



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

IDENTIFICACIÓN CLONAL DE SEROTIPO 11A DE *Streptococcus pneumoniae* CAUSANTE DE ENFERMEDAD EN POBLACIÓN MEXICANA

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

MARIANA BRAVO VIZUETT

DIRECTOR DE TESIS:

M.C. ARACELI SOTO NOGUERÓN

Índice	Pag.
Portada.....	1
Índice.....	2
Índice de tablas y figuras.....	3
I. Introducción.....	4
II. Antecedentes.....	5
II.1 Clasificación.....	5
II.2 Características microbiológicas.....	5
II.3 Factores de virulencia.....	6
II.4 Serotipos de <i>S. pneumoniae</i>	9
II.5 Prevalencia de la enfermedad.....	10
II.6 Vacunas.....	11
II.7 Reemplazo de serotipos por introducción de PCVs.....	12
II.8 Importancia del serotipo 11A.....	13
III. Justificación.....	16
IV. Hipótesis.....	16
V. Objetivos.....	17
V.1 Objetivo General.....	17
V.1.2 Objetivos Particulares.....	17
VI. Metodología.....	18
VI.1 Estrategia experimental.....	18
VI.2 Tipo de estudio.....	18
VI.3 Población de estudio.....	18
VI.4 Re identificación de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	19
VI.5 Serotipificación.....	20
VI.6 Susceptibilidad antimicrobiana.....	21
VI.7 Electroforesis en campos pulsados PFGE.....	22
VI.7.1 Crecimiento bacteriano.....	22
VI.7.2 Preparación de discos de agarosa.....	23
VI.7.3 Extracción de ADN.....	23
VI.7.4 Restricción del DNA con enzima <i>Sma</i> I.....	23

VI.7.5 Electroforesis.....	24
VI.7.6 Interpretación de los resultados.....	24
VII. Resultados	25
VIII. Discusión.....	34
IX. Conclusión.....	36
X. Referencias.....	37
XI. Anexo medios de cultivo y soluciones.....	40

Índice de tablas y figuras

Figura 1 (Factores de virulencia).....	8
Figura 2 (Estructura de síntesis capsular del serotipo 11A de <i>S. pneumoniae</i>).....	14
Figura 3 (Solubilidad en bilis).....	20
Figura 4 y 5 (Serotipificación).....	21
Figura 6 (Aislamientos de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 11A por año).....	25
Figura 7 (Porcentaje de aislamientos de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 11A por sexo).....	26
Figura 8 (Distribución de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 11 A por edad).....	26
Figura 9 (Distribución de enfermedad causada por <i>S. pneumoniae</i> serotipo 11A de 1993-2018).....	27
Figura 10 (Enfermedad causada por <i>S. pneumoniae</i> serotipo 11A por edad).....	28
Figura 11 (Susceptibilidad antimicrobiana de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 11A).....	29
Figura 12 (Patrones de PFGE de cepas de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 11A).....	30
Figura 13 (Dendrograma de similitud de patrones clonales de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 11A).....	31
Tabla 1 (Relación del perfil antimicrobiano de cepas de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 11A según su patrón clonal).....	33

I. INTRODUCCIÓN

Streptococcus pneumoniae es considerado un patógeno importante para el ser humano, siendo reconocido como su único huésped. Es causa de morbilidad y mortalidad debido a que es responsable de enfermedades tales como otitis, neumonía, meningitis y sepsis ¹.

S. pneumoniae es una bacteria perteneciente a la familia *Streptococcaceae*, del género *Streptococcus* y su especie *S. pneumoniae*. Es una bacteria Gram positiva comúnmente denominada diplococo y su importancia radica en que es uno de los principales causantes de enfermedades invasoras y no invasoras en niños menores de 5 años y adultos mayores de 60 años. Microscópicamente se caracteriza por estar constituido de una cápsula compuesta de polisacáridos que actúa como el principal factor de virulencia debido a que evita o retarda su ingestión por los fagocitos, cuya diversidad le permite al neumococo clasificarlo actualmente en 100 serotipos ^{2,3}.

Para el control de las enfermedades causadas por neumococo, existen diferentes tipos de vacunas neumocócicas conjugadas (PCV's) constituidas por los serotipos más prevalentes causantes de enfermedad. En México la introducción de la vacuna neumocócica heptavalente (PCV7) constituida por los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, fue gradual en el año 2006 aplicándose sólo en población con alto riesgo de mortalidad infantil de 2 a 23 meses de edad ^{4,5}. Actualmente la vacuna con 13 serotipos (PCV13) que contiene los serotipos de la PCV7 más 1, 3, 5, 6A, 7F y 19A; es la que se utiliza en la Cartilla Nacional de Vacunación ^{4,5}.

Con la introducción de las PCVs, se ha observado un aumento en la prevalencia de serotipos no incluidos en estas vacunas conjugadas, denominados serotipos "no vacunales". Dentro de estos serotipos se considera al serotipo 11A, mismo que ha sido reportado en México por las redes de vigilancia como son el Sistema Regional de Vacunas (SIREVA) a nivel Latino América y el Grupo Interinstitucional para la Vigilancia de Enfermedades Bacterianas Prevenibles por Vacunación (GIVEBPVac) en nuestro país, como causante de enfermedad invasora tanto en población infantil y en adultos ⁶. Debido a esto, es importante estudiar los cambios clínicos, genéticos y de susceptibilidad a los antibióticos que va presentando el serotipo 11A a través de la era de las PCV's, para comprender mejor su virulencia y capacidad de adquirir resistencia a los antibióticos.

II. ANTECEDENTES

II.1 Clasificación

Streptococcus pneumoniae es una bacteria que pertenece al filo *Firmicutes*, la clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia *Streptococcaceae*, del género *Streptococcus* y su especie *pneumoniae*.

II.2 Características microbiológicas

Es una bacteria en forma de coco Gram positivo, que se agrupa en pares (diplococos) o en cadenas y mide de 0.5 a 1.2 micras de diámetro^{7,8}. Es un microorganismo anaerobio facultativo, ya que requiere para su óptimo desarrollo de una atmósfera enriquecida con 5-10% de CO₂ y una temperatura de 37 °C, produce una α-hemólisis en gelosa sangre debido a que posee una enzima alfa hemolisina que degrada la hemoglobina, dando un halo verde alrededor de la colonia cuando se desarrolla en agar sangre⁷. Después de una incubación de 18-24 horas aparecen colonias pequeñas de 1-5 mm de diámetro, elevadas, algunas son mucoides, con bordes regulares. Después de 48 horas presentan un aspecto umbilicado, con una depresión central producida por una autólisis^{7,8}.

S. pneumoniae crece en medios artificiales enriquecidos que aportan los nutrientes necesarios como son el agar soya tripticasa o agar infusión cerebro/corazón con adición de 10% de sangre de cordero. Carece de la enzima catalasa que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en oxígeno y agua, la cual debe ser aportada en forma exógena; en la práctica es proporcionada por la sangre.

La identificación de *S. pneumoniae* se realiza por medio de dos pruebas:

Susceptibilidad a la optoquina:

La optoquina (hidrocloruro de etilhidrocupreína), es derivado de la quinina que se utilizaba contra las enfermedades provocadas por neumococo, es un compuesto al cual *S. pneumoniae* es susceptible en bajas concentraciones (5 µg) e inhibe su crecimiento. La optoquina puede inhibir el crecimiento de otros *Streptococcus* alfa hemolíticos, pero en concentraciones altas es soluble en agua y se difunde rápidamente en el medio. Las células

son lisadas alrededor del disco debido a cambios de tensión en la superficie produciendo un halo de inhibición ⁹.

Solubilidad en bilis:

S. pneumoniae produce enzimas autolíticas que son las responsables de la característica umbilicada de la colonia en cultivos viejos cuando se le adiciona la solución de sales de bilis a la suspensión de la bacteria. La principal enzima autolítica es la N-acetil-murámico alanina amidasa (autolisina), la cual rompe la unión entre el ácido murámico y la alanina del mucopéptido de la pared celular durante la fase estacionaria del crecimiento, acelerando el proceso de lisis. Este proceso está asociado con la disminución de la tensión superficial entre el medio y la membrana celular bacteriana. *In vitro*, existen 2 tipos de sales biliares que producen el mismo efecto sobre la bacteria: el desoxicolato y el taurocolato de sodio, que tienen la capacidad de lisar a *S. pneumoniae*, cuando se le adicionan en solución a la bacteria. Esta prueba puede realizarse 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 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 ⁹.

II.3 Factores de virulencia

S. pneumoniae tiene la capacidad de producir enfermedad por su habilidad para escapar a la fagocitosis y su destrucción por las células fagocíticas del huésped. *S. pneumoniae* produce pocas toxinas, de modo que produce enfermedad debido a su capacidad de replicarse en los tejidos del huésped y generar una respuesta inflamatoria intensa. Los mecanismos patogénicos son los siguientes: ¹⁰

a) Pared celular:

La pared celular de *S. pneumoniae* es una capa importante constituida principalmente por péptidoglicano y ácido teicoico. La integridad de la pared depende de la presencia de numerosas cadenas peptídicas laterales, que están entrelazadas por enzimas (transpeptidasas y carboxipeptidasas). El péptidoglicano está constituido por subunidades alternadas de N-acetil glucosamina y ácido N-acetil murámico enlazadas por puentes peptídicos. El ácido teicoico es un componente importante de esta pared, rico en

galactosamina, fosfato y en colina; esta última sustancia es exclusiva de esta bacteria y cumple una función reguladora importante en la hidrólisis de la pared.

b) Cápsula polisacárida:

Es el factor de virulencia más importante, ya que las cepas capsuladas son capaces de eludir la acción fagocitaria en ausencia de anticuerpos específicos. Todas las cepas de *S. pneumoniae* cuentan con una cápsula de polisacárido, la cual rodea a los componentes de la pared celular. Está compuesta de unidades repetitivas de oligosacáridos, estructura química compartida para la mayoría de los serotipos. Los diferentes tipos de oligosacáridos y las diferencias entre sus uniones es lo que a la fecha permite agrupar a *S. pneumoniae* en 100 serotipos diferentes. La complejidad antigénica capsular explica en parte la elevada incidencia y severidad de las infecciones por este agente.

c) Adhesina:

Es un elemento crucial en la etapa inicial de la infección debido a la capacidad que tiene de adherirse en forma eficiente a células blanco. *S. pneumoniae* establece una íntima interacción con el mucus del tracto respiratorio, se adhiere a la superficie de las células epiteliales y posteriormente es capaz de invadirlas. Como resultado de esta interacción se produce un daño en la actividad de los cilios del epitelio respiratorio, siendo dos enzimas, péptidoglicano N-acetilglucosaminadesacetilasa y atenuador de resistencia a fármacos, que modifica su péptidoglicano. Y lo hacen resistente a los efectos líticos de la lisozima ⁷.

d) Activación del complemento:

La pared celular del neumococo parece activar la vía alterna del complemento. La inyección de péptidoglicano o ácido teicoico separadamente en el espacio subaracnoideo, causa una reacción inflamatoria con características de meningitis bacteriana.

e) Pneumolisina (o neumolisina):

Es una toxina, ya que destruye la membrana de los glóbulos rojos y es la responsable de la α hemólisis que se observa cuando se cultiva *S. pneumoniae* en medios con sangre y en ambiente de anaerobiosis.

f) Neuraminidasa:

Es una enzima capaz de hidrolizar las glucoproteínas y los glucolípidos celulares y por lo tanto juega un papel importante para ayudar a la diseminación y multiplicación de *S. pneumoniae* en los tejidos infectados. Disminuye la viscosidad del mucus que reviste el epitelio respiratorio y altera la estructura de los oligosacáridos, exponiendo los receptores y facilitando la colonización.

g) Proteínas de superficie PspA y PsaA:

Estas proteínas podrían participar en la adherencia inicial a la célula blanco.

h) Autolisina o amidasa:

Estructura de la pared celular de *S. pneumoniae* que hidroliza la capa de peptidoglicano en un sitio específico: entre el ácido N-acetil murámico y el residuo alanina del puente peptídico. La actividad de la amidasa en presencia de colina permite la división celular.

i) Proteasa para IgA:

Las cepas de *S. pneumoniae* producen una proteasa que inactiva a la inmunoglobulina A1 presente en las mucosas, lo que facilita su adherencia y colonización inicial.

