otras bacterias [16].

Biopelículas: Estas son estructuras comunitarias que consisten en agregados celulares rodeados por una matriz extracelular de polisacáridos que se adhieren a las superficies y brindan protección, capacidad de evadir la respuesta inmune y el aclaramiento mucociliar, aumentando la virulencia de *S. pneumoniae*. Además, por el contacto cercano de las bacterias dentro de las biopelículas los rangos de la transferencia horizontal de genes aumentan. Se ha reportado que los tratamientos antimicrobianos no logran eliminar efectivamente las biopelículas de *S. pneumoniae* debido al incremento de resistencia [16] [24] (Figura No 1).

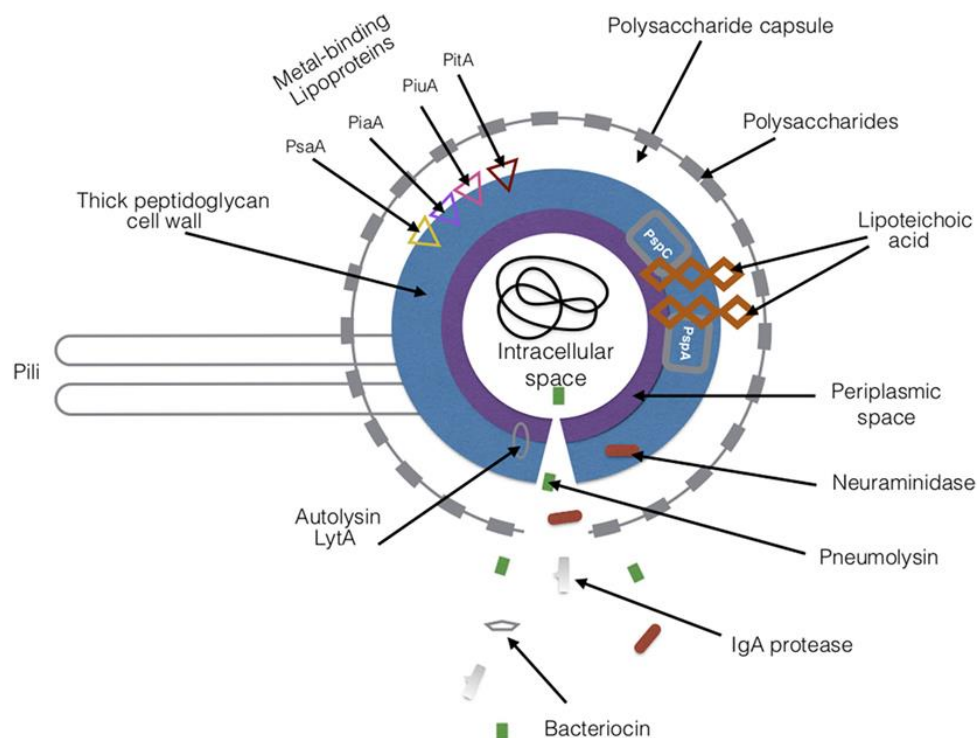


Figura 1. Principales Factores de virulencia de *S. pneumoniae*. PsaA, Adhesina A de la superficie del neumococo; PspA, Proteína superficial del neumococo; PspC, Proteína C superficial del neumococo; PiaA, adquisición de hierro A del neumococo; PitA, transportador de hierro del neumococo. [16]

4. IDENTIFICACIÓN

La identificación de *S. pneumoniae* se realiza por medio de su morfología macroscópica y microscópica, condiciones de cultivo, coloración de Gram, susceptibilidad a la optoquina y solubilidad en bilis.

4.1 Morfología

S. pneumoniae es un diplococo encapsulado, lanceolado, que frecuentemente se presenta en cadenas rectas y cortas. En agar tiene el aspecto de colonias pequeñas, grisáceas y mucosas/mucoides, las colonias están rodeadas de una zona verde de hemólisis α en agar sangre. Las colonias jóvenes son abultadas, pero después de 24-48 horas las colonias se achatan y puede formarse una depresión en el centro en cada una. El aspecto mucoso dependerá de cuán fresco sea el medio y de la atmósfera de incubación, entre más fresco el medio, más mucoides parecerán los cultivos. Algunos serotipos, como el tres tienen un aspecto muy mucoso [21].

4.2 Condiciones de cultivo

S. pneumoniae es un microorganismo fastidioso a la hora de ser cultivado, por lo que requiere de medios enriquecidos para su aislamiento primario; tales como agar tripticosa soya, o agar infusión cerebro-corazón, enriquecidos con sangre ovina, sangre de caballo o sangre de conejo. Para obtener un correcto crecimiento de *S. pneumoniae* se requiere que los medios utilizados contengan aminoácidos, péptidos, purinas, pirimidinas y vitaminas, suplementos que se encuentran en las bases comerciales que contienen extracto de carne. Existen numerosas bases comerciales que pueden ser usadas para preparar los medios enriquecidos con sangre, las más cotidianas son; Columbia y tripticosa soya. Paralelamente existen caldos de cultivo que favorecen la buena recuperación de *S. pneumoniae*, como el caldo Todd Hewitt, y la infusión de cerebro-corazón (BHI) y caldo enriquecido con tioglicolato. Para el óptimo crecimiento en medios líquidos, es importante que los medios sean suplementados con carbohidratos fermentables [21].

4.3 Condiciones atmosféricas:

S. pneumoniae es anaerobio facultativo; La mayoría de los aislamientos presentan un crecimiento relativamente bueno, pero ocasionalmente se observan colonias pequeñas. Algunos aislamientos son dependientes de CO_2 (5-7%), esta atmósfera favorece su crecimiento, cuando se cultiva en forma aeróbica acumula gran cantidad de H_2O_2 . El rango de temperatura a la cual se debe incubar es de 30 a 36° C [21].

4.4 Tinción de Gram

La coloración de Gram de la colonia permite observar la morfología microscópica, en el caso de *S. pneumoniae* tiene una tinción púrpura debido a que es Gram positivo y revela una morfología de diplococo lanceolado frecuentemente en disposición de cadenas cortas.

4.5 Susceptibilidad a la optoquina

La optoquina (hidrocloruro de etilhidrocupreína), es un compuesto al cual *S. pneumoniae* es susceptible en bajas cantidades (5 μg o menores) y por lo tanto inhibe su crecimiento. La optoquina puede inhibir el crecimiento de otros *Streptococcus* α hemolíticos, pero en concentraciones altas; es soluble en agua y se difunde rápidamente en el medio, por lo tanto, discos de papel filtro de 6mm impregnados con optoquina son colocados directamente sobre la superficie del agar para la realización de la prueba.

Las células de *S. pneumoniae* alrededor del disco son lisadas debido a cambios de tensión en la superficie, produciéndose una zona o halo de inhibición. Para la prueba el químico (optoquina) es incorporado a discos de papel de 6mm, con una cantidad de 5 μg . Los discos se encuentran

comercialmente en BBL (Taxo P), Difco (231554) (discos para diferenciación de optoquina). El disco es colocado sobre una placa de agar sangre ovina al 5%, la cual ha sido inoculada a partir de una colonia del aislamiento a investigar. Después de 18-24 horas de incubación a 35° C en ambiente CO₂ (5-7%), la caja es examinada para observar la inhibición del crecimiento alrededor del disco. Zonas de inhibición mayores o iguales a 14mm son interpretados como susceptibles, lo que permite realizar una identificación presuntiva del aislamiento como *S. pneumoniae*.

Algunos aislamientos presentan zonas de inhibición dudosas o cuestionables (entre 6 y 14mm), en esos casos se debe realizar como prueba confirmatoria la solubilidad en bilis; de esta manera se descartan las especies α hemolíticas que presentan zonas intermedias de inhibición [21].

4.6 Solubilidad en bilis

Las sales de bilis específicamente el desoxicolato y el taurocolato de sodio tienen la capacidad de lisar *S. pneumoniae*, cuando en solución se adicionan a una suspensión de microorganismos (suspensión realizada a partir de un cultivo fresco de *S. pneumoniae* de 18 a 24 horas en agar sangre ovina al 5%). *S. pneumoniae* produce enzimas autolíticas que son las responsables de la característica forma umbilicada de la colonia en cultivos viejos. La adición de la solución de sales de bilis a la suspensión de la bacteria acelera el proceso de lisis; proceso asociado con la disminución de la tensión superficial entre el medio y la membrana celular bacteriana.

La prueba de solubilidad de bilis se puede realizar a partir de cultivos en caldo o en agar sangre ovina al 5%. Dado que la solución de desoxicolato de sodio puede precipitarse a pH de 6.5 o menor, cuando se realiza la prueba de solubilidad en bilis a partir de cultivos en caldo, el medio debe alcalinizarse para evitar una reacción falsa negativa [21].

5. SEROTIPIFICACIÓN

S. pneumoniae es un patógeno capaz de producir diversas cápsulas de polisacáridos con diferentes estructuras, esta cápsula es esencial en su patogenicidad. En la actualidad se han reportado 100 serotipos capsulares, siendo el último reportado en el año 2020 [25]. Debido a estas diferencias en las estructuras y componentes capsulares podemos caracterizar las variantes del neumococo.

La serotipificación es una herramienta para entender la epidemiología y caracterizar las diferentes variedades del neumococo gracias a las diferencias estructurales y los diferentes componentes de su cápsula. La técnica empleada para la serotipificación es denominada la reacción de Neufeld-Quellung, la cual consiste en una reacción de antígeno anticuerpo, este es el método estándar de oro para la tipificación capsular del neumococo, el análisis se realiza a partir de una suspensión celular del neumococo con una mezcla de sueros polivalentes o antisueros que reacciona con el polisacárido capsular haciendo evidente la cápsula cuando es observada en el microscopio.

La reacción de Neufeld-Quellung fue descrita en 1902 por Neufeld, esta técnica se compone de tres pasos principales, la preparación de la suspensión bacteriana, la mezcla de las células y el antisuero en una laminilla y la lectura de la reacción en el microscopio. Los antisueros están compuestos por diferentes mezclas de sueros que presentan antígenos afines ante 91 serotipos la técnica puede ser usada una vez que los aislamientos son identificados como neumococos

son examinados inicialmente con la mezcla de los sueros, posteriormente son examinados con el antisuero específico del tipo y grupo [23].

6. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Los antibióticos se definen como cualquier compuesto químico utilizado para eliminar o inhibir el crecimiento de microorganismos bacterianos infecciosos, estos pueden clasificarse según; su estructura química, la reversibilidad de su efecto, toxicidad, el espectro de acción, tipo de resistencia, mecanismo de acción, entre otros (Tabla 1).

Una de las características más importantes es el efecto que ejerce sobre el microorganismo, los antibióticos bacteriostáticos son aquellos que, al alcanzar la concentración adecuada en el organismo, inhiben el crecimiento, pero el microorganismo sigue viable y cuando se retira el antimicrobiano se reinicia su multiplicación. Los antibióticos bactericidas son los que poseen un efecto irreversible en el microorganismo, ejerciendo una acción letal sobre estos [27,28].

Tabla No. 1: Principales grupos de antibióticos según su mecanismo de acción		
Mecanismo de acción	Grupo de antibióticos	Ejemplos
Inhibición de la síntesis de pared celular	-Betalactámicos	-Penicilina -Cefalosporina
Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos	-Sulfamidas -Quinolonas	-Sulfametazol -Ciprofloxacina
Inhibición de la síntesis de proteínas	-Aminoglucósidos -Cloranfenicol -Macrólidos -Tetraciclinas	-Gentamicina -Tianfenicol -Eritromicina -Tetraciclina

La resistencia a antibióticos se define como la habilidad que desarrollan los gérmenes al combatir a los antibióticos que tienen como objetivo eliminarlos, ocurre debido a múltiples razones como; presión selectiva, presión competitiva, transferencia horizontal de genes y/o la adquisición de material genético exógeno por endocitosis de otras cepas, todo esto derivando del uso sin regulaciones de antibióticos [27].

S. pneumoniae es un patógeno que en 1978 fue denominado multirresistente (MDR) a los antibióticos por su resistencia a penicilinas, macrólidos y tetraciclinas para ese año, y en años más recientes algunas cepas llegan a presentar resistencia extendida (XDR) (resistencia a casi todos los grupos de antibióticos menos a uno), presentando resistencia en el 2012 a levofloxacina y cefalosporina.

Los mecanismos de resistencia surgen por diversas causas, las bacterias compiten por la supervivencia, esto y el mal empleo de los antimicrobianos impulsa la aparición de estos mecanismos, para cada grupo de los antibióticos más comunes en el tratamiento de infecciones existe al menos un mecanismo de resistencia por parte de las bacterias, según el tipo y el sitio de acción, surge el mecanismo de resistencia específico, aunque algunos mecanismos de resistencia para un tipo de antibiótico pueden interferir con la acción de otro o más grupo de antibióticos.

