

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA**



**SEROTIPIFICACION DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*
AISLADOS DE PROCESOS INVASIVOS EN NIÑOS MENORES
DE CINCO AÑOS INTERNADOS EN HOSPITALES CENTINELA
DE BOLIVIA DURANTE LOS AÑOS 2.000 - 2.005**

ELABORADO POR: ELIZABETH TORRICO HELGUERO

**TRABAJO DIRIGIDO PARA OPTAR EL GRADO DE LICENCIATURA EN
BIOQUÍMICA**

**LA PAZ – BOLIVIA
2.006**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO NACIONAL DE LABORATORIOS EN SALUD-INLASA**



**SEROTIPIFICACION DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*
AISLADOS DE PROCESOS INVASIVOS EN NIÑOS MENORES
DE CINCO AÑOS INTERNADOS EN HOSPITALES CENTINELA
DE BOLIVIA DURANTE LOS AÑOS 2.000 - 2.005**

ELABORADO POR: ELIZABETH TORRICO HELGUERO

**TUTORES: Dra. Teresa Álvarez
Dr. Christian Trigoso A.**

**TRABAJO DIRIGIDO PARA OPTAR EL GRADO DE LICENCIATURA EN
BIOQUÍMICA**

**LA PAZ – BOLIVIA
2.006**

Dedicatoria

A Dios por darme la vida y la oportunidad de crecer
en mi vida espiritual, como profesional.

Al ser más sublime y noble que Dios me ha regalado
"Mi adorada madrecita Nélica"

A papá Enrique por estar siempre conmigo en los
momentos difíciles.

A Gustavo, el compañero de mi vida, por su amor
y apoyo incondicional.

A mis amados hijos Vanesa, Gustavo y Nelilaura,
por ser la razón de mi vida y fuente de inspiración.

A mis queridos hermanos Rolando, Silvia y Yarita
por impulsarme constantemente.

Agradecimientos

A todos mis catedráticos por transmitirme sus conocimientos.

Al Dr. Enrique Udaeta por su acertada dirección, y la oportunidad que me brindó para cumplir con mi meta.

A mis asesores Dra. Teresa Álvarez, Dr. Christian Trígoso por sus sabios consejos y guía constante.

A mi Tribunal Dr. Miguel Estenssoro, Dr. Rolando Sánchez por sus acertadas correcciones.

A todos los profesionales que contribuyeron con su apoyo en el envío de cepas.

A la OPS/OMS por su invaluable apoyo económico.

Al INLASA por permitir la realización de este Trabajo Dirigido en sus instalaciones.

A todos mis amigos y compañeros de trabajo.

A la Dra. Anet Vázquez, por su amistad y ayuda desinteresada.

¡Muchas Gracias a todos!

ANEXOS

4.2.3.7.1.3.5	Transporte y modificación del polisacárido capsular.....	19
4.2.3.7.1.3.6	Genética de la biosíntesis capsular.....	20
4.2.3.7.1.3.7	Estructura Química de algunos polisacáridos de <i>S. pneumoniae</i>	20
4.2.3.8	Análisis antigénico	20
4.2.3.8.1	Antígenos capsulares.....	20
4.2.3.8.2	Antígenos No capsulares.....	21
4.2.3.8.2.1	Polisacárido de la pared celular (C-PS).....	21
4.2.3.8.2.2	Antígeno de Forssman.....	21
4.2.3.8.2.3	Proteína A.....	22
4.2.3.9	Factores de virulencia de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	22
4.2.3.9.1	Cápsula polisacárida.....	23
4.2.3.9.2	Pared celular.....	24
4.2.3.9.3	Proteínas	27
4.2.3.9.3.1	Neumolisina.....	27
4.2.3.9.3.2	Neuramidasa.....	28
4.2.3.9.3.3	Autolisinas.....	28
4.2.3.9.3.4	Otros factores de virulencia.....	28
4.2.3.10	Diagnóstico bacteriológico.....	30
4.2.3.11	Patogénesis.....	31
4.2.3.12	Definición de neumonía.....	32
4.2.3.13	Definición de meningitis.....	32
4.2.3.14	Definiciones operacionales.....	33
4.2.3.15	Definición de enfermedad neumocócica invasiva.....	34
4.2.3.16	Concepto de serología.....	34
4.2.3.17	Concepto de serotipo.....	34
4.2.3.18	Concepto de virulencia.....	34
4.2.3.19	Clasificación de los serotipos de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	35
4.2.3.20	Serotipificación de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	35
4.2.3.21	Profilaxis y prevención.....	39
4.2.3.21.1	Vacuna polisacárida no conjugada 23-valente.....	40
4.2.3.21.2	Vacuna polisacárida conjugada.....	40
4.2.3.21.3	Indicaciones de vacunación.....	41
4.2.3.22	Tratamiento.....	42
4.2.3.23	Epidemiología molecular.....	42