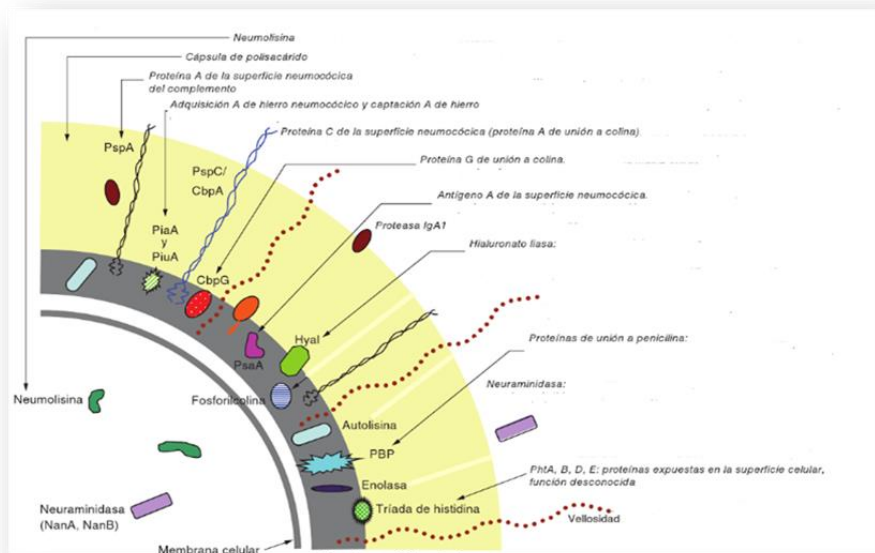


Fig. 1. Factores de virulencia de *S. pneumoniae* de los más importantes: capsula polisacarida, autolisina, neuraminidasa, adhesinas. Tomado de Longo (2012)

II.4 Serotipos de *S. pneumoniae*

Actualmente se han identificado 100 serotipos neumocócicos después de la inclusión de los serotipos 6C, 6D, 11E, 20A/B, 35D, 7D y 10D. Los primeros 80 fueron identificados alrededor de 1957, y los demás en años posteriores. Son parte de la microbiota normal de la nasofaringe, con potencial patogénesis para los humanos cuando llegan a partes del cuerpo normalmente estériles. Los serotipos se distribuyen de forma variable según la región, la edad y el tiempo en que se realiza su vigilancia, además varían en virulencia, invasividad y capacidad de adquirir resistencia a los medicamentos. Reportes de diversos estudios de países europeos antes de la introducción de las vacunas conjugadas tales como Suiza, Francia, y España, muestran que los serotipos más comunes de *S. pneumoniae* en esa región eran el 19A, 3, 19F y 7F^{11,12,13}. En un estudio realizado en América Latina en 2013, muestra la distribución de los serotipos de *S. pneumoniae*, más frecuentes siendo en ese momento el 19A, 3 y 7F¹⁴.

La distribución de los serotipos difiere sustancialmente entre los adultos y los niños. La mayoría de los 100 serotipos raramente causan enfermedades serias. En pacientes pediátricos, al menos 7 serotipos son responsables de la amplia proporción de enfermedades neumocócicas, sobresaliendo el 6A, 14, 19F, 23F y actualmente el 19A, ya que entre todos ellos ocasionan casi el 60% del total de las enfermedades y la magnitud de este impacto varía significativamente, dependiendo del grupo de edad y región geográfica^{15,16}. En contraste, la población adulta es “blanco” de otros serotipos como el 11A, los cuales se detectan en el 31% de las muestras positivas, aunque los tipos de mayor importancia son el 1 al 8, ya que provocan cerca del 70% de las infecciones y casi la mitad de los decesos por neumonía¹⁶.

Serotipificación

La identificación definitiva de *S. pneumoniae* se realiza empleando suero polivalente de conejo conteniendo anticuerpos dirigidos contra los diferentes antígenos capsulares. Este suero se emplea en la reacción de hinchazón capsular de Neufeld. El suero contiene anticuerpos contra 100 serotipos y es producido en el *Statens Seruminstitut* en Dinamarca. La reacción de Neufeld o de hinchamiento capsular es una reacción del suero específico

que contiene los anticuerpos que reaccionan con los polisacáridos capsulares de los neumococos, haciendo evidente o visible la capsula cuando se observa con el microscopio. Franz Neufeld publicó en 1902 el descubrimiento de este fenómeno que también se conoce como reacción de “Quellung” que significa hinchazón o engrosamiento ¹⁷.

II.5 Prevalencia de la enfermedad

Las enfermedades causadas por *S. pneumoniae* son un importante problema de salud pública. El neumococo es responsable de al menos la mitad de todas las neumonías y otitis media adquirida en la comunidad, además de ocasionar conjuntivitis y sinusitis denominadas como enfermedades neumocócicas no invasoras (ENNI), y continúa siendo una causa importante de bacteremia y meningitis a las que se les denomina enfermedades neumocócicas invasoras (ENI) ¹⁸. La Organización Mundial de la Salud (OMS) que mencionan los datos del año 2008 en donde se estima que 476 000 niños menores de 5 años en el mundo murieron debido a infecciones neumocócicas, que corresponde al 5% de mortalidad infantil que fueron debidas a *S. pneumoniae* ¹⁹.

S. pneumoniae junto con *N. meningitis* constituyen los agentes más frecuentes de meningitis en el adulto. Esta enfermedad se produce como resultado de una bacteriemia o por su diseminación hacia focos cercanos (senos paranasales, oído medio). *S. pneumoniae* además es el agente más frecuente de neumonía bacteriana de origen en la comunidad ⁸.

La neumonía es una patología muy frecuente que afecta a todas las edades, su incidencia está relacionada con la estación y puede ser causa de muerte sobre todo en mayores de 65 años. El diagnóstico es clínico, radiológico y microbiológico; en este último, el diagnóstico es confirmado por la identificación de *S. pneumoniae* en las secreciones bronquiales o el hemocultivo ⁸. Antes de la inmunización generalizada con la PCV7, la incidencia anual media de ENI por neumococo en menores de 2 años era de 44.4/100 000 habitantes en Europa, y de 167/100 000 en los Estados Unidos de América (EE.UU.) ²⁰.

En 2006, la OMS estimó que la enfermedad neumocócica mataba al menos a 1.5 millones de personas anualmente y a partir de 2009, representa hasta un millón de muertes por año en niños menores de cinco años (5.4 a 11% del total de muertes para esta población) ²¹.

La incidencia de enfermedades neumocócicas, especialmente de ENI, ha disminuido durante los últimos años, en parte debido a la inmunización de los niños con vacunas conjugadas de neumococo (PCV) ²².

En México, la vigilancia de los serotipos de *S. pneumoniae* y la susceptibilidad antimicrobiana comenzó en 1993, a través de la Red SIREVA coordinada por la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Actualmente se continúa a través del Grupo Interinstitucional para la Vigilancia de Enfermedades Bacterianas Prevenibles por Vacunación (GIVEBPVac), con la aparición de más de 28 hospitales de segundo y tercer nivel distribuidos a través de todo el país ²³. <http://www.insp.mx/lineas-de-investigacion/medicamentos-en-salud-publica/sireva.html> para acceso a datos de GIVEBPVac.

En México, la neumonía adquirida en la comunidad (NAC) afecta a 300 000 pacientes por año; 8 000 de los cuales ocurren en menores de 5 años ¹⁶. En el año 2017 a través de GIVEBPVac, se realizaron un total de 134 aislamientos de neumococos, los cuales 59 (44%) son aislamientos provenientes de casos de meningitis o septicemia, es decir, son causantes de ENI, con lo cual se observa claramente la disminución de este tipo de enfermedades en la población de menores de 2 años, que es la población blanco para la PCV13 ²³.

II.6 Vacunas

Para el control de las enfermedades causadas por *S. pneumoniae*, existen diferentes tipos de vacunas conjugadas constituidas por los serotipos más prevalentes causantes de enfermedad.

En 1977 se autorizó el uso de una vacuna que protegía contra los 14 serotipos más frecuentes de neumococos, abarcando al 80% de las cepas aisladas en Estados Unidos. En 1983, se agregaron a ésta otros nueve serotipos para dar lugar a un total de 23 serotipos diferentes (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F) denominada vacuna neumocócica polisacárida 23 valente (PPSV23). Esta vacuna está constituida por los polisacáridos capsulares de los 23 serotipos más frecuentemente aislados de infecciones. Es especialmente útil para prevenir la enfermedad neumocócica grave en grupos con riesgo incrementado de infección neumocócica como pacientes con enfermedad pulmonar crónica, enfermedad cardiovascular avanzada, diabetes mellitus, cirrosis e insuficiencia renal crónica e individuos de más de 65 años. Un segundo grupo de individuos con riesgo de adquirir infección es aquel integrado por personas con un sistema inmune comprometido como aquellas con infección por VIH,

asplenia, linfoma, mieloma, enfermedad de Hodking, trasplantes, etc. Además de utilizarse en adultos, también puede utilizarse en niños mayores de dos años. Un estudio reciente de efectividad de la vacuna demostró que su efecto protector persiste por 5 años en personas jóvenes sanas, decreciendo rápidamente a medida que aumenta la edad ⁷. Esta vacuna se encuentra como parte del Programa Nacional de Vacunación y se proporciona en forma gratuita en todas las personas mayores de 65 años y a partir de los 60 años en personas con alto riesgo de adquisición de neumonías.

En México la introducción de la PCV7 constituida por los serotipos 4,6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, fue gradual en el año 2006 iniciando en 58 municipios de nueve estados de la República Mexicana por criterio de alto riesgo de mortalidad infantil y con aplicación masiva en población de 2 a 23 meses de edad. Fue hasta el 2007 cuando se incluyó en la Cartilla Nacional de Vacunación. Posteriormente se agregó la PCV10, que incluye los siete serotipos de PCV7 más los serotipos 1, 5 y 7F. Actualmente la vacuna con 13 serotipos PCV13, que contiene los serotipos de la PCV10 más el 3, 6A y 19A, es la que se utiliza en el Programa Nacional de Vacunación, introducida a partir del año 2011 ^{4,5}.

II .7 Reemplazo de serotipos por introducción de PCVs

Posterior a la introducción de las vacunas conjugadas en población pediátrica, se observa una tendencia de “reemplazo de serotipos vacunales” definido por la expansión de los serotipos “no vacunales” preexistentes, como respuesta a la presión de la vacuna ²⁴.

Los resultados de los programas de vigilancia sugieren, que la prevalencia de diversos serotipos de neumococo no incluidos en las vacunas conjugadas va rápidamente aumentando a nivel mundial. Entre estos serotipos se encuentran el 11A, 12F, y los serogrupos 15, 23 y 35 ^{25,26} iniciando aproximadamente dos años después de la introducción de la PCV13 en la Cartilla Nacional de Vacunación, observándose en todas las edades ^{25,26}.

S. pneumoniae tiene la notable capacidad de llevar a cabo la transformación genética para remodelar su genoma a través de la captación e incorporación de ADN exógeno que se utiliza, como competencia natural, de otros neumococos o estreptococos orales estrechamente relacionados, evento que ha dado lugar a la variabilidad de su cápsula y ha facilitado la propagación de la resistencia a los antibióticos ¹².