Los mecanismos de resistencia observados en *S. pneumoniae* se dividen en 3 tipos:

- a) Modificación del sitio blanco: Son modificaciones que ocurren en el sitio de acción del antibiótico deteniendo su efecto sobre la bacteria.
- b) Permeabilidad de la membrana plasmática: Este mecanismo consta de la modificación de la afinidad de la membrana por ciertas moléculas, esto puede ocurrir mediante la reducción de proteínas presentes en la membrana.
- c) Bombas de eflujo: Estas bombas, son proteínas membranales que reconocen al antibiótico y lo expulsan fuera del medio celular, impidiendo su acumulación.

6.1 Resistencia a β -lactámicos (Penicilinas y Cefalosporinas):

Las penicilinas y Cefalosporinas pertenecen al grupo de los β -lactámicos, estos antimicrobianos tienen su acción en la pared celular, funcionan inhibiendo la biosíntesis de esta durante el crecimiento y división celular, mediante la obstaculización de algún proceso en la síntesis de peptidoglucano, el componente de la pared celular.

Los principales mecanismos de resistencia a este grupo de antimicrobianos son: La permeabilidad de la membrana mediante la reducción de porinas y la modificación del antibiótico por enzimas llamadas β -lactamasas.

6.2 Resistencia a Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina y Levofloxacina):

Las fluoroquinolonas son antimicrobianas que actúan inhibiendo la síntesis de DNA y RNA en el núcleo, esto ocurre mediante la inhibición de las topoisomerasas, estas enzimas actúan en la liberación de la tensión en las hebras durante la síntesis de estas moléculas.

Los principales mecanismos de resistencia en las fluoroquinolonas son: La modificación del sitio blanco mediante cambios en la afinidad del sitio de acción, permeabilidad de la membrana, al igual que los betalactámicos, la reducción de porinas afecta a este grupo de antimicrobianos también y bombas de eflujo.

6.3 Resistencia a Macrólidos (Eritromicina):

Los macrólidos son antimicrobianos que se internalizan en la células por medio de difusión pasiva gracias a su naturaleza lipofílica por medio de transportes activos dependientes de calcio, actúan inhibiendo la síntesis de proteínas dependientes de RNA de la bacteria, estos actúan en la traducción, en los diferentes momentos de esta según en la fase que se encuentre, los macrólidos comúnmente actúan en la elongación inhibiendo la translocación del péptido en la subunidad ribosomal 50S, en el rRNA 23S [28]. (Figura No. 2).

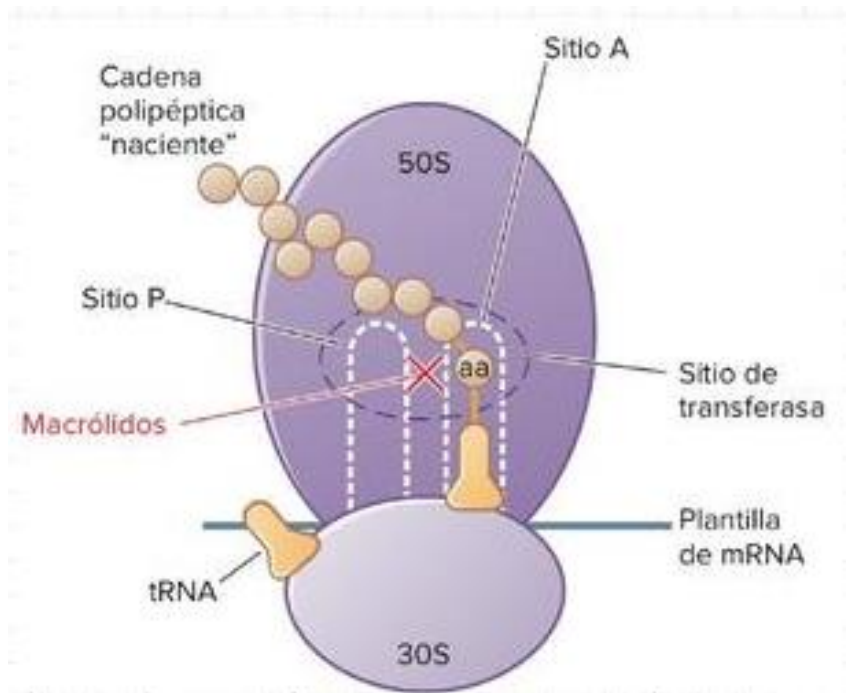


Figura 2. Mecanismo de acción de la eritromicina, este macrólido actúa en la elongación situándose en el rRNA 23S en la subunidad ribosomal 50S impidiendo la translocación. Imagen extraída de: es.slideshare.net/alekseyqa/macrolidos-41835430

En 1990 la eritromicina fue usada ampliamente en consecuencia de las ya presentes cepas resistentes a la penicilina, también a los pacientes alérgicos a esta. Sin embargo, desafortunadamente la resistencia a macrólidos en *S. pneumoniae* ha evolucionado muy rápido, incluso sobrepasando los niveles de resistencia de la penicilina [8].

La eritromicina es un macrólido de origen natural, de primera generación. Que pertenece al grupo de antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas, posee 14 átomos carbonos/anillos lactónicos, (Figura No 3), tiene efecto bacteriostático ya que actúa en la fase de elongación de la traducción, la eritromicina inhibe la translocación de la cadena de aminoácidos en formación, e indirectamente inhibe también la transpeptidación, el sitio de acción está ubicado subunidad ribosomal 50S en el rARN 23S.

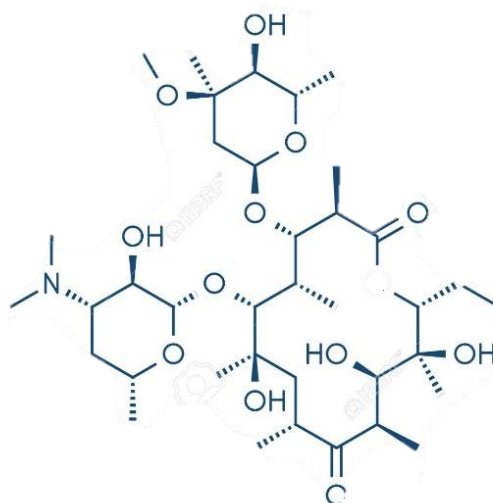


Figura 3. Estructura química de la eritromicina. Imagen extraída de: es.123rf.com/photo_91297601_medimento-antibiotico-eritromicina-clase-macrolido-estructura-quimica-formula-esquematica.html

Su espectro de acción se concentra en los cocos, bacilos y algunos Gram negativos, principalmente se utiliza este antibiótico para tratar infecciones en piel, mucosas e infecciones respiratorias, usado como primera opción cuando se presenta alergia a la penicilina [28].

La eritromicina fue descubierta en 1952, este es un macrólido producido por *Saccharopolyspora erythraeus* comúnmente conocido como *Streptomyces erythraeus* [29].

La resistencia a macrólidos en *S. pneumoniae* se debe principalmente a dos mecanismos de resistencia; la modificación del sitio blanco; ocurre por una di- metilación en el rRNA 23S específicamente en el residuo de adenina (A20580) en la subunidad ribosomal larga 50S por una enzima codificada por el gen *erm* (Erythromycin ribosomal methylase), brindando una resistencia cruzada a macrólidos lincomsamidas y estreptograminas B. El segundo mecanismo funciona mediante una bomba de eflujo, que es codificada por el gen *mef* (Macrolide efflux pump), este último mecanismo solo brinda resistencia a macrólidos con 14 y 15 anillos macrocíclicos, Además, otros mecanismos menos comunes son mutaciones en los genes L4, L22, y/o el rRNA 23S que reducen la afinidad de la eritromicina. [29,30].

Las cepas que portan el gen de resistencia *erm* se les denomina portadores del fenotipo MLSb, (que significa que son resistentes a macrólidos, lincosamidas y estreptomycinas) y las cepas que contienen el gen de resistencia *mef* se les denomina portadores del fenotipo M (que brinda resistencia a macrólidos y susceptibilidad a lincosamidas y estreptomycinas B). También existen cepas que son portadoras de ambos genes de resistencia *erm* y *mef*. [31].

7. VACUNAS

Las vacunas contra el neumococo están diseñadas para inducir la producción de anticuerpos específicos capaces de reconocer la cápsula de polisacáridos de los serotipos más comunes causantes de enfermedades, los anticuerpos proveen protección solamente contra los neumococos con las cápsulas diana de la vacuna. [25,9]. A través del tiempo han surgido múltiples vacunas que han sido implementadas en las diferentes estrategias de vacunación de las regiones del mundo, esto tuvo como resultado una considerable disminución en la incidencia de las infecciones invasivas causadas por este patógeno.

Las vacunas neumocócicas polisacáridas fueron las primeras vacunas para brindar protección contra el neumococo, estas vacunas incluyen polisacáridos capsulares purificados de *S. pneumoniae* que inducen una respuesta inmune activa, vacuna polisacárida 23 Valente (PPSV23), contiene los serotipos (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F, Y 33F). Actualmente esta vacuna es aprobada y recomendada para personas de 50 años en adelante y a niños mayores de 2 años los cuales tienen un riesgo mayor para adquirir infecciones neumocócicas. [32,33].

Las vacunas neumocócicas conjugadas (PCVs) son vacunas que se conforman por los antígenos de la capsula de polisacáridos de los serotipos más importantes en la salud pública, estos antígenos capsulares están conjugados con proteínas antigénicas como la CRM197 de la difteria, que son reconocidas fácilmente por el sistema inmune [34].

Antes de la introducción de las PCVs, en los países menos desarrollados de las 8.8 millones de muertes anuales en niños menores de 5 años en el 2008 cerca de la mitad de las muertes fueron causadas por infecciones neumocócicas. En países desarrollados el reporte de incidencias en niños menores de 5 años antes de la implementación de las PCVs ha variado en rangos de entre 17.1 a 94.7 casos /1000 con las mayores incidencias en Norte América y las menores en los países europeos [35].

Las vacunas conjugadas del neumococo han estado disponibles desde hace algunas décadas en varias regiones del mundo, pero desde el año 2000 fueron implementadas en muchos programas de inmunización de diferentes países para infantes y niños pequeños. Las PCVs disponibles actualmente son seguras y eficaces y la OMS recomienda su uso en programas de inmunización infantil de todo el mundo, en muchos países el uso rutinario de las PCVs ha logrado reducir drásticamente la incidencia de enfermedades graves causadas por los serotipos implementados en las vacunas [36].

Vacunas Conjugadas de Neumococo

PCV7	Pfizer/Wyeth (2000)	4	6B	9V	14	18C	19F	23F
-------------	---------------------	---	----	----	----	-----	-----	-----

PCV10	GSK (2010)	4	6B	9V	14	18C	19F	23F	1	5	7F
--------------	------------	---	----	----	----	-----	-----	-----	---	---	----

PCV13	Pfizer (2011)	4	6B	9V	14	18C	19F	23F	1	5	7F	3	6A	19A
--------------	---------------	---	----	----	----	-----	-----	-----	---	---	----	---	----	-----

Streptococcus pneumoniae serotipo 19A

Desde 1993 debido a la importancia que empezaban a tomar las neumonías y meningitis bacterianas adquiridas en la comunidad, la OPS implemento un programa, la red SIREVA que provee información sobre los datos de distribución de serotipos y susceptibilidad de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *N. meningitidis* a los antibióticos, así como información epidemiológica para la estimación de la carga de estas enfermedades para la formulación de vacunas cada vez más eficientes.

Este programa tiene varios objetivos, el principal es el producir una red con datos de calidad junto con biológicos almacenados para mantener una relación estrecha con los laboratorios de salud entre los países que pertenecen a la red, logrando con esto orientar a las autoridades nacionales en la toma de decisiones para mejorar el impacto de las intervenciones vacunales.

Entre el 2010 y el 2015 la red SIREVA reporto que de 6307 casos de enfermedades neumocócicas invasivas 742 (11.8%) fueron del serotipo 19A. Otros datos no provenientes de la red SIREVA reportaron 768 aislamientos de enfermedades neumocócicas invasivas de las cuales 41 (5.3%) fueron del serotipo 19A si se suman estos reportes un total de 7075 aislamientos de enfermedades neumocócicas invasivas de los cuales 783 (11.1%) son del serotipo 19A. No se encontraron diferencias en la prevalencia de *S. pneumoniae* 19A en los datos de la red SIREVA y entre los no provenientes de dicha red [37].

El serotipo 19A es responsable de la prevalencia de enfermedades neumocócicas invasivas en la población pediátrica principalmente en los menores de 5 años, se encontró una tendencia a través del tiempo desde el 2008 con 0% al 2017 con un 33%. Mientras que en los menores de 18 años la tendencia fue de 0% a 36% en el mismo periodo. En este estudio realizado en Bogotá, se analizaron 463 muestras invasivas de enfermedades neumocócicas de las cuales 17.7% (56/463), el diagnóstico más frecuente fue neumonía (80%) [38].

Recientemente en el 2018 la OPS denominó al serotipo 19A como el más frecuente agente causal de neumonía bacteriana y meningitis en niños menores de 5 años según los datos recopilados por la red SIREVA [39] (Tabla No 2).

País	Instituto o laboratorio encargado de la Región	No. aislamientos <u><i>S.pneumoniae</i></u>	Serotipo 19A	%
Argentina	Instituto Nacional de enfermedades Infecciosas (ANLIS)	139	9	6.5%
Bolivia	Laboratorio de Referencia Nacional en Bacteriología Clínica del Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (INLASA)	31	7	22.6%
Brasil	Meningites, Pneumonias e Infecções Pneumocócicas (NMPI) del Centro de Bacteriología, Instituto Adolfo Lutz (IAL)	174	70	40.2%

Chile	Instituto de Salud Pública, Santiago de Chile	118	26	22.0%
Colombia	Instituto Nacional de Salud de Bogotá	135	68	50.4%
Costa Rica	Centro Nacional de Referencia de Bacteriología - INCIENSA, San José	7	1	14.3%
Cuba	Instituto de Medicina Tropical, Pedro Kourí (IPK), Habana	65	14	21,5%
Ecuador	Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública "Leopoldo Izquieta Pérez" Guayaquil	38	26	68.4%
México	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE)	6	3	33.3%
Panamá	Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES), Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública (LCRSP), Ciudad de Panamá	11	3	27.3%
<u>Paraguay</u>	Laboratorio de Referencia Nacional: Laboratorio Central de Salud Pública, Asunción	98	25	25.5%
Perú	Laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas (IRA), Instituto Nacional de Salud, Lima	23	9	39.1%
República Dominicana	Hospital Infantil Dr. Robert Reid Cabral, Santo Domingo	9	2	22.2%
Uruguay	Departamento de Laboratorios, Ministerio de Salud Pública, Montevideo	27	1	3.7%

Datos obtenidos y seleccionados del informe regional reportado por la red SIREVA II. [39]

En el 2019 en México se recolectaron 214 muestras de las cuales el (21%) 45/214 fueron serotipo 19A. Su presencia aumento en la mayoría de los grupos de edad. El serotipo 19A sigue siendo el mayor causante de enfermedad en los menores de 5 años al igual que en los grupos ≥ 5 a 49 y 50 a ≥ 60 años. A pesar de que los casos de meningitis bajaron en consecuencia de la cobertura con la vacuna, el serotipo 19A sigue presente a pesar de las PCVs, este serotipo presenta un importante riesgo porque es el más común generador de enfermedades infecciosas y si no se controla su presencia puede que en los años siguientes vuelva a aumentar los casos de meningitis y de otras enfermedades invasivas [40].

Actualmente con el análisis de los datos obtenidos por la red SIREVA, posterior a la implementación de la PCV13, se ha detectado el fenómeno de remplazamiento de serotipos, principalmente se debe a la propagación de los serotipos no vacunales como: el 24F, 6C, 12F, 23B, 15B y algunos otros. Esto indica que existe una gran necesidad de formar y mantener un sistema de vigilancia que permita mantener el control del comportamiento de *S. pneumoniae* en el constante cambio ambiental. Por esto mismo se están desarrollando vacunas conjugadas de

nueva generación, la PCV15 que agrega los serotipos 22F y 33F a la PCV13 y la PCV20 que agrega los serotipos 8, 10A, 11A, 12F y 33F respectivamente con esto se prevé una reducción en la aparición de las infecciones neumocócicas a corto y mediano plazo [39].

8. JUSTIFICACIÓN

Actualmente *S. pneumoniae* es el agente responsable de la mayoría de las neumonías bacterianas alrededor del mundo, siendo el serotipo 19A una causa prevalente de infecciones invasivas y no invasivas principalmente en los niños menores de 5 años y adultos mayores, esto aunado a su multirresistencia ante los antibióticos.

En México existe una vigilancia epidemiológica, sin embargo, la identificación y el análisis de la resistencia a eritromicina de *S. pneumoniae* serotipo 19A no ha sido reportada, es por eso que resulta importante analizar la resistencia a través del fenotipo (M/MLSb) y genotipo (*mefA* y *ermB*) en las muestras recolectadas por la red GIVEPBVac.

La implementación de la vacunación con la PCV13 en nuestro país ha disminuído la incidencia de enfermedades invasivas y no invasivas de los serotipos incluidos en esta incluyendo al serotipo 19A, sin embargo, a pesar de que la vacuna ha sido efectiva al disminuir el número de casos, estos se siguen reportando y con mayor resistencia a eritromicina.

La identificación de la resistencia a eritromicina en cepas de *S. pneumoniae* serotipo 19A, así como la de los principales fenotipos (M/MLSb) y genotipos (*mefA* y *ermB*) que confieren dicha resistencia resulta importante para identificación y emergencia de nuevas cepas con alta resistencia a eritromicina que circulan en nuestra población

La vigilancia de la resistencia de *S. pneumoniae* es una estrategia importante para el control y el uso adecuado de antimicrobianos, ya que en la actualidad cada año aumenta considerablemente la resistencia a eritromicina, una vigilancia constante se genera la información necesaria para la toma de decisiones.

9. HIPÓTESIS

El incremento de la resistencia a eritromicina en cepas de *S. pneumoniae* serotipo 19A, así como de sus fenotipos (M/MLSb) y genes (*mefA* y *ermB*) que la confieren mostrarán diferencias posteriores al periodo de vacunación con la vacuna PCV13.

10. OBJETIVOS

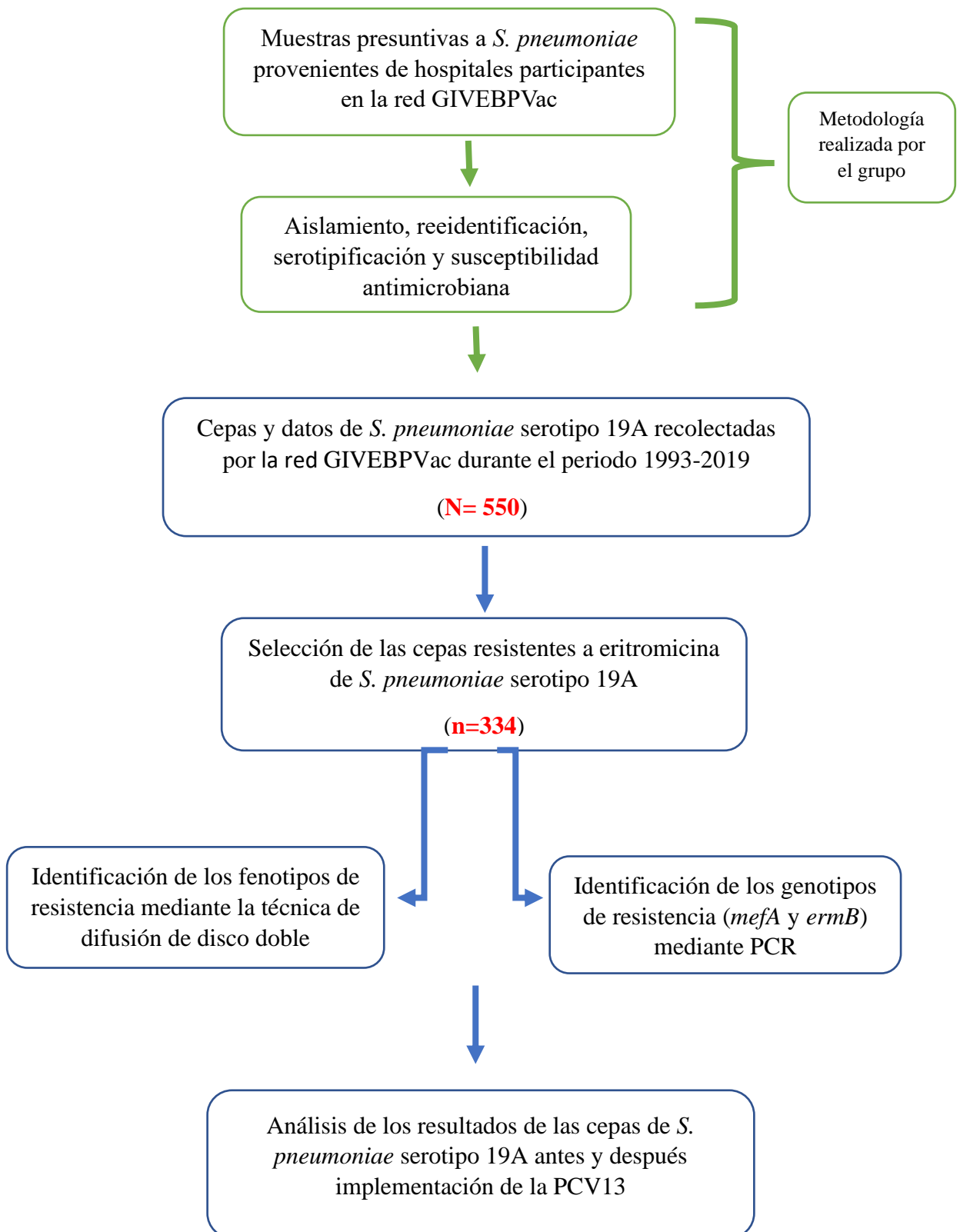
OBJETIVO GENERAL

Analizar las características de resistencia en las cepas de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19A resistentes a eritromicina posterior a la vacuna PCV13 en México.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Detectar el fenotipo de resistencia (M/MLSb) a eritromicina en cepas de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19A en el periodo pre y post vacunal con la vacuna PCV13.
- 2.- Detectar los genes (*mefA* y *ermB*) que confieren resistencia a la eritromicina en cepas de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19A en el periodo pre y post vacunal con la vacuna PCV13.

METODOLOGÍA DIAGRAMA EXPERIMENTAL



11. METODOLOGÍA

Se analizaron **334** cepas *S. pneumoniae* serotipo 19A resistentes a eritromicina, provenientes de hospitales que forman parte de la red GIVEBPVac (Grupo Internacional para Vigilancia de Enfermedades bacterianas Prevenibles por Vacunación) (Tabla No. 3), dichas muestras fueron obtenidas durante el periodo (1993-2019) en la Subdirección de Prevención y Vigilancia en Enfermedades Infecciosas del Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) en el Instituto Nacional de Salud Pública

Tabla No. 3: Hospitales pertenecientes a la red GIVEBPVac

ESTADO	HOSPITALES
C. de México	Hospital de Cardiología Ignacio Chávez (H. card)
C. de México	Instituto Nacional de Pediatría (INP)
C. de México	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica
C. de México	Hospital Infantil de México Federico Gómez. (HIM)
C. de México	Instituto Nacional de Cancerología. (INCan)
C. de México	Instituto Nacional de Ciencias Médicas de la Nutrición. (INCMN)
C. de México	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. (INER)
C. de México	Centro Médico Nacional. (CMN)
Morelia	Hospital Infantil de Morelia (H. Morelia)
Veracruz	Hospital Regional de Veracruz (H. Ver)
Tabasco	Hospital del Niño “Dr. Roberto Nieto Padrón VHSA Tabasco. (HNTab)
Aguascalientes	Hospital de Especialidades Miguel Hidalgo Aguascalientes. (HEAgs)
Oaxaca	Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca (HREOax)
Estado de México	Hospital Regional de Alta especialidad de Ixtapaluca. (HRAIxt)
Estado de México	Hospital Para el Niño de Toluca. (HNEM)
Guanajuato	Hospital General de León Guanajuato. (HMLIG)
Morelos	Hospital del niño Morelense. (HNM)
Puebla	Hospital del Niño Poblano. (HNP)
Monterrey	Hospital universitario “José Eleuterio GSS” UALN. (H.Mont)
Monterrey	Hospital San José Tec de Monterrey. (H.Mont)
Yucatán	Hospital General Agustín O’Horan. (HGY)

Guadalajara	Hospital Civil de Guadalajara. (HIG)
Sonora	Hospital Infantil de Sonora. (HIS)
Chiapas	Hospitalidad de Especiales Pediátrica. (HEPChis)
San Luis Potosí	Hospital General de Dr. Ignacio Morones Prieto. (HSLP)
Durango	Hospital General de Durango. (HGD)
Hidalgo	Hospital del niño DIF Hidalgo. (HNDHgo)

Cultivo e identificación de las cepas de *S. pneumoniae*

Las muestras de *S. pneumoniae* analizadas forman parte de un cepario, las cuales fueron inoculadas en agar Columbia enriquecido con 5% de sangre ovina, se incubaron de 18 a 24 horas a 37°C con 5% de CO₂. La identificación fue realizada empleando los métodos convencionales (tinción de Gram, susceptibilidad a la optoquina y solubilidad en bilis). La tipificación se realizó por el método de Quellung y la susceptibilidad antimicrobiana por el método de microdilución según los criterios del CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute por sus siglas en inglés) 2019.