II.8 Importancia del serotipo 11A

El serotipo 11A de *S. pneumoniae* se está convirtiendo en un serotipo emergente después de la introducción de la PCV7 ²⁷.

Los estudios epidemiológicos del serotipo 11A muestran que es uno de los serotipos menos invasivos y que su interacción con ficolin-2 ofrece un potencial mecanismo que permite su baja invasividad, sin embargo, estudios han mostrado que algunos serotipos encapsulados como el 11A tienen altas tasas de mortalidad en personas sanas. Estas tasas pueden ser comparables a las de los serotipos 19F y 6B, que tuvieron éxito en el periodo pre-vacunal ²⁷. Las causas que determinan el incremento en la incidencia de infecciones neumocócicas debido a serotipos no vacunales, incluyendo al serotipo 11A, son complejas y aún no se entienden completamente ²⁸.

Entre los reportes de la red de vigilancia GIVEBPVac se ha observado el fenómeno de reemplazo de serotipos, particularmente en la población de menores de 5 años, en donde se registran 25 (44%) casos de enfermedades invasoras y no invasoras causadas por serotipos incluidos en la PCV13, y 31(55.3%) causados por serotipos no incluidos en ella. Entre los serotipos de reemplazo que aparecen con mayor frecuencia se encuentran, al igual que lo reportado para el año 2016, los serogrupos 15 y 23, además de la presencia de los serotipos 6C, 11A y 35B ²³. El análisis de la información obtenida de los pacientes y aislamientos se ha convertido en una herramienta importante para entender la dinámica de serotipos no vacunales (NVT) antes y después introducción de la vacuna en una población ²⁵.

La estructura polisacárida del serotipo 11A está compuesta de polímeros lineales (fig. 2) ²⁷.

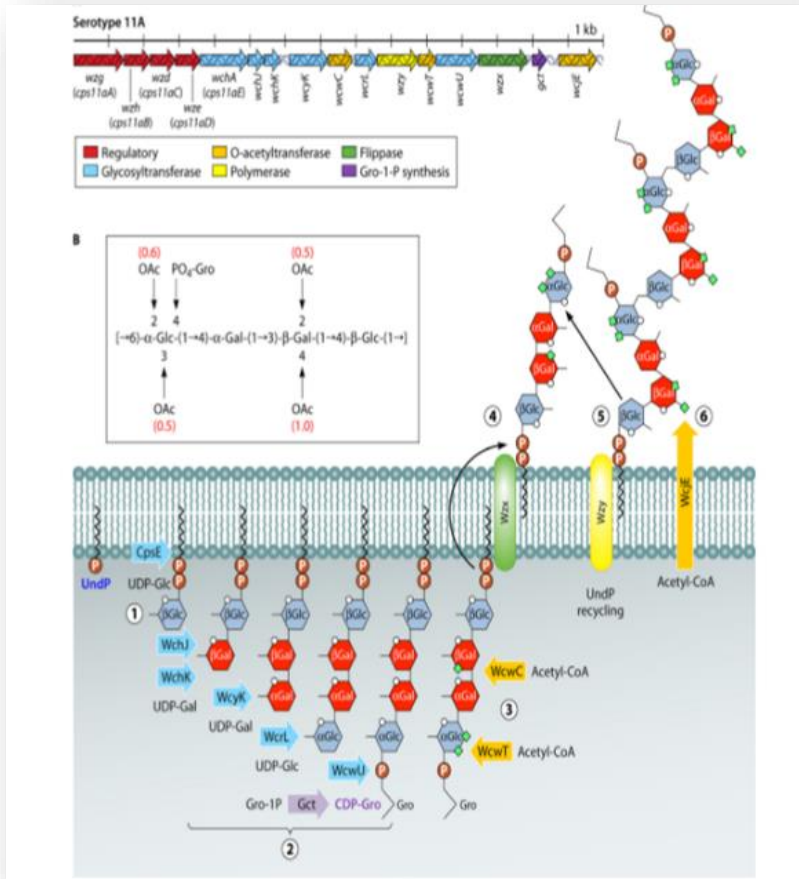


Fig. 2. Estructura de síntesis capsular serotipo 11A de *S. pneumoniae* en donde se indica la síntesis del polisacárido capsular, con ayuda de los genes *dexB* y *aliA* (Tomado de Geno, *et al* 2015).

Estudios revelaron que el serotipo 11A ha sufrido frecuentes eventos de intercambio de ADN, que parecen ser los principales contribuyentes a la diversidad global del genoma de *S. pneumoniae*. La regulación genética de su cápsula es también compleja y es así como algunas cepas pueden experimentar una transformación o cambio de serotipo. Se presenta en cepas con resistencia a los antimicrobianos y asociadas a colonización e infecciones en niños. Estos cambios de serotipo en una cepa ocurren por mecanismo de recombinación genética en que se modifica y reemplaza el locus (parte del genoma) que codifica para la expresión de la cápsula ^{27,28}.

Debido a los grandes avances en las tecnologías moleculares, el estudio del genoma de este microorganismo se ha llevado a cabo utilizando herramientas moleculares tales como

electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE, por sus siglas en inglés,) el cual consiste en un sistema electroforético que separa el DNA total de un microorganismo en forma de zig-zag en campos eléctricos pulsados. La tipificación multilocus de secuencias (MLST) es otra herramienta molecular que se utiliza para caracterizar aislados de especies bacterianas utilizando las secuencias de fragmentos internos de siete genes de mantenimiento; así como la secuenciación masiva del genoma, para la determinación de cambios, en este caso, en los serotipos de neumococo a nivel molecular ²⁶.

Estudios realizados en Colombia con el serotipo 11A gracias a los resultados de PFGE, revelaron que tiene un comportamiento clonal relacionado con la resistencia a la eritromicina ²⁵. Datos obtenidos sobre sus características genéticas pueden ser de importancia para futuras vacunas.

III. JUSTIFICACIÓN

La introducción de las vacunas conjugadas proteínas-polisacáridos (PCVs) en la población pediátrica, ha permitido disminuir las enfermedades invasoras causadas por serotipos de *S. pneumoniae* incluidos en estas vacunas. Sin embargo, después de la introducción de las vacunas neumocócicas, se ha observado el fenómeno denominado “reemplazo de serotipos”, con un importante incremento de serotipos no vacunales, causantes de enfermedad invasora con mayor frecuencia en la población; considerando entre ellos al serotipo 11A.

Debido a los cambios observados en el serotipo 11A, después de la introducción de las PCV's, reportados en diversos países del mundo, y tomando en cuenta que la distribución de serotipos varía dependiendo de la región, del tiempo y de la implementación de las vacunas; se considera necesario llevar a cabo la vigilancia de este serotipo en nuestro país para analizar su tendencia, así como realizar estudios a nivel molecular que nos permitan identificar cambios genéticos que se puedan estar presentando en este serotipo, lo que tal vez le permita permanecer como un patógeno exitoso en la era de las vacunas.

IV. HIPOTESIS

Las cepas del serotipo 11A de *S. pneumoniae*, obtenidas en población mexicana después de la introducción de las vacunas neumocócicas conjugadas, mostrarán variabilidad clonal con respecto a aquellas aisladas antes de su introducción.

V. OBJETIVOS

V.1 OBJETIVO GENERAL

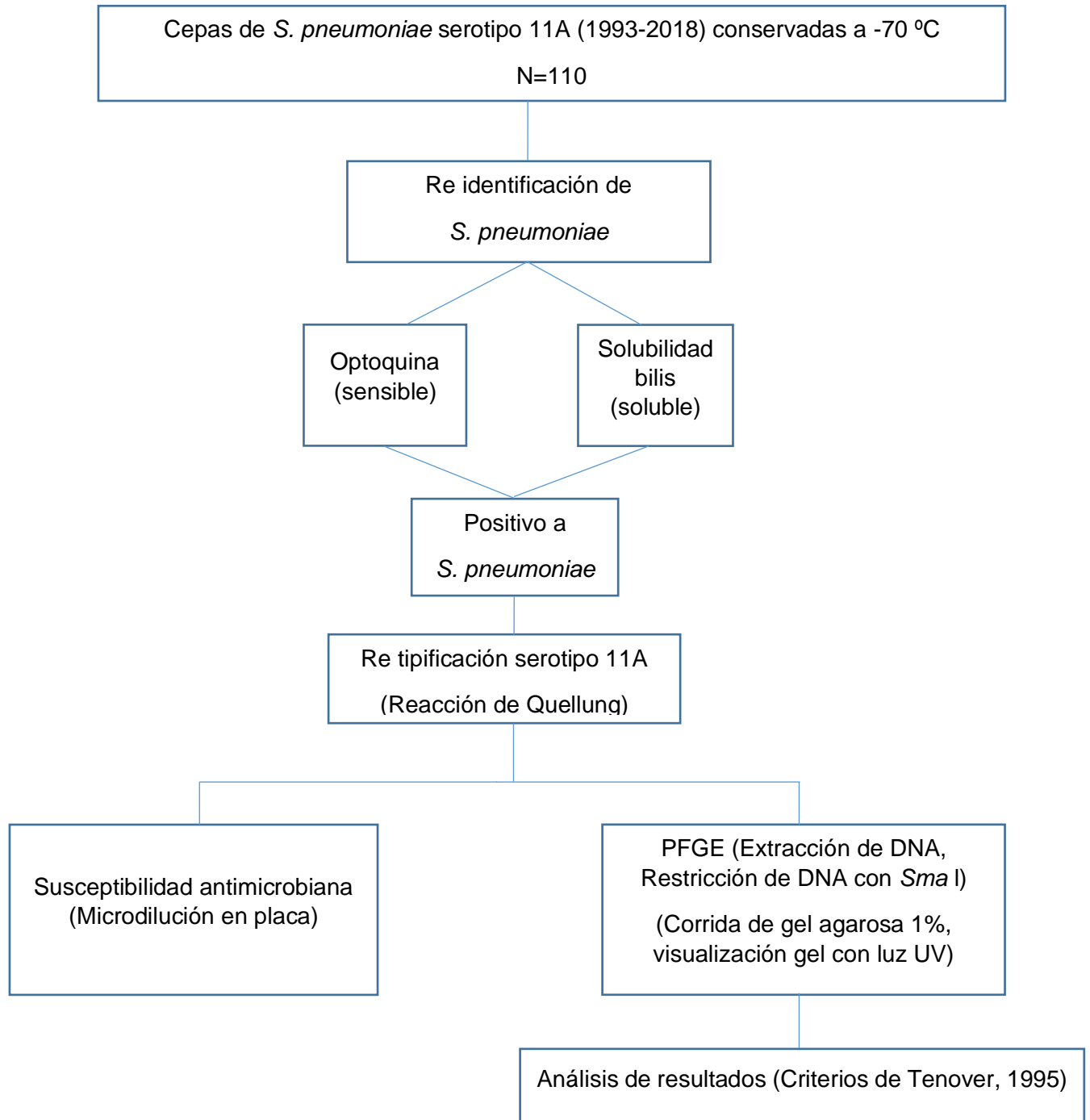
Analizar las características clonales de aislamientos de *S. pneumoniae* serotipo 11A y su relación con aspectos clínicos y epidemiológicos durante el periodo 1993-2018.

V.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Describir las características clínicas y epidemiológicas de cepas de *S. pneumoniae* serotipo 11A aisladas en el periodo de estudio.
- Conocer el perfil de susceptibilidad antimicrobiana del serotipo 11A.
- Determinar los patrones clonales de las cepas y su relación con sus características clínicas y antimicrobianas a través del periodo de estudio.