Prueba de susceptibilidad a optoquina

La prueba de susceptibilidad a la optoquina es el método estándar para la identificación del neumococo, se inoculó de manera masiva una placa de agar Mueller Hinton enriquecida al 5% con sangre de carnero con una solución bacteria previamente preparada con el estándar McFarland y se colocó un disco impregnado con 5µg optoquina y se incubó de 18-24hrs en una atmósfera a 5% de CO₂ a una temperatura de 36°C. Posterior a la incubación se leyeron los resultados midiendo el halo de inhibición, los halos mayores a 14mm es confirmado sensible y se identifica como neumococo.

Prueba de solubilidad en bilis

La técnica de solubilidad en bilis es la prueba confirmatoria para la identificación del neumococo. Se utilizan dos tubos por muestra uno de control y otro de prueba. En el tubo control se le colocó 1ml de medio BHI mientras el tubo de prueba solo 0.5ml, para ambos tubos se les coloca la misma cantidad de bacteria con el asa bacteriológica y posteriormente se agrega al tubo de prueba 0.5ml de solución preparada con desoxicolato sódico concentrado al 10%. Se incuban a 36° por 15 minutos después de este tiempo se observan los resultados, si el tubo de prueba se ve claro (la muestra se lisó), se considera un neumococo.

Para la identificación de los fenotipos y genotipos se realizó una selección de las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 19A resistentes a eritromicina recibidas en el laboratorio durante el periodo de estudio, las cuales se descongelaron y se realizó la técnica de difusión de doble disco (D test) para la identificación del fenotipo y la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para la identificación de los genotipos.

11.1 PRUEBA DIFUSION DE DOBLE DISCO

La prueba de difusión de doble disco consiste en la determinación del fenotipo de resistencia de una cepa mediante el uso de discos de eritromicina (15µg) y clindamicina (2µg), el fenotipo es determinado por las características morfológicas del halo de inhibición, el fenotipo de resistencia MLSb consiste en la ausencia del halo de inhibición en ambos discos, indicando resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas b. El fenotipo de resistencia M es representado por la presencia por un halo de inhibición en el disco de clindamicina, esto indica resistencia a macrólidos [41,29].

Las cepas seleccionadas se descongelaron y se inoculación en agar Columbia suplementada con sangre de carnero y se incubaron por 18/24hrs, a partir del subcultivo puro, se preparó una suspensión densa del microorganismo en solución salina estéril al 0.8% hasta llegar a una turbidez de 0.5 Mc Farland para inocular en placa de agar Muller Hinton suplementado con 5% de sangre de carnero, la concentración del estándar Mc Farland es de 0.5×10^{-8} UFC, esta concentración es la establecida por el CLSI para esta prueba. [41]. Posteriormente se colocaron los discos de eritromicina con 15µg y clindamicina con 2µg, estos se colocan de manera centrada en la caja con una distancia de 4cm aproximadamente. Se incubó de 18 a 24hrs en una atmósfera a 5% de CO₂ con una temperatura óptima de 36°C.

Después de haber incubado las muestras por 18-24 horas se registraron los halos de inhibición, la ausencia de una zona de inhibición alrededor de ambos discos indica resistencia constitutiva (fenotipo cMLSb): El embotamiento en la zona de inhibición de la clindamicina cerca del disco de eritromicina indica resistencia inducible (fenotipo iMLSb); la susceptibilidad a clindamicina sin embotamiento de la zona de inhibición alrededor del disco de clindamicina indica el fenotipo M. La interpretación de los resultados consiste en la lectura del diámetro del halo de inhibición en los discos de la prueba Kirby Bauer, se interpreta como sensible los valores ≥ 21 mm, valores de entre 16 -20mm se interpretan como resistencia intermedia y los valores ≤ 15 mm son interpretados como resistentes según los criterios del CLSI, 2020.

Los controles usados para la identificación del fenotipo, así como el control negativo fueron, la cepa *S. pneumoniae* Tennessee 23F como control positivo para el fenotipo (M), como control positivo para el fenotipo (MLSb) se utilizó la cepa de *S. pneumoniae* Finland 6B y para el control negativo se utilizó la cepa control de *S. pneumoniae* (ATCC 49619).

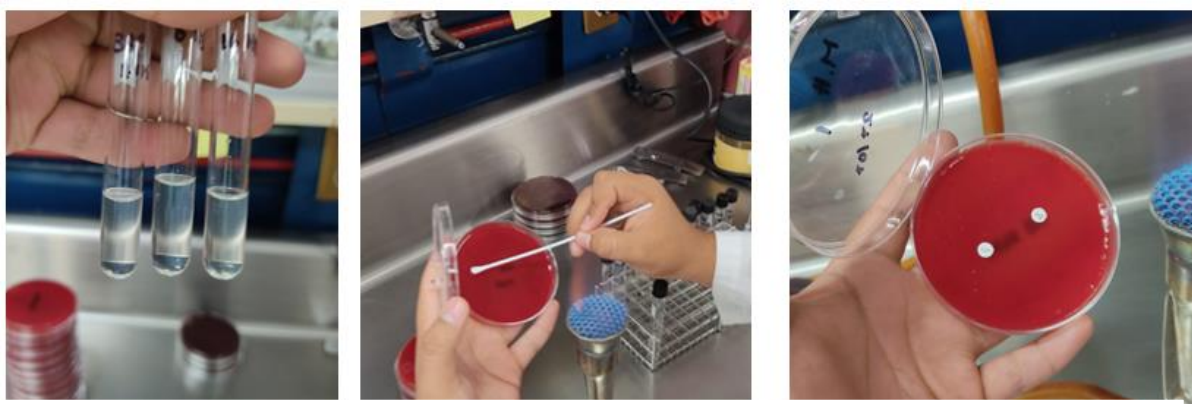


Figura 4. Protocolo Kirby-Bauer, prueba de difusión de doble disco, izquierda concentración estándar de Mc Farland (0.5), Imagen central, Inoculación en placa de Muller Hinton al 5% con sangre de carnero y en derecha colocación de los discos de clindamicina (2µg) y eritromicina (15µg).

11.2 PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

La PCR es una técnica biotecnológica que consiste en amplificar una región específica de DNA miles de veces, sirve para identificar genes de interés de una muestra a analizar usando controles positivos y negativos además del marcador de peso molecular, esta funciona usando una polimerasa que permanece activa ante altas temperaturas, esta es capaz de amplificar un fragmento en miles usando primers específicos [42].

Esta técnica permite amplificar pequeñas cantidades de DNA entre cientos de miles y millones de veces. La PCR consta de 3 etapas, la primer etapa es la desnaturalización, en esta etapa se separan las hebras del DNA a una temperatura de entre 92°C a 95°C durante 30s, la segunda fase es el annealing o hibridamiento, en esta etapa los primers se unen a la cadena, la temperatura varía según la concentración de Gs y Cs durante 30s pero la temperatura óptima es de 55°C a 60°C, la última etapa es la extensión o polimerización y es cuando la polimerasa empieza a correr polimerizando la hebra hija a base del templado, la temperatura óptima es de 72°C con un tiempo de entre 1 a 5 minutos [42].

Los aislamientos de *S. pneumoniae* serotipo 19A se sembraron en agar Columbia enriquecido con sangre de carnero al 10%, se incubaron de 18-24hrs a 5% de CO₂ a una temperatura de 35 a 37°C. La extracción del DNA de las muestras se realizó por choque térmico. En un tubo tipo Eppendorf se agregó 150µl de H₂O estéril y se agregó de 2 a 5 colonias de la muestra a analizar, así como cepas control de *S. pneumoniae*, posteriormente las muestras se hirvieron a 94° C por 10 minutos y al finalizar se colocaron a 4°C por 5 minutos, este procedimiento se realizó 3 veces. Se centrifugaron los tubos a 14000 rpm por 10 minutos, al terminar se retiraron 100µl de sobrenadante y se congeló a -20°C.

Los genes de resistencia a macrólidos *erm(B)*, y *mef(A)* fueron identificados y amplificados usando la PCR con los oligonucleótidos (primers) específicos para cada gen de resistencia [42]. (Tabla No. 4).

Tabla No 4. Secuencia de los primers

Nombre del gen	Secuencia (5' a 3')	Posición	Longitud (pb)
<i>ermB</i>	F: CGTACCTTGGATATTCACCG	721-740	224
	R: GTAAACAGTTGACGATATTC	944-922	
<i>mefA</i>	F: CTGTATGGAGCTACCTGTCTGG	288-309	294
	R: CCCAGCTTAGGTATACGTAC	581-562	

Las condiciones de la PCR utilizadas fueron: 94°C por 20 segundos para la desnaturalización de la muestra, 52°C por 20 segundos en la hibridación de los primers, 72°C por 15 segundos para la amplificación y se repite el ciclo 30 veces. Los fragmentos de DNA amplificados fueron analizados mediante una electroforesis con gel de agarosa al 1% y se tiño con bromouro de etidio.

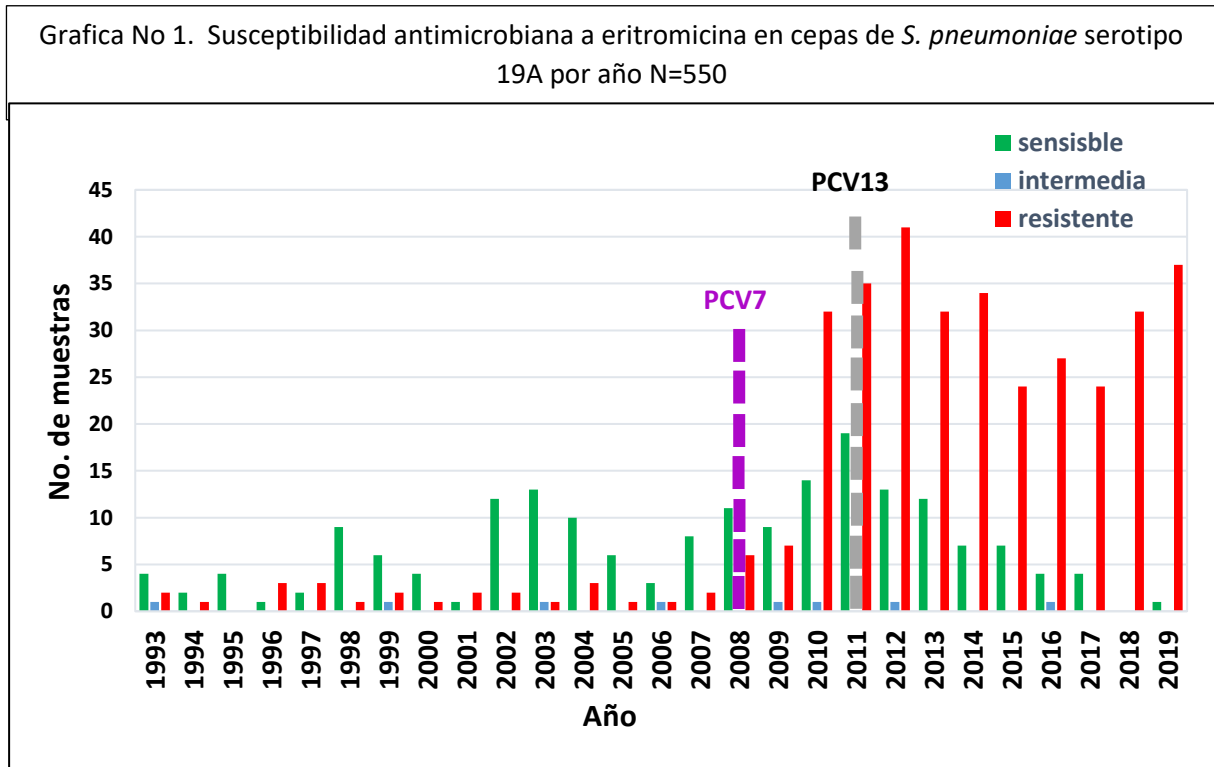
Los controles utilizados fueron *S. pneumoniae* ATCC 49619 como control (-), como controles positivos *S. pneumoniae* Tennessee 23F (*mefA*) y *S. pneumoniae* Finland 6B (*ermB*).

11. 3 ANALISIS DE DATOS

Se elaboró una base de datos de las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 19A resistentes a eritromicina colectadas en las que se incluyeron datos como: hospital de procedencia, sitio de aislamiento, sexo, edad y diagnóstico del paciente. Así como periodo vacunal, se analizó como periodo prevacunal PRE-PCV (1993-2011) y periodo postvacunal POST-PVC (2012-2019).

12. RESULTADOS

De un total de 4186 muestras de *S. pneumoniae* obtenidas durante el periodo 1993-2019, 550 (37%) muestras fueron serotipo 19A, de las cuales 186 (33.8%) fueron sensibles a eritromicina, 8 (1.4%) poseen sensibilidades intermedias y 356 (64.7%) fueron resistentes. Se observó que la susceptibilidad a eritromicina en las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 19A ha cambiado a través del tiempo, principalmente después de la introducción de las PCVs, encontrando un incremento de resistencia a eritromicina (Gráfica No. 1).



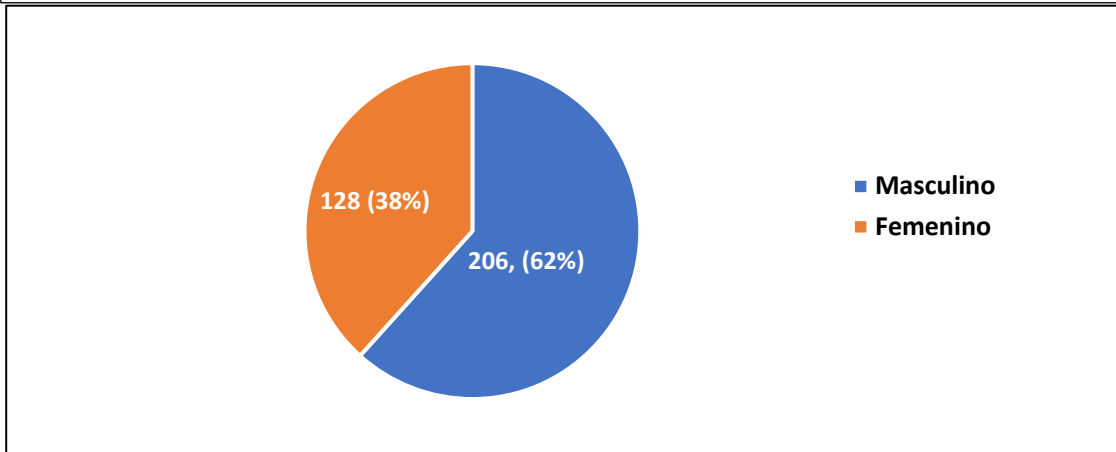
■ Introducción PCV13: Vacuna neumocócica conjugada. (Por sus siglas en inglés)
 ■ introducción PCV7 en el esquema de vacunación.

De las 356 muestras resistentes a eritromicina se trabajaron solo 334 debido a que el resto de las muestras (22) no se recuperaron al descongelarse. Se consideró al periodo PRE PCV de (1993-2011) y al periodo POST PCV de (2012-2019). El 62% de las muestras fueron del sexo masculino y el 38% fueron del sexo femenino (Gráfica No. 2).

De las muestras analizadas 177 (53%) provenían de pacientes con diagnóstico de enfermedad invasiva y 157 (47.1%) provenían de pacientes con diagnóstico de enfermedad no invasiva.

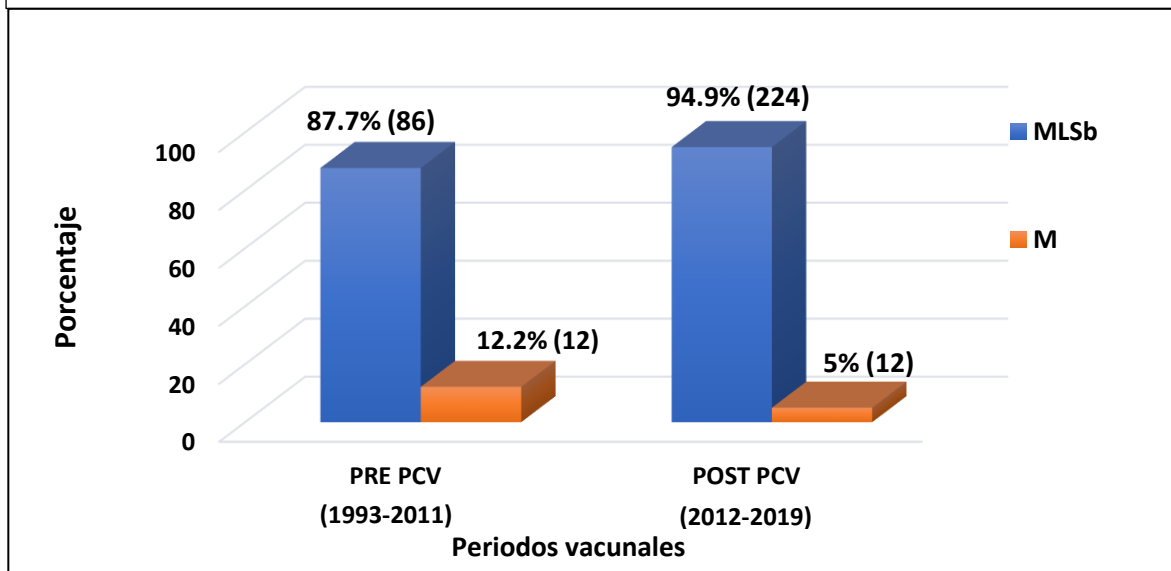
Las muestras de enfermedades invasivas se obtuvieron de sitios normalmente estéril; hemocultivo (central y periférico) (70), líquido cefalorraquídeo (33) y líquido pleural (73). Las muestras no invasivas provenían de sitios como; absceso mastoideo (1), aspiración endotraqueal (1), aspiración nasofaríngea (1), aspiración traqueal (2), broncoaspirado (72), esputo (1), expectoración pulmonar (18), sitio quirúrgico (1), lavado bronquio alveolar (1), lavado bronquial (3), líquido articular (1), líquido peritoneal (4), secreción de absceso (3), secreción bronquial (16), secreción conjuntival (3), secreción ocular (2) y secreción ótica (26).

Gráfica No. 2: Distribución de cepas de *S. pneumoniae* serotipo 19A resistentes a eritromicina por sexo n=334



El análisis de los fenotipos en las cepas resistentes a eritromicina mostró que de un total de 98 aislamientos obtenidos en el periodo prevacunal 87.7% (86/98) presentaban el fenotipo MLSB, mientras que 12.2% (12/98), presentaban el fenotipo M. En el periodo post vacunal de un total de 236 aislamientos, el 94.9% (224/236) presentaron el fenotipo de resistencia MLSb, mientras que el 5% (12/236) resultaron con el fenotipo de resistencia M. La proporción total de la incidencia del fenotipo MLSb fue de 25.7% en el periodo prevacunal a 70.6% en periodo postvacunal (Gráfica No. 3).

Gráfica No 3. Porcentaje de los fenotipos encontrados en cepas de *S. pneumoniae* serotipo 19A resistente a eritromicina en los periodos vacunales



La resistencia a eritromicina se analizó en el periodo pre y post vacunal tanto en enfermedad invasiva (muestra proveniente de líquidos estériles) como no invasiva (muestras provenientes de líquidos no estériles). Los rangos más bajos en la CIM (1-16 µg/ml) generalmente pertenecen a las muestras que presentan el fenotipo M y el gen de resistencia *mef(A)*, por el contrario, los

rangos de concentración más altos (64-128 µg/ml) están relacionados estrechamente con el fenotipo MLSb y el gen de resistencia *erm(B)* (Tabla No. 5).

Tabla No. 5: Análisis de los porcentajes en las concentraciones de la CIM a eritromicina en enfermedad invasiva y no invasiva en *S. pneumoniae* serotipo 19A antes y después de la PCV13.

SEROTIPO 19A	DIAGNOSTICO	% CIM ERITROMICINA							FENOTIPO	
		(1)	(2)	(4)	(8)	(16)	(64)	(≥128)	M	MLSb
PRE-PCV13 n= 98	INV (N=57)	0%	0%	0%	3.0%	41.8%	0%	13.2%	n= 7 (7.1%)	n=50 (51.0%)
	NINV (N=41)	1.0%	0%	1.0%	4.0%	23.4%	0%	12.2%	n=5 (5.1%)	n=36 (36.7%)
POST-PCV13 n= 236	INV (N=124)	0%	0%	0.4%	1.2%	1.2%	0.4%	47.8%	n=6 (2.5%)	n=114 (48.3%)
	NINV (N=118)	0%	0.4%	0%	0.4%	1.6%	0%	47.0%	n=6 (2.5%)	n=111 (47.0%)

INV (enfermedades invasivas), NINV (enfermedades no invasivas) PCV: Vacuna Neumocócica Conjugada

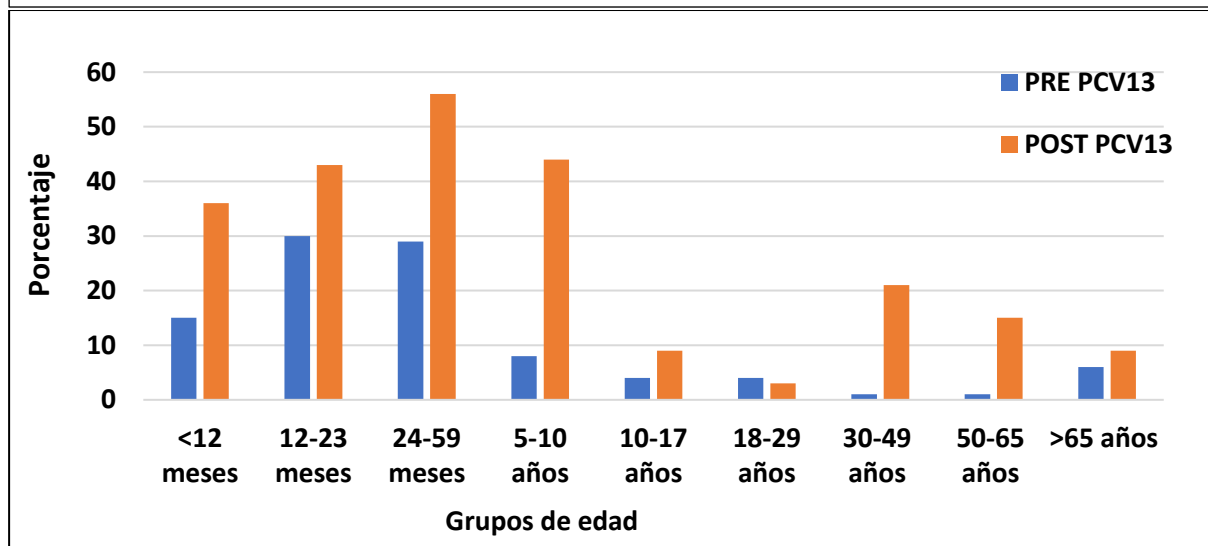
CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

Puntos de corte según CLSI: Eritromicina (≤ 0.25 : sensible), (0.5: intermedia) y (≥ 1 resistente)

□ Muestras con fenotipo M □ Muestras con fenotipo MLSB

El porcentaje de la distribución y prevalencia de *S. pneumoniae* serotipo 19A por grupo de edad a través de los periodos vacunales, indica que en el periodo post vacunal el número de casos aumento en la mayoría de los grupos (Grafica No. 4).