VI. METODOLOGIA

VI.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VI. 2 Tipo de estudio

Es un estudio retrospectivo, descriptivo y observacional que se realizó con cepas de *S. pneumoniae* obtenidas de la vigilancia pasiva de los serotipos y enfermedades ocasionadas en México en un periodo de 25 años (1993-2018).

Para el análisis de los resultados, este periodo de estudio se dividió en: periodo pre-vacunal (1993-2007) y periodo post-vacunal (2008-2018) según la introducción de las PCV's.

VI.3 Población de estudio

Este estudio se realizó utilizando cepas de *S. pneumoniae* serotipo 11A obtenidas de muestras, tanto de niños y adultos atendidos en distintos hospitales de nivel 2 y 3 distribuidos en diferentes estados de la República Mexicana. Estas cepas se han mantenido desde 1993, inicio de su aislamiento hasta la fecha, en un biobanco congeladas a -70°C en las instalaciones del Instituto Nacional de Salud Pública en Cuernavaca, Morelos.

VI.4 Re identificación de *S. pneumoniae*

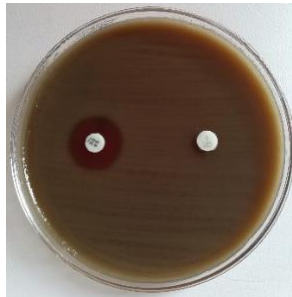
Para fines de este estudio, las cepas se re-identificaron nuevamente para verificar especie y serotipo, para ello se descongelaron las cepas y se sembraron en agar Columbia suplementado con sangre de carnero al 10% y 2% extracto de levadura. Se incubaron a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂ por 18 a 24 horas. Después de este tiempo, se llevó a cabo otra resiembra a partir de una sola colonia para posteriormente realizar las pruebas de identificación mediante las pruebas de optoquina y solubilidad en bilis.

a) Prueba de optoquina:

Esta prueba consistió en utilizar un disco comercial de optoquina (hidrocloruro de etilhidrocupreína) de 5 µg (BD-BBL®) para cada cepa. Este disco de papel de 6 mm de diámetro impregnado con el químico se colocó sobre una placa de agar Mueller-Hinton suplementado con sangre ovina al 5%, previamente inoculada a partir de una colonia pura del aislamiento. Después de incubarla de 18-24 horas a 35°C en CO₂, la placa fue examinada para observar la inhibición del crecimiento alrededor del disco. Para la interpretación de los resultados, se midió el diámetro de la zona de

inhibición del crecimiento microbiano alrededor del disco, se consideró sensible con un halo de inhibición ≥ 14 mm y resistente con un halo de inhibición < 14 mm. *S. pneumoniae* es sensible a la prueba de optoquina, pero las zonas de inhibición inferiores a 14 mm de diámetro son cuestionables para neumococo y se debe confirmar con la prueba de solubilidad en bilis ²⁹

Sensible y positivo para
S. pneumoniae



Resistente y negativo para
S. pneumoniae

b) Solubilidad en bilis:

Se realizó por el método en tubo, el cual consistió para cada cepa a probar, en agregar una suspensión bacteriana en 0.5 ml de infusión cerebro corazón (caldo BHI) BD-BBL[®] más 0.5 ml de desoxicolato de sodio al 10% (0.1 gr de sal biliar en 1 ml de agua destilada estéril) a una turbidez estándar de 0.5-1.0 (2×10^8 UFC/ml) en la escala de McFarland, en un tubo considerado “prueba”, el cual se comparó con otro considerado como “control” conteniendo sólo medio BHI con suspensión bacteriana. La suspensión se incubó a 37°C por un tiempo máximo de 2 horas para confirmar la presencia de *S. pneumoniae*. El resultado de solubilidad en bilis positivo o soluble se consideró cuando se observó claridad en el tubo “prueba” comparado con el “control” el cual debe permanecer turbio ²⁹.

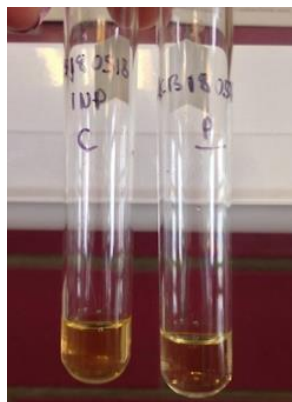


Fig. 3 Prueba solubilidad bilis

Control (C): con bacteria
sin sales biliares

Prueba (P): con bacteria
y sales biliares.
Resultado positivo

VI.5 Serotipificación

La confirmación del serotipo 11A de cepas previamente tipificadas con antisueros específicos (*Statens Seruminstitut* en Copenhague, Dinamarca), se llevó a cabo mediante la reacción de *Quellung*.

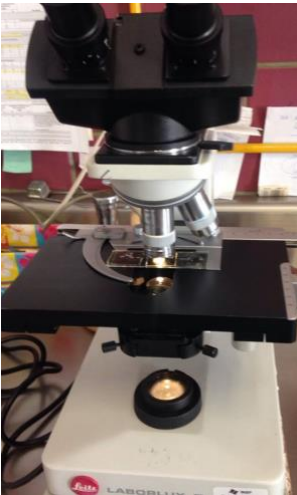


Fig. 4. Observación al microscopio de hinchamiento capsular



Fig. 5. Prueba con antisueros para identificar el serotipo

VI.6 Susceptibilidad antimicrobiana

Se realizó la prueba de microdilución en placa para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antibiótico a probar, de acuerdo a los lineamientos del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ³⁰. Se utilizaron placas de 96 pozos donde se colocaron, primeramente, diluciones en caldo Mueller-Hinton suplementado con sangre de caballo lisada al 6%, de los siguientes antibióticos: penicilina (P), cefotaxima (Ce),

eritromicina (E), cloranfenicol (Cl), vancomicina (Va), y trimetoprim/sulfametoxazol (TMP/SMX) en un rango de 0.015 a 16 µg/ml. Posteriormente, se inoculó con una suspensión bacteriana a una turbidez estándar de 0.5-1.0 en la escala de McFarland. La interpretación de resultados se muestra como sensible, intermedia y resistente dependiendo de los puntos de corte establecidos en el CLSI para cada antibiótico. Se utilizó ATCC 69419 como cepa control.

VI.7 Electroforesis en campos pulsados (PFGE)

Para la determinación del patrón clonal de las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 11A, se realizó la técnica de electroforesis de campos pulsados (PFGE), la cual consistió en obtener y analizar el DNA de la bacteria, a partir de un cultivo puro crecido en una placa con medio de gelosa sangre incubado de 18 a 24 horas a 37°C con 5% de CO₂. Se utilizó como control positivo la cepa R6 de *S. pneumoniae*, siguiendo el mismo procedimiento.

VI.7.1 Crecimiento bacteriano

Para cada muestra, se creció la bacteria (cada cepa) en un tubo conteniendo 6 ml de caldo BHI y se incubó a 37°C con CO₂ por 4-6 horas, tiempo en que se obtuvo el crecimiento de este serotipo dentro de la fase exponencial, evitando muerte celular.

Inmediatamente después de obtener crecimiento bacteriano, se colocaron los 6 ml del caldo BHI en un tubo Falcón de 15 ml, se centrifugó a 3500 rpm durante 30 min a 4°C. Posteriormente, se decantó el sobrenadante evitando tocar el botón celular y se resuspendió en 1ml de buffer PIV pH 8 (NaCl 1M, Tris hidrocloreuro 10 mM), después se centrifugó por 10 minutos a 14 000 rpm a 4°C. La pastilla obtenida se lavó con 500 µl de buffer PIV pH 8; se centrifugó una vez más por 5 min a 14 000 rpm. La pastilla se resuspendió nuevamente en 200 µl de PIV de donde se tomaron 5 µl para cuantificar la concentración de bacteria agregándolos a una celda de espectrofotómetro conteniendo 1 ml de PIV para medir la densidad óptica (DO) a 620 nm, con la finalidad de obtener una concentración uniforme de la bacteria entre 0.05 y 0.15 de DO para cada muestra. Con base en la lectura obtenida, se procedió a ajustar la concentración bacteriana para cada muestra en caso de requerirlo, lo cual se calculó con la siguiente fórmula:

$$V = DO620 \times 40 \times 210 - 210$$

Una vez ajustada la concentración bacteriana, se tomaron 150 μ l de esta suspensión y se colocaron en un tubo para micro centrifuga, el cual se mantuvo a una temperatura de 42° C por 2 minutos. Posteriormente se agregaron al mismo tubo, 150 μ l de agarosa al 1.5% (agarosa SeaPlaque GTG, BioProducts®) mezclando cuidadosamente con agitación.

VI.7.2 Preparación de discos de agarosa

La mezcla anterior se preparó con la finalidad de inmovilizar a la bacteria en la agarosa, dándole a ésta la forma de un disco pequeño, para lo cual se tomaron 20 μ l de esta mezcla y se distribuyó en gotas sobre un vidrio cubierto de plástico encerado (Parafilm®) de manera rápida para evitar la polimerización, posteriormente se cubrieron con un portaobjetos para darle la forma circular semejante a un disco, inmediatamente se incubó a -20°C por 5 minutos. Después de este tiempo, se retiró el portaobjetos y una vez formados los discos de agarosa conteniendo cada uno a la bacteria intacta, éstos se transfirieron a un tubo Falcón de 15 ml.

VI.7.3 Extracción de ADN

Una vez colocados los discos de agarosa en el tubo, se adiciono 1 ml de solución de lisis EC (Tris 1M pH 8, NaCl, EDTA 0.5M pH 8, desoxicolato de sodio (sigma), Brij 58 (Sigma®) y se incubaron a 37°C por 3 horas. Posteriormente se decantó el líquido con ayuda de una gasa que permitía detener los discos para no perderlos y se adicionó 1 ml de solución ESP (EDTA pH 9, sarcosil, proteinasa K 30u/mg) para liberar el ADN nuclear al medio y digerir las proteínas. Se incubó a 50 °C durante 17 horas en baño María. Transcurrido ese tiempo se eliminó la solución ESP de cada tubo. Se llevó a cabo el lavado de los discos con buffer, adicionando 13 ml de buffer TE (Tris-EDTA)1x, incubando por 1 hora con agitación suave, este paso se repitió 5 veces con el fin de quitar exceso de las soluciones utilizadas. Se mantuvieron los discos con el ADN a 4°C para su posterior restricción.

VI.7.4 Restricción del DNA con enzima *Sma* I

Para cada muestra, se tomó un disco conteniendo el ADN y se colocó en un tubo para micro centrífuga de 1.5 ml con 500 μ l de buffer de restricción Pre*Sma*I más β -mercaptoetanol. Los discos se incubaron a 25°C por 1 hora, después se decantó el buffer y se agregaron 50 μ l de buffer de restricción más la enzima *Sma*I a una concentración de 15 unidades por disco. Se incubó toda la noche a 25°C. Al terminar el tiempo de incubación, se agregaron 10 μ l de buffer de carga para detener la reacción de restricción y se equilibró por al menos 10 minutos manteniéndolo a 4°C antes de ser colocado en el gel para la electroforesis.

VI.7.5 Electroforesis

Los discos se corrieron en un gel de agarosa al 1% (agarosa Sea Kem LE, BioProducts®) y buffer TBE 1x con las siguientes condiciones de corrida del gel: tiempo inicial 1 s, tiempo final 30 s, 6.0 volts y tiempo de corrida 23 horas.

El gel se tiñó con bromuro de etidio durante 40 minutos. Después se fotodocumentó utilizando un transiluminador con luz ultravioleta y se analizaron los resultados.

VI.7.6 Interpretación de los resultados

Los patrones de fragmentos de DNA generados por PFGE observados en gel, se interpretaron de acuerdo a los criterios de Tenover, 1995 ³¹, categorizando a las cepas en indistinguibles, estrechamente relacionadas, posiblemente relacionadas y diferentes.