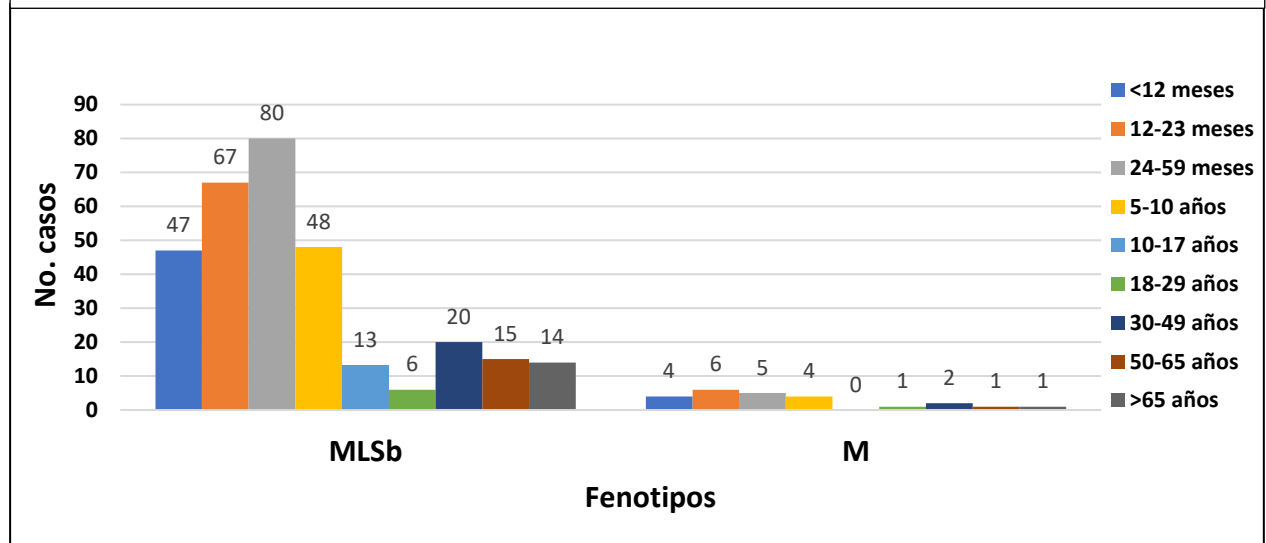
Grafica No. 4. Distribución de *S. pneumoniae* serotipo 19A por grupo de edad en los periodos vacunales



En la distribución de los fenotipos por los grupos de edad, se encontró que el fenotipo MLSb se presentó en mayor número de casos en el grupo de edad de 24 a 59 meses, alcanzando así hasta 80 casos con este fenotipo. En general este fenotipo de resistencia en las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 19A se encuentra en mayor cantidad en niños menores de 5 años que en

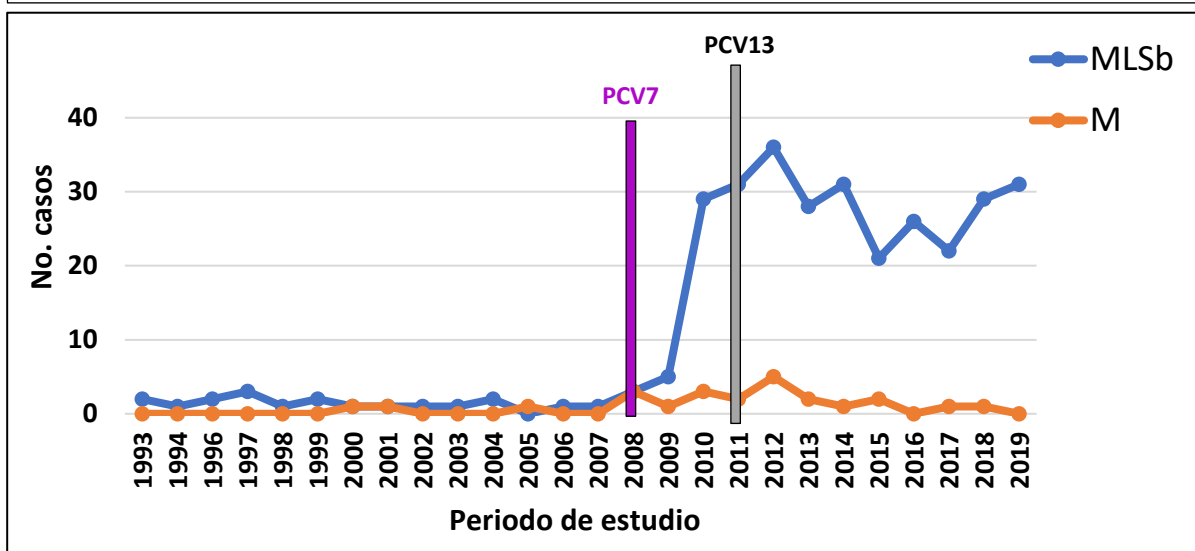
cualquier otro grupo de edad. Mientras que en el fenotipo M se encuentra muy poco en las muestras analizadas, no se registró mayor presencia en algún grupo (Gráfica No. 5).

Gráfica No. 5. Distribución de fenotipos en cepas de *S. pneumoniae* serotipo 19A por grupo de edad



El serotipo 19A tuvo un aumento en la expresión del fenotipo MLSb desde el año 2010 y posterior a la implementación de la vacuna conjugada PCV13 en el 2011, se observa una disminución en este fenotipo en los años siguientes. Mientras que el fenotipo M se ha mantenido constante a través de los años antes y después de la vacuna conjugada PCV13 (Gráfica No. 6).

Gráfica No 6. Análisis de la expresión de los fenotipos en cepas de *S. pneumoniae* serotipo 19A resistentes a eritromicina a través de los años



Tendencia de la expresión del fenotipo de resistencia de *S. pneumoniae* serotipo 19A por año a través del periodo de estudio (1993-2019).

■ Introducción de la vacuna PCV7 ■ Introducción de la vacuna PCV13

Para la detección de los genes de resistencia a eritromicina en las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 19A, se realizó un PCR solo para 12 muestras las cuales se seleccionaron por su fenotipo y CIM, debido al tiempo y las condiciones por la pandemia.

En el producto del PCR se identificaron los genes de resistencia de las muestras analizadas, se observó que en cepas de *S. pneumoniae* serotipo 19A con una CIM 1-8 µg/ml con fenotipo M presentaron el gen *mef(A)*; por otro lado las cepas con una CIM de 16µg/ml y con fenotipo MLSB presentaron el gen *erm(B)* y las cepas con una CIM igual o mayor a 128 ug/ml con fenotipo MLSB presentaron ambos genes de resistencia *erm(B)* y *mef(A)* siendo esta la estrategia más frecuentemente adaptada por el serotipo 19A. Cabe mencionar que presentar el fenotipo MLSb con ambos genes de resistencia está fuertemente relacionado con multirresistencia a antimicrobianos (MDR). Encontramos que todas las muestras analizadas que presentaban el fenotipo MLSb (6 muestras) presentaban ambos genes de resistencia *erm(B)* y *mef(A)*, por otro lado, de las muestras analizadas que presentaban el fenotipo M se encontraron solo 3 muestras con genotipo *mefA* mientras que, 2 muestras tuvieron el gen *ermB* y una muestra presento ambos genes *erm(B)* y *mef(A)*. (Figura No. 5)

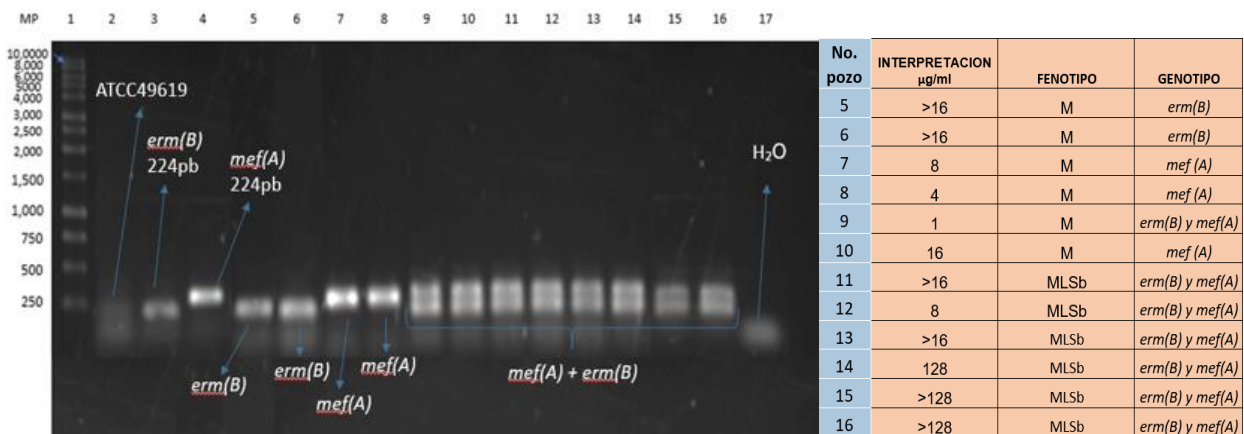


Figura 5. Resultados del producto de PCR, Amplificación de las 12 muestras resistentes a eritromicina de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19A. MP (Marcador de peso molecular), pozo -4 controles, pozos 5-16 muestras resistentes 19A, (5-6, muestra positiva gen *erm*), (7-8, muestras positivas gen *mef*), (9-16, muestras positivas con ambos genes *erm* y *mef*), pozo 17 control negativo.

13. DISCUSIÓN

La resistencia a antibióticos ha sido identificada como un problema crítico en la salud humana, si no se controla se ha previsto que causará millones de muertes anuales para el 2050 [27]. Actualmente han surgido alternativas en el tratamiento de las infecciones bacterianas, esto con el fin de evitar la resistencia antimicrobiana, lamentablemente la mayoría se encuentra en etapa experimental o son restringidas a ciertos tipos de infecciones, pero son interesantes de considerar a futuro en cuanto la investigación de estas esté más desarrollada, algunas de estas alternativas son; el uso de péptidos antimicrobianos, fagoterapia y el uso de probióticos [43].

S. pneumoniae es el principal patógeno implicado en las neumonías adquiridas en la comunidad y de las meningitis bacterianas en todo el mundo. En nuestro estudio el objetivo fue el de identificar el fenotipo de resistencia a macrólidos de las muestras recolectadas por el grupo GIVEBPVac en México durante los periodos pre y post vacunales con la PCV13 (1993-2019). Actualmente por la problemática mundial que representa la resistencia antimicrobiana la vigilancia epidemiológica es una estrategia clave, analizar la resistencia de los patógenos a través del tiempo y ante las herramientas usadas para la prevención (vacunas) como se realizó en este trabajo nos permite generar un panorama de cómo puede ser el comportamiento de los patógenos a futuro, esto con el fin de poder prepararnos con nuevas herramientas y tratamientos cada vez más efectivos.

La distribución de los aislamientos de *S. pneumoniae* a través del sexo mostró una significativa predominancia en el género masculino con 62% del total de las muestras lo que es similar a un estudio en Estados Unidos [44]. Mientras que la distribución a través de los grupos de edad es similar en todas las regiones del mundo, esto es debido que muchos patógenos oportunistas como es *S. pneumoniae* afectan principalmente a los grupos más vulnerables y en el caso del neumococo el grupo de 24 a 59 meses de edad y los adultos mayores son los más afectados.

La resistencia a eritromicina en cepas de *S. pneumoniae* serotipo 19A en este estudio se ha visto incrementada a través de los años, esta incrementó de 42.1% en el periodo prevacunal a 83 % en el periodo post vacunal, con nuestros datos determinamos que esto pudo ocurrir por presiones de competencia, por el fenómeno de remplazamiento de serotipos posterior a la introducción de la PVC13 y principalmente por la prevalencia de este serotipo. A pesar de que hubo una reducción en la presencia del serotipo 19A después de la introducción de la vacuna PCV13 en el 2011 observamos que las cepas que aun circulan presentan una alta resistencia a eritromicina. Encontramos el predominio del fenotipo MLSb en todo el periodo de estudio con 93% en las muestras, mientras que solo el 7% fue fenotipo M.

En este estudio se identificó el genotipo de algunas muestras de *S. pneumoniae* serotipo 19A, encontramos que todas las muestras analizadas que expresaban el fenotipo MLSb (6) presentaban ambos genes de resistencia *erm(B)* y *mef(A)*, por otro lado, en las muestras analizadas que expresaban el fenotipo M (6), se encontraron solo 3 muestras con el gen *mef(A)*, 2 muestras tuvieron el gen *erm(B)* y una muestra presentó ambos genes *erm(B)* y *mef(A)*. Estos últimos datos resultaron diferentes a lo esperado ya que nuestra investigación bibliográfica previa nos indicaba que el fenotipo de resistencia M estaba mayormente relacionado con el *mef(A)*, sin embargo esto puede ser explicado por la diferencia geográfica, los diferentes complejos clonales e incluso los diferentes hábitos en el uso de los antimicrobianos de las diferentes poblaciones.

En un estudio realizado en Estados Unidos en el 2017 con datos de vigilancia de 1994-1999, se reportó que la incidencia de resistencia a macrólidos de *S. pneumoniae* serotipo 19A de 1999 al 2013 disminuyó un 73.7%, esto por el uso de las vacunas conjugadas de 9.3 a 2.45 casos por cada 100,000 habitantes.

Reportaron que la incidencia de resistencia a macrólidos en enfermedad neumocócica invasiva causada por el serotipo 19A se incrementó significativamente después de la introducción de la PCV7 del 2003 al 2009 con 0.93 a 2.15 casos por cada 100,000 habitantes, dicho aumento fue referido al incremento del gen *erm(B)* así como el conjunto de ambos genes *erm(B)* y *mef(A)*. Posterior a la introducción de la PCV13 en el 2010, la incidencia en la resistencia disminuyó a 0.43 casos por cada 100 habitantes en el 2013. En todo su periodo de estudio se menciona que, a diferencia de nuestros resultados, en Estados Unidos el gen de resistencia predominante es el *mef* seguido por la combinación de ambos genes *mef(A)* y *erm(B)*, y el gen *erm(B)* fue el que menos presencia tuvo en las cepas de *S. pneumoniae* 19A, a pesar de que la distancia entre nuestras poblaciones de estudio es corta (comparada con otros estudios), si observamos diferencias en los determinantes de la resistencia entre las cepas. [44].

En una investigación llevada a cabo en Brasil en la cual se analizaron muestras de *S. pneumoniae* serotipo 19A aisladas de pacientes con enfermedades invasivas y no invasivas durante el periodo (2008-2014), en donde las muestras recolectadas durante el periodo 2008-2010 fueron consideradas como del periodo prevacunal, mientras que las que fueron recolectadas durante el 2011-2014 pertenecían al periodo post vacunal con la PCV10. En todo el periodo de estudio se recolectaron 568 muestras de las cuales el 6.7% (38/568) fueron serotipo 19A, 3.5% (6/173) del periodo pre vacunal y 8.1 (32/395) del periodo post vacunal; en un posterior análisis se determinó que el 39.4% presentó ambos genes de resistencia *mef(A)* y *erm(B)*, el 60.5% presentó el gen *mef(A)* y el 18.42% restante presentó el gen *erm(B)*[45]. Estos resultados difieren a los encontrados en nuestro estudio debido a que el gen *mef(A)* como principal determinante de la resistencia no fue muy común, al contrario en nuestra investigación se encontró mayor presencia del genotipo combinado *mef(A)* y *erm(B)* junto con el fenotipo MLSb ambos determinantes de resistencia son relacionados con mayores valores de CIM mientras que el gen *mef(A)* es reportado con menor frecuencia en este estudio y es relacionado con menor resistencia en sus valores de la CIM.

En otro estudio realizado en el 2014 en la región de la República Checa 36 aislamientos resistentes a macrólidos de *S. pneumoniae* serogrupo 19 fueron recolectados, de los cuales 26 fueron serotipo 19A y todos los aislamientos presentaron el fenotipo MLSb. El 96.1% (25) resultaron con el gen *erm(B)* y solo un aislamiento (3.9%) presentó ambos genes de resistencia *mef(A)* y *erm(B)* [46]. Estos resultados son similares a los nuestros ya que encontramos que el gen *erm(B)* relacionado con el fenotipo MLSb es más común en nuestro estudio ya sea con el gen de manera individual o en conjunto, las similitudes encontradas en el comportamiento resistencia en los estudios a través del tiempo puede indicar que se han usado estrategias similares en el tratamiento, prevención y control de los antimicrobianos, por otro lado el éxito de la propagación exitosa de las cepas del serotipo 19A se debe a su diversidad genética, el reemplazo de serotipos post-vacuna así como el consumo de antibióticos por parte de ambas poblaciones. [46].

Otro estudio con resultados similares fue llevado a cabo en Hungría, en esta investigación un total de 2262 muestras de niños sanos fueron recolectadas y analizadas desde marzo del 2009

hasta junio del 2012, el estudio se centró en analizar las características epidemiológicas del serotipo 19A posterior a la introducción de la PCV7. Las muestras fueron divididas en 2 grupos según la cobertura vacunal, el grupo 1 comprendió las muestras recolectadas de marzo del 2009 hasta abril del 2010, el segundo grupo comprendió las muestras recolectadas de octubre de 2010 a junio del 2012. El serotipo 19A representó 1.4% (3/218) en el grupo 1 y 11.5% (58/530) en el grupo 2. En total 61 muestras del serotipo 19A fueron identificadas, el 98.3% (60/61) presentó el gen *erm(B)*, mientras el 1.7% presentó ambos genes *erm(B)* y *mef* [47].

Al analizar nuestros resultados con estudios realizados en diferentes regiones observamos que existe una variabilidad regional en la expresión de los fenotipos de resistencia a eritromicina. La introducción de la vacuna neumocócica conjugada PCV13 en varios países logró disminuir los casos de enfermedades neumocócicas causadas por el serotipo 19A, en este estudio observamos un incremento de la prevalencia de cepas *S. pneumoniae* serotipo 19A con mayor resistencia a eritromicina determinada por la expresión del fenotipo MLSb dada probablemente por una presión selectiva ante el uso indiscriminado de los antibióticos, así como por la prevalencia de la bacteria logrando transferir dicha resistencia por medio de la transferencia horizontal de material genético.

14. CONCLUSIÓN

La resistencia a eritromicina en *S. pneumoniae* serotipo 19A se ha incrementado a través del tiempo, principalmente después de la introducción de la PCV7 y PCV13, encontrando la presencia del fenotipo MLSB en mayor porcentaje con respecto al fenotipo M.

Este estudio muestra el comportamiento y evolución de la resistencia a eritromicina a través de su fenotipo en los periodos pre y post vacunales con la PCV13. El incremento de la CIM en las cepas estudiadas muestra una tendencia en la resistencia brindada por el fenotipo MLSB que esta principalmente relacionado a la expresión del gen *ermB*. así como también observamos la presencia del fenotipo M en las cepas con una CIM baja, el cual se relaciona con la expresión el gen *mef(A)*.

Es importante continuar vigilando la resistencia de *S. pneumoniae* serotipo 19A debido a que es un serotipo multirresistente siendo un problema de salud pública mundial. Para conseguir un panorama más completo de la resistencia circulante, se debe profundizar en la identificación de los genes que confieren la resistencia en todas las muestras

Limitaciones

En nuestro estudio tuvimos algunas limitaciones principalmente en la identificación de los genes de resistencia debido a la situación actual del mundo, el estudio comprendía el análisis del fenotipo, así como del genotipo, sin embargo, el análisis se tuvo que limitar a la identificación del fenotipo.

Perspectivas

Con los resultados obtenidos en la identificación del fenotipo y el análisis del genotipo de las muestras seleccionadas, pudimos generar un panorama de como los genes de las cepas del serotipo 19A pueden estar circulando, sin embargo, se debe continuar con la vigilancia de la resistencia de *S. pneumoniae* serotipo 19A que circula en nuestra población, ante las vacunas existentes y de misma forma con las de nueva generación. Estudios a nivel molecular más extensos deben ser realizados con el fin de conocer la circulación de las cepas resistentes a eritromicina. Ejemplos de la necesidad de mayor investigación fueron observados en nuestros resultados, identificamos que en algunas muestras el fenotipo (M) sugería que las cepas presentaban rangos de la CIM bajos, sin embargo, al analizar el fenotipo y en algunas la identificación de los genes de resistencia junto con los datos recopilados por el grupo GIVEPBVac se observó lo contrario, rangos en la CIM elevados ($>16\mu\text{g/ml}$), esto puede indicar la presencia de otros mecanismos de resistencia menos comunes. Otro caso fue en el que cepas que expresaban el fenotipo MLSB presentaron valores de la CIM bajas ($<16\mu\text{g/ml}$), suponemos que esto puede ser debido a que algunas cepas poseen los genes de resistencia, pero no llegan a expresarlos.

Mas investigación es requerida para mejorar la protección generada por las vacunas antineumocócicas conjugadas ya que el neumococo es capaz de evadir la respuesta inmune y en los últimos años se ha mostrado un incremento de su prevalencia y resistencia, con más

investigación y el uso de nuevas tecnologías, se podrían generar nuevas formulaciones y compuestos capaces de identificar eficientemente al neumococo a pesar de su gran capacidad de evasión.

15. REFERENCIAS

- 1.- El Moujaber G, Osman M, Rafei R, Dabbossi F and Hamze M;(2017). Molecular mechanisms and epidemiology of resistance in *Streptococcus pneumoniae* in the Middle East region. *Journal of Medical Microbiology*; 66:847–858.
- 2.- Cillóniz C, Ardanuy C, Villa J and Torres A. (2016). What is the clinical relevance of drug-resistant pneumococcus? *Current Opinion Plum Med.* 22:227-234.
- 3.-Spanelova P, Jakubu V, Malisova L, Musilek M, Kozakova J, Papagiannitsis C, Bitar Ibrahim, Hrabak J, Pantosti A, Del grosso M and Zemlickova H;(2020). Whole genome sequencing of macrolide resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A sequence type 416. *BMC Microbiol.* 2:224.
- 4.- Zhao W, Pan F, Wang B, Wang C, Sun Y, Zhang T, Shi Y, Zhang H;(2019). Epidemiology Characteristics of *Streptococcus pneumoniae* from children with pneumonia in Shanghai: A retrospective study. *Front Cell. Infect. Microbiol.* 9:258.
- 5.- Hu D, Sun Z, Luo X, Liu S, Yu L, Qu Y, Yang J, Yu J, Li X, Zhang J; (2016). Drug resistance characteristics and Macrolide Resistant Mechanisms of *Streptococcus pneumoniae* in Wenzhou City, China. *Medical Science Monitor.* 22:2731-2735.
- 6.- Echaniz A.G, González G. E, Roman A.L, Otero M.R, Rodríguez-Noriega E, Ayala-Gaytán J J, Guajardo-Lara C E, Soto-Nogueron A, Carnalla-Barajas M N y Camacho-Ortiz A; (2019). Clinical an microbiological characteristics of community-acquired pneumoniae associated with *Streptococcus pneumoniae* in adult patients with cancer. *Salud Pública Mex.* 60:21-26
- 7.-Paciel D y Larriera E. (2010). Antibioticoterapia a Macrolidos y Claritromicina. *Tendencias en Medicina.*
- 8.- Reijtman V, Gagetti P, Faccone D, Fossati S. (2013). Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolated from Argentinian pediatric patients suffering from acute otitis media. *Revista Argentina de Microbiología,* 45:262-266.
- 9.-Isturiz R, Sings L.H, Hilton B, Arguedas A, Reinert R R and Jodar L; (2017). *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19A: Worldwide epidemiology, Expert review of Vaccines. 16:10, 1007-1027.
- 10.- Kim L, McGee L, Tomczyk S, Beall B. (2016). Biological and epidemiological features of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in pre- and post-conjugate vaccine eras: a United States perspective. *Clin Microbiol Rev* 29:525–552.
- 11.- Weiser J.N, Ferreira D. M and Paton J.C. (2018). *Streptococcus pneumoniae* transmission, colonization an invasion. Macmillan part of Springer Nature.
- 12.-Organizacion Panamericana de la Salud (15 de agosto 2015); Neumococo. <https://www.paho.org/es/temas/neumococo>
- 13.-Organización Mundial de la Salud (6 de Septiembre 2009).; <https://www.who.int/immunization/diseases/pneumococcal/en/>.
- 14.- Organización Mundial de la Salud ; (5 de Septiembre 2015) <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/pneumococcus>.