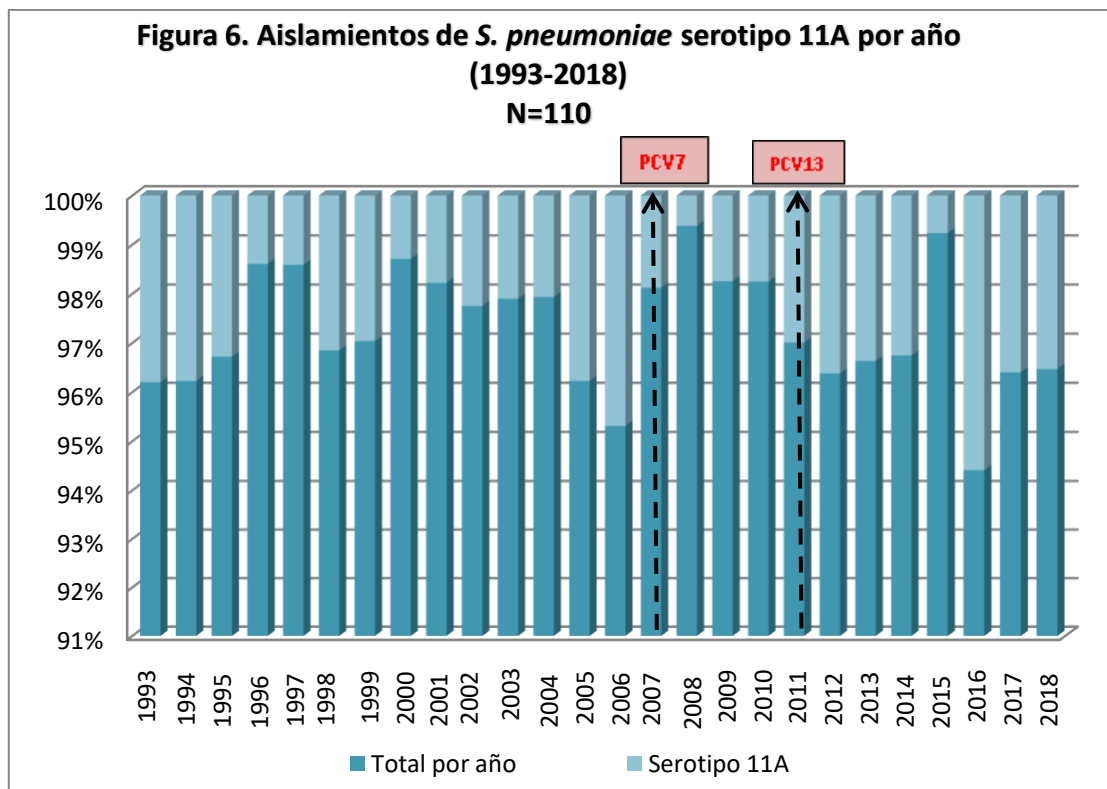
Se utilizó el programa Gel Compar II para la obtención de un dendrograma con la finalidad de obtener el porcentaje de similitud entre los patrones de fragmentos de DNA obtenidos de cada cepa.

VII. RESULTADOS

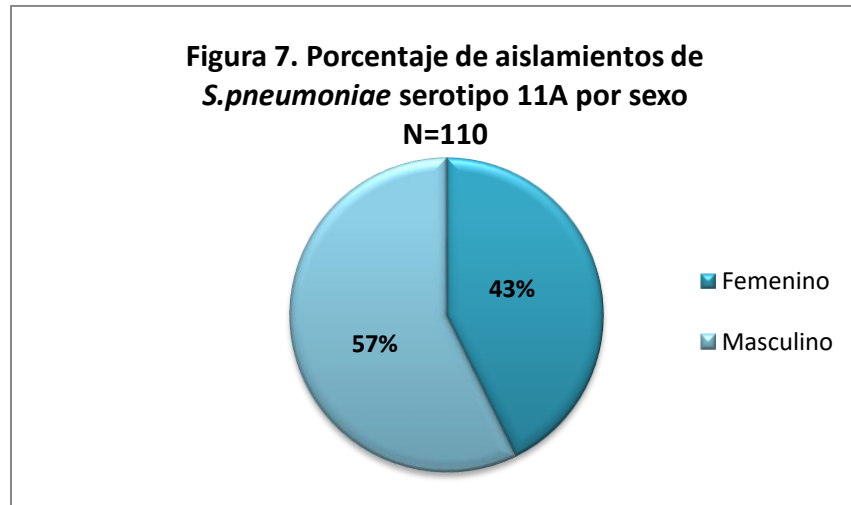
VII.1 Características clínicas y epidemiológicas

Durante el periodo 1993-2018 se aislaron 4016 cepas de *S. pneumoniae*, de las cuales 110 (2.7%) correspondieron al serotipo 11A, con 49 aislamientos (44.5%) correspondientes al periodo prePCV y 61 (55.4%) al postPCV.

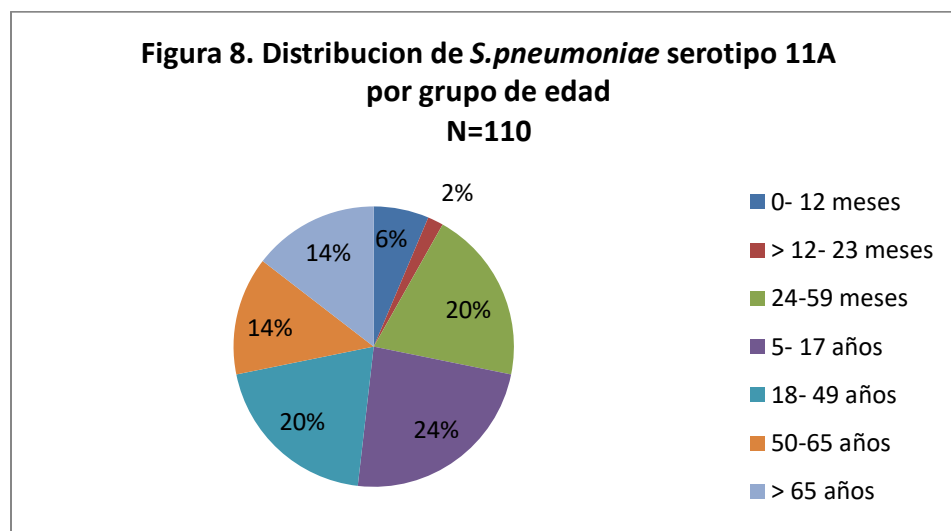
En la figura 6 se muestra el total de aislamientos de *S. pneumoniae* por año indicando además el porcentaje correspondiente del serotipo 11A. Las líneas punteadas indican el año de introducción de la vacuna PCV7 en el 2007 y PCV13 en el 2011.



De un total de 110 (100%) cepas colectadas, el 43% (47/110) correspondió al sexo femenino y 57% (63/110) al sexo masculino (figura 7).

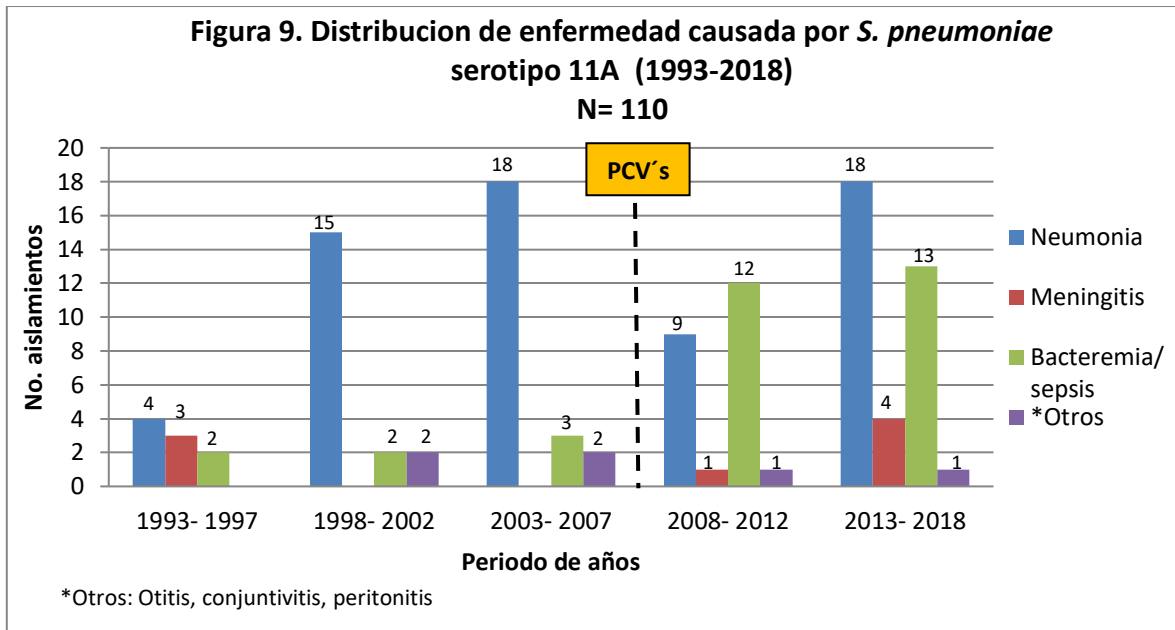


La edad de los pacientes que presentaron enfermedad por el serotipo 11A, se analizó dividiéndola en 7 grupos, comprendiendo un rango de 0 meses a más de 65 años como se muestra en la figura 8. El grupo de edad de 5-17 años tuvo un 24% de aislamiento del serotipo 11A, siendo este el porcentaje más alto de aislamiento, los grupos de edad de 24-59 meses y de 18-49 años mostraron ambos un 20% de aislamiento del serotipo 11A, siendo este el segundo porcentaje más alto, mientras que en el grupo de 12 a 23 meses se obtuvo el 2% de enfermedad por este serotipo.

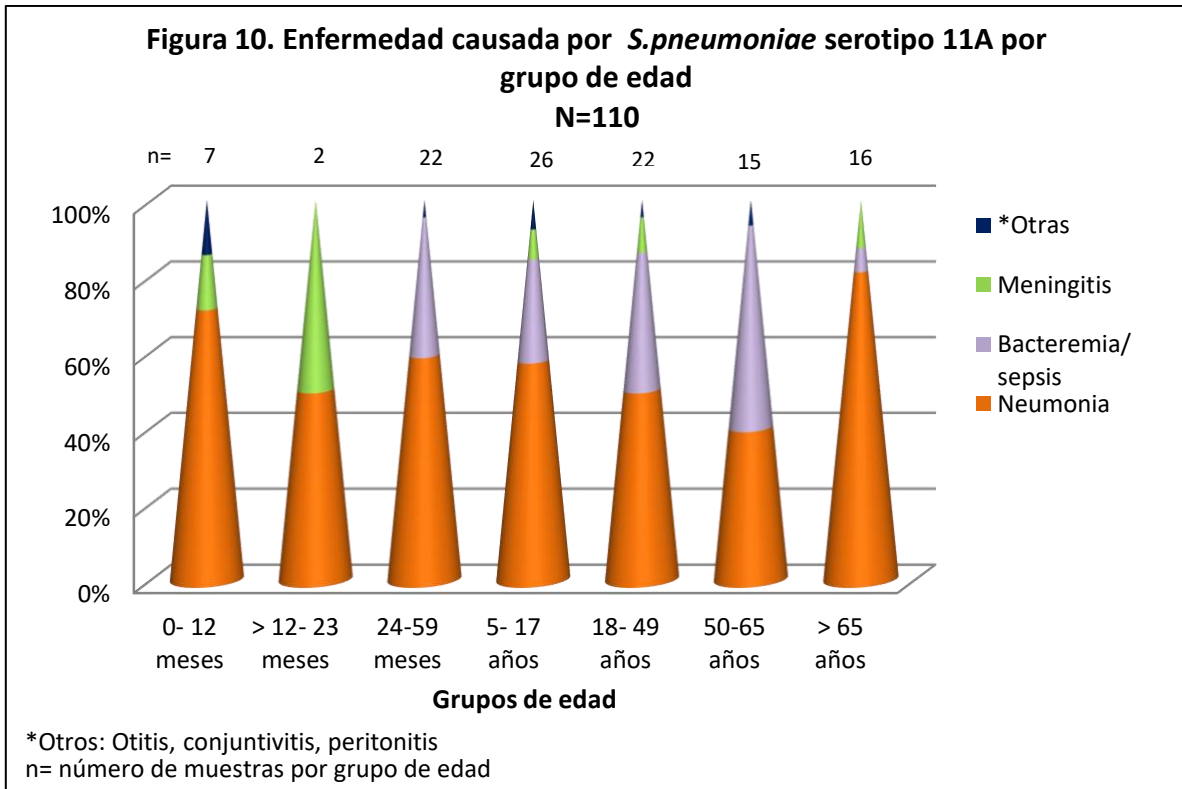


Con respecto a las enfermedades que causa el serotipo 11A, se obtuvo una prevalencia del 72.5% (37/51) de neumonía, 13.7% (7/51) de sepsis/bacteremia, 5.9% (3/51) de meningitis