- 15.-Center of Disease Control (6 de Agosto 2019) <https://www.cdc.gov/pneumococcal/about/facts.html>.
- 16.-Brooks LRK and Mias GI (2018). Streptococcus pneumoniae's Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention. *Front. Immunol.* 9:1366.
- 17.-Tin Tin Htar M, Chistopoulou D and Schmitt HJ. (2015). Pneumococcal serotype evolution in Western Europe. *BMC Infectious Diseases.* 15:419.
- 18.-Pasteur et al; (1881). La teoría de los gérmenes y sus aplicaciones en la medicina. *Comptes Rendus de L' Academie des Sciences.* 86: 1037-1043.
- 19.-Stemberg, G.M and Meredith J.T, (1881) Collection (Library of congress). National of Health (U.S). A fatal from septicemia in the rabbit produced by the sub cutaneous infection of human saliva. An experiment research. Baltimore.
- 20.-Brenner, DJ. Krieg, NR, Staley, J.T, Garrity, GM, (2005). *Bergueys Manual of Systematic Bacteriology.* New York. Springer.
- 21.- Organización Panamericana de la Salud, Instituto Nacional de Salud de Colombia (2004) Programa de Vigilancia de los Serotipos y Resistencia Antimicrobiana de Streptococcus pneumoniae y Haemophilus influenzae.
- 22.-Soto-Nogueron A, Carnalla-Barajas MN, Solorzano-Santos F, Arrendondo-García JL, Arzate-Barbosa P, Tinoco-Favila J C, Anzures Gutiérrez A y Echániz-Aviles; (2016). Streptococcus pneumoniae as cause of infection in infants less than 60 days of age: serotypes an antimicrobial seceptibility. *International Journal of Infectious Diseases.* 42: 69-73.
- 23.- Habib, M., Porter, B.D and Satzke, C. (2014) Capsular Serotyping of Streptococcus pneumoniae Using the Quellung Reaction. *J. Vis. Exp.* (84).
- 24.-Feldman C and Anderson R. (2020). Pneumococcal virulence factors in community-acquired pneumonia. *Current Opinion. Plum Med.* 26: 222-231.
- 25.- Ganaie F, Saad JS, McGee L, van Tonder AJ, (2020). A new pneumococcal capsule type, 10D, is the 100th serotype and has a large cps fragment from an oral streptococcus. *American society of microbiology.* 11:20.
- 26.- Feldman C and Anderson R. (2016) *Epidemiology, virulence factors and management of the pneumococcus.* *Pulmonary medicine* (3), 222-231.
- 27.-Suaya J.A, Mendes R.E, Sings H.I, Arguedas A, IReinert R R, (2020). Streptococcus pneumoniae serotype distribution and antimicrobial non-suceptibility trends among adults with pneumoniae in the United States, 2009-2017. *Journal of infection.* 81: 557-566.
- 28.-Castells Silvia y Hernández Margarita. (2012). *Farmacología en enfermería.* Elsevier España. Foletra S. A.
- 29.-Zhou L, Ma X, Gao W, Hu K, Shen A, Yu S, Yang Y; (2012). Molecular characteristics of erythromycin resistant Streptococcus pneumoniae from pediatric patients ypunguer than five years in Beijing, 2010. *BMC Microbiology.* 12:228.
- 30.-Taha N, Araj GF, Wakim HR, Kanj SS, Kanafani Z A, Sabra A, Khairallah M T, Nassar J F, Shehab M, Baroud M, Dbaiibo G, and Matar M G, ; (2012). Genotypes and serotype

distribution of macrolide resistant invasive and non-invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Lebanon. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 11:2

31.- Schroeder MR and Stephens DS (2016). Macrolide Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 6:98.

32.-Shapiro E, Berg AT, Austrian R, Shroeder D, Parcels V, Margolis A, Adair R K and Clemens J D; (1991) The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine. *The new England Journal of Medicine*. 325:21.

33.-Center of Disease Control ;(1 de Septiembre 2017). <https://www.cdc.gov/pneumococcal/vaccination.html>

34.-Goldblatt D;(2000). Conjugate Vaccines. *Clin Exp Immunol* 119:1-3.

35.-Godwin Oligbu, Norman K, F and Shames N.L. (2019). The Epidemiology and Biostatistics of *Pneumococcus*. *Streptococcus pneumoniae: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Vol 1968.

36.-Organización Mundial de la Salud ;(6 de Septiembre 2014) https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=1938:2009-pcv-intro-map&Itemid=1678&lang=es

37.- Agudelo CI, DeAntonio R, Castañeda E; (2018) *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in Latin America and the Caribbean 2010–2015: A systematic review and a time series analysis. *Vaccine*.

38.- Camacho Moreno G, Luisa F. Imbachi, Aura L. Leal, Vivian M. Moreno, (2020): Emergence of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A (Spn19A) in the pediatric population in Bogotá, Colombia as the main cause of invasive pneumococcal disease after the introduction of PCV10, *Human Vaccines & Immuno therapeutics*.

39.-Organización Panamericana de la Salud ; (5 de Agosto 2018) https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5536:2011-sireva-ii&Itemid=3966&lang=fr

40.-Instituto Nacional de Salud Pública. Datos por sexo y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* en procesos infecciosos. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública-Secretaría de Salud, 2019 cb.

41.- Hudxicki J; (2016). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *American Society of Microbiology*.

42.- Mosleh N, Gharibi M, Alikhani M.Y, Saidijam M, Vakhshiteh F; (2014). Antimicrobial susceptibility and analysis of macrolide resistance genes in *Streptococcus pneumoniae* isolated of *Streptococcus pneumoniae* isolated in Hamadan. *Pathol Biol*. 49: 522- 527.

43.- Pang Z, Raudonis R, Glick R. B, Lin TJ, Cheng Z; (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*. 37; 177-192.

- 44.- Schroeder MR, Chancey ST, Thomas S, Kuo W, Satola S W, Farley M M and Stephens S D; (2017). A Population-Based Assessment of the impact of 7- and 13- Valent Pneumococcal Conjugate Vaccines on Macrolide-Resistant Invasive Pneumococcal Disease: Emergence and Decline of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A (CC320) With Dual Macrolide Resistant Mechanism. *Clinical Infectious Diseases*. 65.
- 45.-Mott MP, Caierã J, Cunha GR, Maschi MM, Pizzutti K, Azevedo'd P, Dias G;(2019). Emergence of Serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* after PCV10 asociated with a ST320 in adult population, in portro alegre Brazil. *Epidemiology and Infection*. 147:1-7
- 46.-Žemličková H, Malisova L, Španělová P, Jakubu V, Kozáková J, Musílwk M and Medvecký M;(2018). Molecular Characterization of serogrup 19 *Streptococcus pneumoniae* in Czech Republic in the post vaccine era. *Journal of Medical Microbiology*. 67: 1003-1011.
- 47.-Tóthpal A, Laub K, Kardos S, Tirczka T, Kocsis A, Linder M, Dobay Q;. (2016). Epidemiological analisis of pneumococcal serotype 19A in healthy children following PCV7 vacination. *Epidemiol Infect*. 144:1563-1573.

ANEXO

PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Mueller Hinton (MCD LAB)

Se preparan 500ml de medio Mueller Hinton para realizar la prueba de identificación de susceptibilidad a la optoquina y la prueba de difusión de disco doble Kirby Bauer para determinar el fenotipo de resistencia.

Se pesan 19g de medio Agar Mueller Hinton por cada 500ml de H₂O 5 veces destilada, se disolvió el medio en un matraz y se lleva a punto de ebullición. Posteriormente se esteriliza en la autoclave, se debe enfriar a una temperatura aproximada de 60°C y se le vierten 25ml de sangre de carnero. Finalmente se miden 25ml del medio en una probeta y se vacía en las cajas de Petri.

- Columbia Agar Base (BD)

Se pesan 21.25g de medio Columbia y se le agregan 2.5g de Extracto de levadura, se disuelve en 500ml de agua 5 veces destilada en un matraz y se lleva hasta la ebullición. Posteriormente se esterilizan en la autoclave, Al salir de la autoclave debe enfriarse a una temperatura de alrededor de 60°C, se le adicionan 50 ml de sangre de carnero y se vierte en cajas de Petri.

- Infusión de Cerebro-Corazón (BHI, por sus siglas en ingles)

Este es un medio líquido que se utiliza para realizar la prueba de identificación por solubilidad en bilis, se pesan 3.7g por 100ml de agua 5 veces destilada, se disuelve y se esteriliza.

- Solución salina al 0.8% J.T. Baker

Se pesan 1.08g de cloruro de sodio cristal y se disuelven manteniéndose en agitación en 200ml de agua 5 veces destilada, posteriormente se llenan tubos con 3ml de la solución y se esteriliza.

- Buffer TBE

Se utilizan 108g de Base Tri5, 55g de Ac bórico, EDTA pH8 (0.5M) 40 ml y 1000ml de H₂O destilada 5 veces

Cuernavaca, Morelos a 24 de agosto de 2022

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **DANIEL LÓPEZ PASTRANA**, con el título del trabajo: **Análisis de la resistencia a eritromicina de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19A en hospitales pertenecientes a la red GIVEBPVac durante el periodo 1993-2019.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: M. EN C. VERÓNICA CHÁVEZ LÓPEZ

SECRETARIO: DR. JOSÉ MANUEL CASTRO GARCÍA

VOCAL: M. EN C. MARÍA NOEMÍ CARNALLA BARAJAS

SUPLENTE: DRA. IRMA GABRIELA ECHÁNIZ AVILES

SUPLENTE: DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA NOEMI CARNALLA BARAJAS | Fecha:2022-08-24 15:03:45 | Firmante

AsMfBya1q4kK7rwwV6MmCqjVORsA8H4JVH6r4pb3Tole9CQgYzINtB5VPy9h0nsovHww4wqGPV5LTubcTrHwBr+KBOPSDw+Y6Fm/b1p73qI9rAC4nya/8hbATj3OAmGxufWtSqDpsWmC8T+4EwuzdPnJi3ZXavq4pGp/gj8WuOKTtB0alB+V25P6qY3SxdYHeqACSSYqLFBujm+BuvPHXTWtjyWbhi7hTC1jjROlpB6mmqMKrl+P4dqcrTKWkVJGeVteiNOKO OVNqq3YESIMM1ITFs2L4w2gABY60ZUleFTsNlFEwpX3K5No9n3Vlg3HTPh3NLKyHfDlpbsh8r9Uw==

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2022-08-24 15:50:44 | Firmante

s/EkypyoARJsYNBI4zfkK2MsqJ9MUQbZv9gja3OvrLm0py7TN8r8RfXwFpiGyhKcq/+j9PP6ZFcepWALQpm2vdNJ0GAqCVEKOB6SzAa6XIBNBAiPVL9e+jqaiGh1vYZCqo1g1Kd DgdSXd6gS5ED8sO6Rtb/MjA48EgVuLxw3xxGZBgJVBYCv4tEXnxylDmoBOR3IYZ/k0WxyBM3X2FDwUUJXG23TZeQvJTGb0+KfhYuLI1BuZKzPmebAxNLQjZDbZGUIRTsJh5jr M2X2NewlPivsMG127EqPKyWs8nFYjtQIkENd2ZULbjcjbEc29vEAtvMbYafbxMiBb6yi2urg==

IRMA GABRIELA ECHÁNIZ AVILES | Fecha:2022-08-28 20:18:58 | Firmante

PJp/nzM/g9JyuCkNRPIs8b0Z/zuvoFO741LHWgRNCZ7K/tk+/7VPTiY8EhlaVRGG3rL3Qo0xSHUc7fd2GnNthn2bWBqYoJ8GXprJT+njmcHFhqa3FDasveabKiQy9S/wExVP4r3y WWK6VogEs2jQ5TvSu+X2Nq2rSNKJy4fJxuADl/uctOzqqtmY6JuqDITDzyPCgmVZBfNaKVNp6Vqewn1OqErVVDqBye6ZtAkYftlgwGbL3QpRnBQVH1leWv3poGkMAbsWPQ VLgaVLjmmElmMalg6NikBhjRt74PbX4KsHdFU56k035U/sOn1vtG3jrQCDOrC/xdHsU0jGA==

VERONICA CHAVEZ LOPEZ | Fecha:2022-08-29 11:45:30 | Firmante

ndsKroarTMJvb9a96/e48qJcQpyYh7qC8cTX2Nh6l8VMbyzU8OSHZGTqETwUV4ko3zu24K8HVm6HPdnAdInZw154bHNrhNdkPeWCJLU7vT0FMAMcTm19eMY38QlxNt0gflygZ o3acpx/vlPuwijv9LaSKtn7KF9YE7N6GR1OxuEvDTxTuuDdJtAQcdLbyuyaDNCAyfdSEpsGXBjV5PjnkK2Pcldu4Okhvvf+3zI8XR04VOCsOAe0UEJfVo/e+b0catfLomexVfnNqK4 xMNNXIAAttq8vNrdOvk2Hf1XykKx2r7l7/evrEyyzfRUWgfsutOeQl5kXBACFhQRyT9Rv3w==

JOSE MANUEL CASTRO GARCIA | Fecha:2022-09-15 23:41:50 | Firmante

Br0kr99AyKobHeKKU5PD0aJQ2uQnNcUuagBXT/Y5Er+wyvWv4xam0zHT6Pfg577/LasheKqGZtA58pQVIOzqGnlDOxQ5CqIWi7AyOTK1sl6uSIYYRO49WWqbdvt47vkc03Fhsh +7SR+LsM1J+soyaUR1ihl0vgTVRVMrv5YE3oaNURxiHIXJKbRNR7tHhIAU2AUgbdGSTh6cy8MUKaJcKySRgnWbECctOKWruFTkyWHIUSia3KizJA6LYUiuwMAEckeil/83RyHb BjX+G8ke7/NL0x80thY0vUeDolQ8soLpfs/p4/RfRnbk20djl83AtXCU2pMcGv0VzoVsAcHiog==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



85f2qC60Q

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Qe9tLdaiFSIjNomSfax7W9otUOBQGVqH>