y 7.8% (4/51) de otras enfermedades en el periodo pre vacunal. Mientras que en el periodo post vacunal se obtuvo un 45.7% (27/59) de neumonía, 42.4% (25/59) de sepsis/bacteremia, 8.5% (5/59) de meningitis y 3.4% (2/59) de otras enfermedades (figura 9).

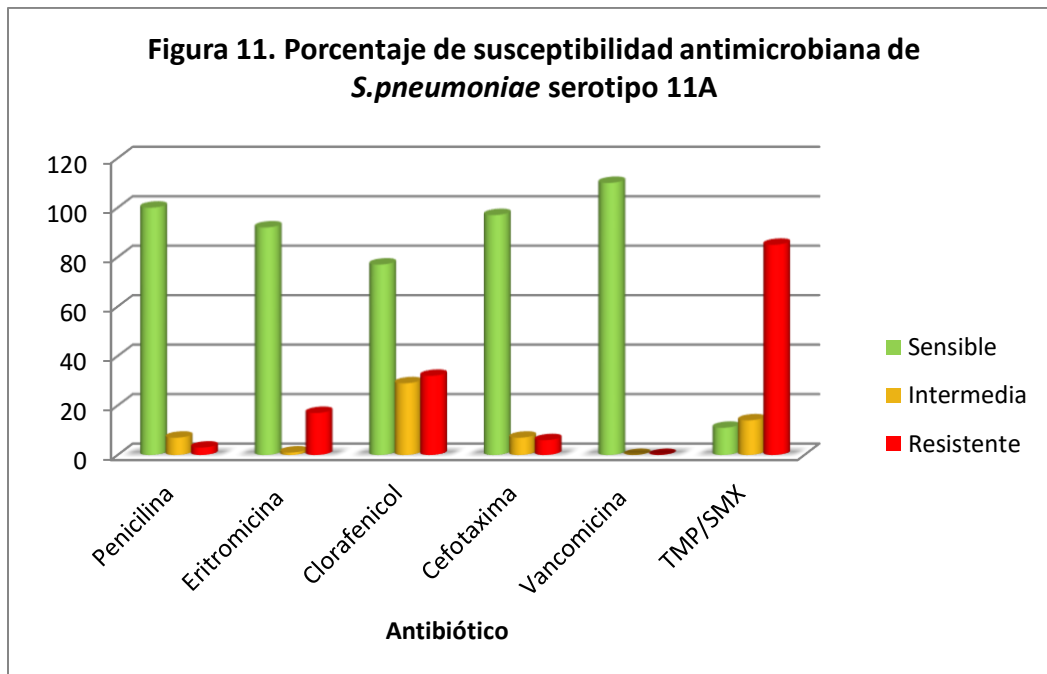


En la figura 10 se muestra que el mayor porcentaje de casos de enfermedad está asociado a neumonía que se presenta en un 81.3% (13/16) principalmente en adultos mayores de 65 años de edad, seguido por bacteriemia/ sepsis en un 36.5 % en el rango de edad de 24 meses- 65 años de edad, con un aumento significativo ($p=0.0008$) en el periodo post-vacunal; casos de meningitis se observaron principalmente en los rangos de edad de 5-49 años en un 8.3% (4/48) y en mayores de 65 años de edad con 12.5% (2/16); otros diagnósticos se observaron en el grupo de 5-17 años de edad en un 7.7% (2/26).



VII.2 Susceptibilidad antimicrobiana del serotipo 11A de *S. pneumoniae*

En la figura 11 se muestra la susceptibilidad del serotipo 11A a los diferentes antibióticos probados, observando en general un 90.9% de sensibilidad a penicilina, 88.2% a cefotaxima, 83.6% a eritromicina, 70% a cloranfenicol y 100% a vancomicina; mientras que para el TMP/SMX presenta el 97.7% de susceptibilidad disminuida a este antibiótico.



En el periodo pre-vacunal se obtuvo menos resistencia hacia los antibióticos de los cuales penicilina 2.0% (1/49), eritromicina 8.2% (4/49), Cloranfenicol 22.4% (11/49), cefotaxima 2.0% (1/49) y TMP/SMX 79.6% (39/49). Mientras que para vancomicina fue 100% sensible.

En el periodo post-vacunal se obtuvo la mayor cantidad de cepas con susceptibilidad disminuida y resistentes hacia todos los antibióticos, a excepción de vancomicina que mantuvo su sensibilidad al 100%; presentando a penicilina 16.3% (10/61), eritromicina 22.9% (14/61), cloranfenicol con 34.4% (21/61), cefotaxima 21.3% (13/61), TMP/SMX 98.3% (60/61).

VII. 3 Patrones clonales de las cepas y su relación con sus características clínicas y antimicrobianas a través del periodo de estudio.

Se presenta el análisis de 110 cepas procesadas por PFGE para determinar su patrón clonal de las que se muestra un gel representativo en la figura 6, en donde se observan los diferentes patrones clonales del serotipo 11A obtenidos mediante los criterios de Tenover y cols. (1995), encontrando 3 patrones clonales, los cuales se diferenciaron asignándoles una letra de forma arbitraria: A con 16 subtipos (A1-A16) presente en 46 cepas durante el periodo pre-vacunal y 45 en el post-vacunal, B con 3 subtipos (B1-B3) en 14 cepas sólo en el periodo post-vacunal y C con 2 subtipos (C1-C2) en 3 cepas en el periodo pre-vacunal y 2 cepas en el pot-vacunal.

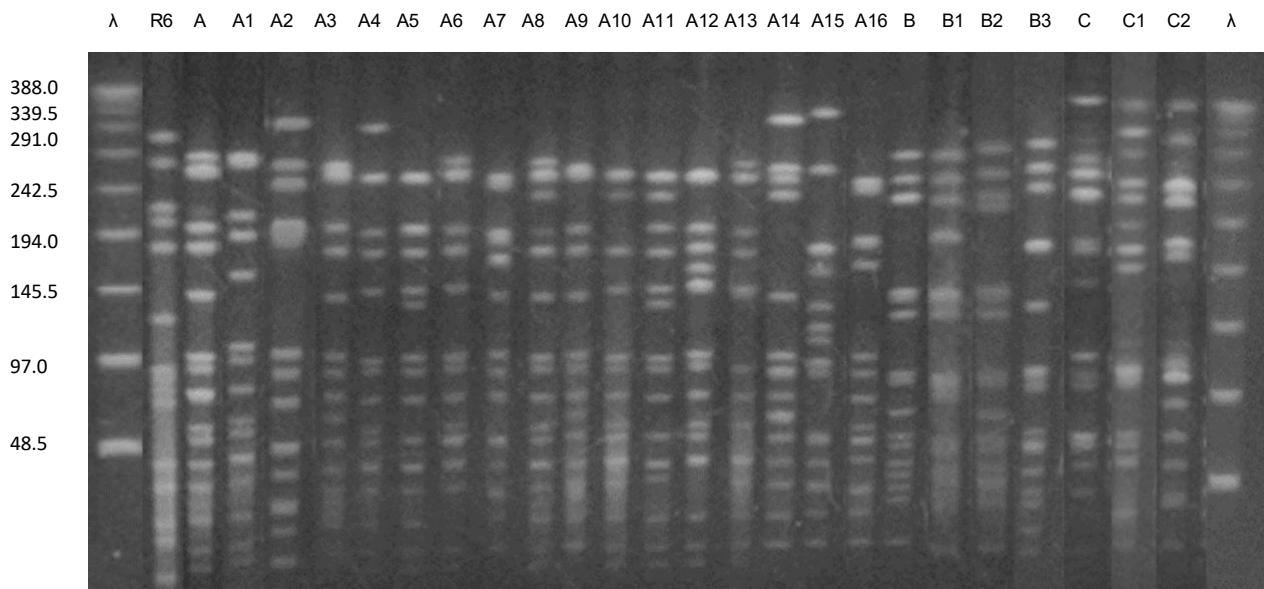


Fig 12. Patrones de PFGE de cepas de *S. pneumoniae* serotipo 11A. Líneas 1 y 27 marcador de peso molecular (λ). Línea 2 R6 cepa control, líneas 3-26 aislamientos del serotipo 11A mostrando los diferentes patrones clonales de acuerdo a los criterios de Tenover (1995).

La figura 13 corresponde a el dendrograma obtenido a partir de los diferentes patrones clonales identificados del serotipo 11A de *S. pneumoniae*, donde se muestra el porcentaje de similitud entre ellos. Se observa un mayor porcentaje de similitud entre la clona A y sus subtipos, en su mayoría en un rango de 80 a 96%, entre la clona B y subtipos de 72 a 90% y entre la clona C y subtipos 65% de similitud en promedio entre ellos. La relación entre la clona A, B y C es menor al 60%.

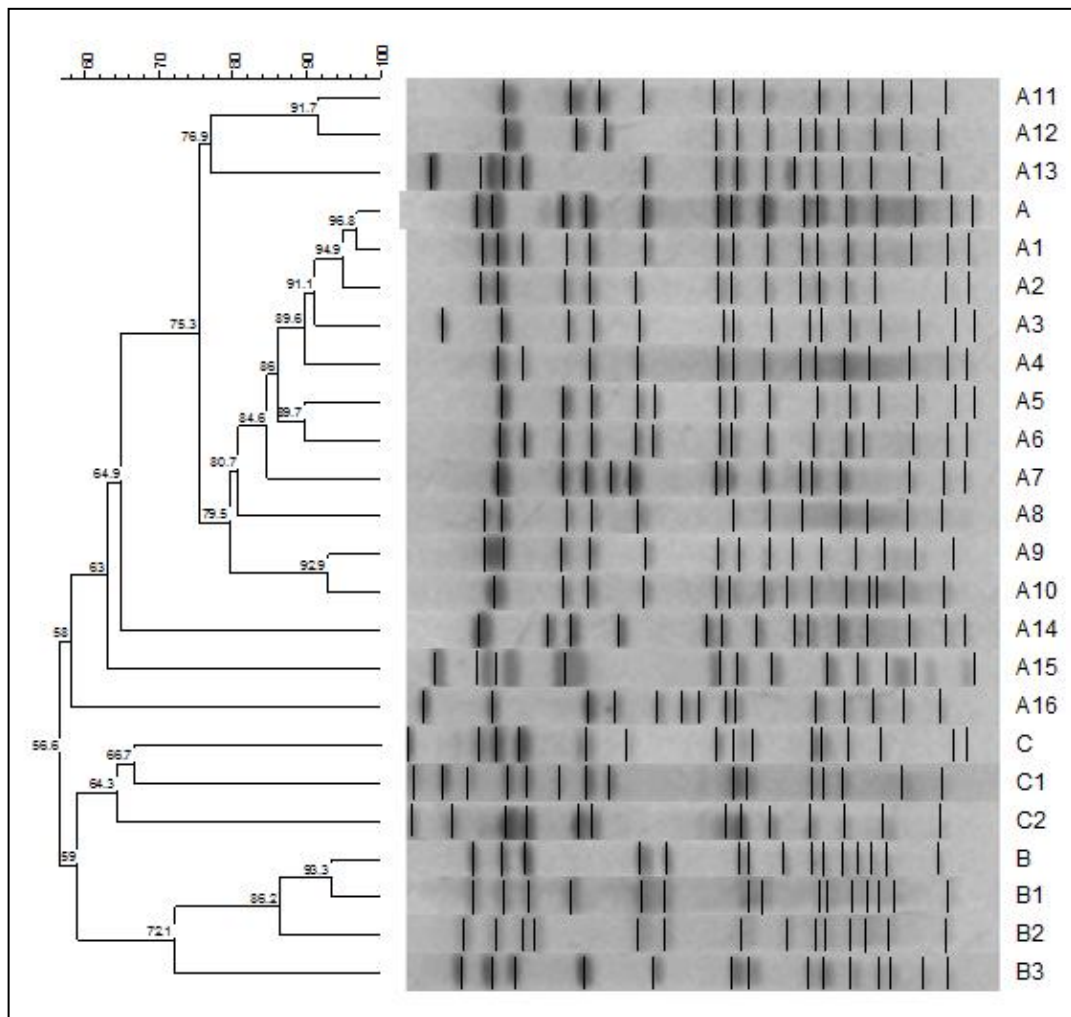


Fig. 13. En este dendrograma se muestra un porcentaje de similitud entre las clonas identificadas del serotipo 11A de *S. pneumoniae*.

La clona A mayoritaria y sus subtipos se encontraron distribuidos en ambos periodos vacunales, en el periodo pre-vacunal estuvo presente en grupos de edad menores de 18 años y de 18-79 años en cepas ocasionando neumonía en 85%.

En el periodo post-vacunal esta clona estuvo presente en cepas responsables del 48% de neumonía.

La clona B se identificó a partir del periodo post-vacunal, en cepas aisladas en más del 57% en población infantil, ocasionando el 64% de neumonía, 21% de bacteremia y 7% de meningitis.

La clona C estuvo presente en el periodo pre-vacunal y con sólo un subtipo y con diagnóstico de neumonía y bacteremia; en el post- vacunal se identificó un subtipo diferente ocasionando bacteremia.

La tabla 1 muestra la relación entre las clonas y su susceptibilidad a los diferentes antibióticos probados, observando en el periodo pre-vacunal 1993-2007 que la clona A y sus subtipos fueron 100% sensibles tanto a penicilina, cefotaxima, cloranfenicol y vancomicina; 91.3% sensibles a eritromicina y 84.8% con susceptibilidad disminuida a TMP/SMX.

La clona C presentó 100% de sensibilidad a los 6 antibióticos, con excepción del subtipo C1 con susceptibilidad disminuida al TMP/SMX.

En el periodo post-vacunal 2008-2018, la clona A y sus subtipos siguieron presentando 100% de sensibilidad a penicilina; cefotaxima y vancomicina; 97.8% a eritromicina, 75.6% sensibles y 24.4% con susceptibilidad disminuida a cloranfenicol y el 100% presentó susceptibilidad disminuida a TMP/SMX.

La clona B y subtipos mostró 71.5% de susceptibilidad disminuida a penicilina, 92.9% de resistencia a eritromicina, 71.5% con susceptibilidad disminuida a cloranfenicol, 100% de susceptibilidad disminuida a cefotaxima y TMP/SMX, mientras que a vancomicina 100% sensibles.

El subtipo C2 de la clona C mostró sensibilidad a los antibióticos probados excepto para TMP/SMX con susceptibilidad disminuida.

La multirresistencia en el serotipo 11A después de la introducción de las vacunas, estuvo presente para 5 de los 6 antibióticos probados con excepción de vancomicina; 16.4% (10/61) penicilina, 23% (14/61) eritromicina, 34.5% (21/61) cloranfenicol, 21.3% (13/61) cefotaxima, 98.4% (60/61) TMP/SMX; principalmente en cepas pertenecientes a la clona B.

Tabla 1. Relación del perfil antimicrobiano de cepas de *S. pneumoniae* serotipo 11A y patrón clonal.

Antibióticos	Patrones Clonales																		
	Periodo pre vacunal 1993-2007 n=49									Periodo post vacunal 2008-2018 n=61									
Clona N	A	A1-A16	B	B1	B2	B3	C	C1	C2	A	A1-A16	B	B1	B2	B3	C	C1	C2	
Penicilina																			
S	22	24	0	0	0	0	2	1	0	30	15	1	2	1	0	0	0	2	
SD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	1	1	0	0	0	
Eritromicina																			
S	21	21	0	0	0	0	2	1	0	30	14	0	1	0	0	0	0	2	
SD	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	9	1	2	1	0	0	0	
Cloranfenicol																			
S	17	18	0	0	0	0	2	1	0	24	10	3	1	0	0	0	0	2	
SD	5	6	0	0	0	0	0	0	0	6	5	6	1	2	1	0	0	0	
Cefotaxima																			
S	22	24	0	0	0	0	2	1	0	30	15	0	0	0	0	0	0	2	
SD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	2	2	1	0	0	0	
Vancomicina																			
S	22	24	0	0	0	0	2	1	0	30	15	9	2	2	1	0	0	2	
SD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
TMP/SMX																			
S	0	8	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
SD	22	16	0	0	0	0	0	1	0	30	15	9	2	2	1	0	0	1	

S= sensible

SD= susceptibilidad disminuida

VIII. DISCUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se puede observar que el serotipo 11A de *S. pneumoniae*, está mostrando variabilidad en su comportamiento tanto a nivel clínico, epidemiológico y molecular después de la introducción de las vacunas conjugadas de neumococo en la Cartilla Nacional de Vacunación en nuestro país. Actualmente el serotipo 11A se considera uno de los serotipos de reemplazo que empieza a adquirir mayor importancia debido al aumento en el número de aislamientos, así como al tipo de enfermedad que ocasiona, relacionado cada vez más a enfermedades invasoras como es la bacteremia y meningitis. En el presente estudio se pudo observar que, a través del periodo analizado, este serotipo ha afectado a diferentes grupos de edad de la población estudiada principalmente en el rango de 2 a 50 años, sobre todo después de la introducción de las vacunas conjugadas antineumocócicas; esto difiere en comparación con otros estudios donde reportan la presencia de este serotipo afectando principalmente a niños menores de 5 años de edad³². Un estudio realizado en Brasil por Cazentini, *et al.* 2017³³, muestra el impacto de la introducción de la PCV10/PCV13 en años posteriores, donde se comparan serotipos de reemplazo, observando que el serotipo 11A se presentó con mayor frecuencia en el periodo 2011-2013 causando enfermedad; la misma tendencia se puede observar en este estudio, ya que a partir de la introducción de la PCV13 en nuestro país, se observa una tendencia al aumento de enfermedad invasora ocasionado por el serotipo 11A, principalmente un aumento significativo de casos de bacteremia después de la introducción de las PCV's en niños a partir de 2 años de edad hasta adultos mayores de 60 años; y también una tendencia al aumento de casos de meningitis principalmente en adultos de 30 años y mayores de 70 años, lo que permite visualizar la importancia que va adquiriendo este serotipo, además de los cambios que va presentando en su patrón de susceptibilidad a los antibióticos, donde se observa un aumento en la resistencia, excepto a la vancomicina que aún permanece sensible. Cabe mencionar que este serotipo está incluido en la vacuna 23V que es específica para población adulta, sin embargo, también se observan cambios en este grupo de edad después de la introducción de las PCV's.

Los resultados de clonalidad del presente trabajo, muestran cambios genéticos que tal vez puedan explicar a su vez, los cambios fenotípicos que se están presentando en el serotipo 11A, aun cuando la clonalidad de este serotipo que está circulando en nuestra población es muy estrecha, ya que sólo se identificaron 3 tipos clonales. Sin embargo, la presencia de una clona mayoritaria designada como clona A, se observa muy variable por la presencia

de 16 subtipos, la cual ha estado presente desde inicio de la vigilancia de neumococo en nuestro país, circulando desde el periodo prevacunal y se mantiene en la actualidad susceptible a penicilina, pero presentando una tendencia al aumento de enfermedad invasora, la cual surge después de la introducción y aplicación de las vacunas. La gran variabilidad que presenta puede explicar el cambio que está teniendo este serotipo a través del tiempo como una posible respuesta ante la presión que ejercen las vacunas. Otro cambio más contundente aún, se puede observar con la presencia de la clona B, que se identificó posterior a la introducción de las vacunas principalmente en población infantil, presente en cepas, sobre todo causantes de enfermedad invasora y con mayor resistencia a los antibióticos e incluso mostrando resistencia a 3 o más antibióticos a la vez, denominado multiresistencia, efecto que no se había observado antes de la introducción de las vacunas.

La resistencia observada específicamente en las cepas del serotipo 11A puede ser comparada con los datos que se tienen en general de neumococo, en donde se muestra que la resistencia a β -lactámicos puede ser considerada como una característica de adaptabilidad. El serotipo 11A mostró alta resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol la cual está asociada en neumococo con susceptibilidad disminuida a otros antibióticos como eritromicina y cloranfenicol. Un dato importante con relación a la susceptibilidad antimicrobiana por grupo de edad, es que se tienen los primeros resultados de multiresistencia en 50% de aislamientos del serotipo 11A en población pediátrica.

En cuanto a la diversidad de los patrones clonales identificados para el serotipo 11A, pudiera considerarse como una respuesta al estrés que recibe a múltiples factores como la introducción de las PCVs. El cambio de un patrón clonal altamente conservado a un patrón clonal diferente como lo fue el B postvacunal, podría acreditarse a un intercambio de genes entre este serotipo con otros dentro de el mismo huésped.

Este tipo de resultados nos ayuda a entender el comportamiento que tienen los serotipos con la finalidad de mantenerse y ser exitosos después de una presión de selección como lo es la introducción de vacunas para proteger a la población.

IX. CONCLUSION

Streptococcus pneumoniae es un claro ejemplo de un patógeno capaz de adaptarse a los cambios ocasionados por la presión que ejercen las vacunas, como se mostró en este trabajo durante la era post-vacunal, donde se observó la aparición de un nuevo patrón clonal en los aislamientos del serotipo 11A, lo que tal vez le esté permitiendo además de ser más patógeno, presentar cambios en las tendencias de susceptibilidad a los antibióticos. En el caso de la clona A en la que se mostró una diferencia notoria con el aumento de la diversidad de sus subtipos a partir de la introducción de las vacunas, nos deja ver que el neumococo está manteniendo una posible presión para crear una barrera que le permita persistir como un patógeno exitoso. Es también de considerable importancia que este serotipo pueda ser más propenso a intercambiar material genético con más facilidad que otros y adaptarse de una manera más eficiente. Aunque es importante continuar los estudios con este serotipo.

Limitaciones

No contar con la participación de un mayor número de hospitales, nos limita en la estimación real de la prevalencia del serotipo 11A, así como la falta de recursos suficientes para desarrollar otros estudios de biología molecular como secuenciación y tipificación que complementen la información obtenida en este estudio.

Perspectivas

Se sugiere continuar con este tipo de estudios de vigilancia tanto a nivel clínico como molecular utilizando, además de la técnica de PFGE descrita en este trabajo, otras herramientas como el *Multilocus Sequence Typing* (MLST) para su tipificación molecular, así como de la secuenciación masiva de su genoma que nos ayude a comprender las diferencias que se van presentando a través del tiempo.

X. REFERENCIAS

1. Murray, P. Rosental, K. Pfaller, M. 2006 *Streptococcus*. *Microbiología médica*, Bacteriología. Elsevier. 5: 237.
2. Hortal, M. Camou, T. 2001. Epidemiología molecular de *Streptococcus pneumoniae* molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. *Revista chilena de infectología*. 18: 3-4.
3. Ganaie, F. Saad, J. McGee, L. van Tonder, A. Bentley, S. Lo, SW. Gladstone, R. Turner, P Keenan, J. Breiman, R. Nahm, M. 2020. A new pneumococcal capsule type, 10D, is the 100th serotype and has a large cps fragment from an oral *Streptococcus*. *mBio*. 11: e00937-20
4. Secretaría de Salud México. Vacunación Universal y Semanas Nacionales de Salud, Lineamientos generales (2008). Centro Nacional para la Salud de la Infancia y Adolescencia. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud consultado.
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/268975/Manual_Vacunacion2008-2009b.pdf
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/416064/Lineamientos_Generales_PVU_y_SNS_2019.pdf
5. Ortega, D. Ferreira, E. Trejo, B. Téllez, MM., Ferreyra, L. Hernández, M. *et al*. 2013. Cobertura de vacunación en niños y adolescentes en México: esquema completo, incompleto y no vacunación. *Salud Publica México*. 2: S289-S29.
6. Informe Regional de SIREVA II, 2011. Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* en procesos invasores. Washington, D.C.: OPS, 2012.
7. Prado, V. 2001. Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*. *Revista Chilena Infectología* .18: 1.
8. Rodriguez, G. y Pardo, L. *Streptotoccus pneumoniae*.
<http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Streptococcus%20pneumoniae%20cap%EDtulo%20de%20libro.pdf>
9. Programa de vigilancia de los serotipos y resistencia antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* y *Hemophilus influenzae*. 2004. Instituto Nacional de Salud Pública.
10. Weiser, J. Ferreira, D. y Paton, J. 2018. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol*. 6: 355-367.
11. Angoulvant, F. Cohen, R, Doit, C. Elbez, A, Werner, A., Béchet, S. y Levy, C. 2015. Trends in antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* isolated from nasopharyngeal flora in children with acute otitis media in

- France before and after 13 valent pneumococcal conjugate vaccine introduction. *BMC Infectious Diseases*, 15: 236.
12. Del Amo, E. Esteva, C. Hernández, S. Galles, C. Navarro, M. Sauca, G., y Ciruela, P. 2016. Serotypes and clonal diversity of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in the era of PCV13 in Catalonia, Spain. *PLoS one*. 3.
 13. Chappuy, H. Keitel, K. Gehri, M. Tabin, R. Robitaille, L. Raymond F. y Lacroix, L. 2013. Nasopharyngeal carriage of individual *Streptococcus pneumoniae* serotypes during pediatric radiologically confirmed community acquired pneumonia following PCV7 introduction in Switzerland. *BMC Infectious Diseases*, 13: 357.
 14. Informe Regional de SIREVA II, 2014. Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* en procesos invasores. Washington, D.C.: OPS, 2015.
 15. Hausdorff, W. Bryant, J. Paradiso, P. Siber, G. 2000. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: Implications for conjugate vaccine formulation and use, part 1. *Clin Infect Dis*. 30:100-21.
 16. Garza, R. Ovalle, M. y Perea, M. 2009. La actual importancia clínica de *Streptococcus pneumoniae*. 3: 49-56.
 17. Habib M, Porter BD, Satzke C. Serotipado capsular de *Streptococcus pneumoniae* usando la reacción de Quellung. *Revista de experimentos visualizados: Jove*. Febrero de 2014 (84): e51208. DOI: 10.3791 / 51208.
 18. OMS. Parte epidemiológico semanal [Internet]. 2008. 42: p. 373–84. disponible en: <http://www.who.int/immunization/>
 19. OMS. Vacunas antineumococicas: Documentos de posición de la OMS. 2012. 87: 129-144.
 20. World Health Organization. 2007. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization—WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 82:93–104.
 21. Campins Martí M. Vacunas antineumocócicas. Nuevas vacunas conjugadas para el adulto [Pneumococcal vaccines. New conjugate vaccines for adults]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015 Nov; 33(9):617-24. Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2015.09.002.
 22. Carnalla, N. Soto, A. Velázquez, M. Hernandez, M., Echániz, G. 2017. Datos por sexo y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus Influenzae* y *Staphylococcus aureus* en procesos infecciosos. GIVEBPVac (Grupo Interinstitucional para la Vigilancia de

Enfermedades Bacterianas Prevenibles por Vacunación). Instituto Nacional de Salud Pública.

<http://www.insp.mx/lineas-de-investigacion/medicamentos-en-salud-publica/sireva.html>

23. Hanage, W, P. 2007. Serotype replacement in invasive pneumococcal disease: Where do we go from here?. *The Journal of Infectious Diseases*. 196:1282-4.
24. Kaplan, S. Barson, W. Lin, P. L., Romero, J, R., Bradley, J, S., Tan, T, Q., *et al.* 2013. Early trends for invasive pneumococcal infection in children after the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 32:203-7.
25. Palacios, P., Duarte, C., Sanabria, O., Moreno, J. 2017. Caracterización molecular de los serotipos no vacunales 11A, 15 B/C y 23A de *Streptococcus pneumoniae* recuperados de aislamientos invasivos en Colombia. *Biomédica*. 3: 390-396.
26. Zartler ER, Porambo RJ, Anderson CL, Chen LH. 2009. Structure of the Capsular Polysaccharide of Pneumococcal Serotype 11A Reveals a Novel Acetylglucosamine That Is the Structural Basis for 11A Subtypes. *J. Biol. Chem*. 11: 7318-7329.
27. Camilli, R. Bonnal, R. Del Grosso, M. Iacono, M. Corti, G. Rizzi, E. Marchetti, M. Mulas, L. Iannelli, F. Superti, F. Oggioni, MR. De Bellis, G. Pantosti, A. 2011. Complete genome sequence of a serotype 11A, ST62 *Streptococcus pneumoniae* invasive isolate. *BMC Microbiol*. 11: 25.
28. Kontiainen, S. y Sivonen, A. 1987. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from blood and middle ear fluid. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 4: 422-424.
29. Malbrán, C. 2012. Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. 32: 2.
30. Arbeit, R. Goering, R. Mickelsen, P. Murray, B. Persing, D. y Bala, S. 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 33. p.2233–2239.
31. Kim, L. 2016. Biological and Epidemiological features of Antibiotic Resistant *S. pneumoniae* in Pre and Post conjugate Vaccine Eras: United States Perspective. *Clin Microbiol Rev*.
32. Czentini, I. Grassi, S. Leopoldo, M. Silva, P. Manchado, A. Andrade, D. 2017. Distribution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes in the northeast macro-region of São Paulo state/Brazil after the introduction of conjugate vaccine. *BMC Infectious Diseases*. 17:590.

ANEXO. Medios de cultivo y soluciones utilizados

Medios de cultivo

Agar sangre de cordero 5%

Composición química

La composición química de la base tripticasa de soya con extracto de levadura es la siguiente:

Triptona 14.0g

Peptona 4.5g

Extracto de levadura 4.5g

Cloruro de sodio 5.0g

Agar 12.5g

Agua destilada 1000 ml

pH final 7.3 ± 0.2

Preparación

Suspender 40g en un litro de agua destilada y lleve hasta ebullición para disolver el polvo

Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos

Mantener a 50°C (baño María) En forma aséptica se adiciona 5% de sangre de cordero estéril (desfibrinada)

Agar Mueller-Hinton con sangre de cordero

Composición química

La composición química del medio de Agar Mueller-Hinton, es la siguiente:

Infusión de carne 300.0 g

Casaminoácidos 17.5 g

Almidón 1.5 g

Agar 17.0 g

pH final a 25°C 7.2-7.4

Altura final del medio 4mm

Preparación

Disolver 38 g del medio deshidratado en 1 litro de agua destilada o desionizada caliente hasta ebullición para que se disuelva por completo el polvo.

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión (121°C).

Infusión cerebro-corazón (BHI)

Composición química

Infusión cerebro corazón deshidratada es la siguiente:

Infusión de cerebro de ternera 200g

Infusión de cerebro de vacuno 250g

Proteosa peptona 10g

Glucosa 2g

Cloruro de sodio 5g

Fosfato disódico 2.5g

pH final 7.4 ± 0.2 a 25°C

Preparación

Disolver 37 g del medio deshidratado en 1 L de agua destilada o desionizada.

Dispensar según necesidad.

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión (121°C).

Soluciones

PIV buffer

NaCl	29.22 g
Tris 1M pH 8.0	5ml
H ₂ O	500ml
Autoclavear	

Solución EC lisis para preparar 500 ml

Tris 1M pH 8.0	6mM pH 8	5ml
NaCl 1M		29.9 g
EDTA 0.5 pH 8.0	100mM pH 8	100ml
Desoxicolato de Na 0.2%		1 g
Lauril sarcosil Na 0.5%		2.5 g

Brij 58 0.5%	2.5 g
H ₂ O	500 ml

Autoclavear

RNasa A

Disolver 30 mg de RNasa en 3 ml de H₂O y hervir a 100°C por 15 minutos.
Alicuotar y mantener a -20°C.

Solución EC lisis preparar 15 ml

[stock]	[final]
10 mg/ ml RNasa	50 µg/ml
EC	15 ml
Lisozima 20 mg/ml	75 µl
Lisostafina 10mg/ml	75 µl

Solución ES

EDTA	93.1 g
H ₂ O	400 ml
Ajustar a pH 9 con NaOH (>20 g)	
Sarcosil	0.5 g
H ₂ O	aforar a 500 ml

Autoclavear

Solución ESP

ES	15 ml
Poteinasa K	15 mg

Tris 1M pH 7.5

Trizma base	121.1 g
H ₂ O destilada	800 ml

pH 7.5
Ajustar volumen a 1L de agua
Autoclavear

Buffer TE

[final]	[stock]	2L
Tris 10 mM pH 7.5	1M	20 ml
EDTA 1mM pH 8.0	0.5 M	4 ml
H2O destilada		1976 ml

Pres Sma I Buffer de restricción (500 ml)

[stock]	[final]	
Tris 1M pH 8	6.0 mM	3ml
KCl	20 mM KCl	0.745 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	6.0 mM	0.6099 g
H2O destilada		497 ml
Autoclavear		

Sma I Buffer

Buffer preSma I	15 ml
Mercaptoetanol	6.3 µl



Cuernavaca, Morelos a 11 de marzo de 2021

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 la Pasante de Biólogo: **MARIANA BRAVO VIZUETT**, con el título del trabajo: **IDENTIFICACIÓN CLONAL DE SEROTIPO 11A DE *Streptococcus pneumoniae* CAUSANTE DE ENFERMEDAD EN POBLACIÓN MEXICANA.**

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

ATENTAMENTE
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR	FIRMA
PRESIDENTE: DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ	_____
SECRETARIO: DRA. LILJA MONTOYA LORENZANA	_____
VOCAL: M. EN C. ARACELI SOTO NOGUERÓN	_____
SUPLENTE: DR. CUAUHTÉMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA	_____
SUPLENTE: DRA. IRMA GABRIELA ECHANIZ AVILÉS	_____