5. DISEÑO METODOLÓGICO	43
5.1 Tipo de investigación.....	43
5.2 Unidad de Análisis.....	43
5.3 Criterios de Inclusión.....	43
5.4 Tipo de muestra.....	43
5.5 Recolección de datos.....	44
5.6 Recolección de cepas.....	44
5.7 Procesamiento de datos.....	44
6. MATERIAL, REACTIVOS, MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS	45
6.1 Métodos	45
6.1.1 Laboratorio centinela.....	45
6.1.2 Laboratorio focal.....	46
6.2.3 Laboratorio de referencia.....	46
6.2 Procedimiento	49
6.2.1 Toma de muestras.....	49
6.2.2 Recolección.....	49
6.2.3 Cultivo y aislamiento de las cepas.....	49
6.2.4 Observación macroscópica.....	49
6.2.5 Tinción de la muestra.....	50
6.2.5.1 Frotis.....	50
6.2.5.2 Tinción Gram.....	50
6.2.5.3 Observación microscópica.....	50
6.3 Pruebas diferenciales confirmatorias	50
6.3.1 Prueba de la catalasa.....	50
6.3.2 Prueba de la optoquina.....	50
6.3.3 Prueba de solubilidad en bilis.....	51
6.3.4 Prueba de Quellung	51
7. RESULTADOS	53
8. DISCUSION	71
9. CONCLUSIONES	77
10. RECOMENDACIONES	79
11. BIBLIOGRAFIA	80

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Morfología de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	13
Figura 2 Componentes de superficie de <i>Streptococcus pneumoniae</i> ...	17
Figura 3 Factores de virulencia de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	25
Figura 4 Funciones de los laboratorios Centinela y Focal.....	47
Figura 5 Función del laboratorio de referencia.....	48
Figura 6 Flujograma de la técnica de Quellung.....	52

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1 Estructura química de polisacáridos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> de importancia clínica.....	26
Cuadro 2 Factores de virulencia de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	30
Cuadro 3 Sistema de tablero de ajedrez para la serotipificación de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , con el empleo de 12 antisueros polivalentes.....	36
Cuadro 4 Factores de los sueros requeridos para subtipificar las cepas que pertenecen a los grupos y patrón de reactividad esperado.....	37
Cuadro 5 Vacunas conjugadas antineumocócicas.....	41

INDICE DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1 Serotipos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , aisladas de muestras de sangre, LCR, líquido pleural, recolectadas por los laboratorios centinela de La Paz, Cochabamba y Santa Cruz, procesadas siguiendo el método de Quellung durante las gestiones 2000 - 2005.....	58
Gráfica 2 Distribución de cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , según lugar de aislamiento.....	59
Gráfica 3 Serotipos predominantes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , aisladas según procedencia.....	60
Gráfica 4 Distribución de cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , según tipo de muestra.....	61
Gráfica 5 Serotipos predominantes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , aislados según tipo de muestra.....	62
Gráfica 6 Distribución de cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , aisladas según sexo.....	63
Gráfica 7 Serotipos predominantes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , según sexo.....	64
Gráfica 8 Distribución de cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , aisladas según grupo étnico.....	65
Gráfica 9 Serotipos predominantes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , según grupo étnico.....	66
Gráfica 10 Serotipos predominantes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , según promedio de edad.....	67
Gráfica 11 Distribución de cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , aisladas según diagnóstico clínico.....	68
Gráfica 12 Serotipos predominantes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , según diagnóstico clínico.....	69
Gráfica 13 Distribución de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , según Hospitales centinela.....	70

INDICE DE TABLAS

	Pág. Anexo
Tabla 1 Cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , recolectadas por los hospitales centinela de las ciudades de La Paz, Cochabamba y Santa Cruz, que fueron serotipificadas en el INLASA y sub. tipificadas en el INS –Colombia siguiendo el método de Quellung durante las gestiones 2000-2005.....	53
Tabla 2 Serotipos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , aisladas de muestras de sangre, LCR y líquido pleural en niños menores a los 5 años, durante las gestiones 2000-2005	7
Tabla 3 Porcentaje de aislamiento <i>Streptococcus pneumoniae</i> , según lugar de procedencia.....	7
Tabla 4 Serotipos predominantes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , según area geográfica.....	7
Tabla 5 Porcentaje de aislamiento de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , según tipo de muestra.....	7
Tabla 6 Serotipos predominantes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , según tipo de muestra.....	7
Tabla 7 Porcentaje de aislamientos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , según sexo.....	7
Tabla 8 Serotipos predominantes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , según sexo.....	7
Tabla 9 Porcentaje de aislamiento de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , según grupo etéreo.....	7
Tabla 10 Serotipos predominantes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , según grupo etéreo.....	7
Tabla 11 Porcentaje de aislamiento de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , aisladas según diagnóstico clínico.....	7

Tabla 12	Serotipos predominantes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , según diagnóstico clínico.....	7
Tabla 13	Porcentaje de aislamiento de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , según Hospitales centinela.....	7
Tabla 14	Serotipos predominantes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , según promedio de edad.....	7

RESUMEN

Las enfermedades invasivas meningitis y neumonías producidas por *Streptococcus pneumoniae* aún continúan siendo un problema muy importante de salud que afecta a la edad pediátrica, especialmente en los países en vías de desarrollo. Varios serotipos de neumococos son los responsables de producir estas enfermedades invasivas, los mismos que varían de acuerdo al tiempo, al área geográfica y la edad.

El presente estudio prospectivo, se realizó con la finalidad de determinar los serotipos circulantes de *Streptococcus pneumoniae* más frecuentes, productores de meningitis y neumonía, durante los años **2.000 – 2.005** en niños **menores a los cinco años** hospitalizados en las salas de pediatría de ocho hospitales centinela de las ciudades de Cochabamba, Santa Cruz y La Paz. La técnica empleada para la serotipificación fue la de **Quellung** o de precipitación de la cápsula.

De un total de 112 aislamientos, **59(52,70%)** correspondieron a **LCR**, **41 (36,60%)** a **sangre** y **12(10,7%)** de **líquido pleural**; la edad de los pacientes osciló entre 0 a 5 años de edad, el **79,50%** pertenecían al grupo comprendido entre **0-25 meses** de edad (menor a 2 años) grupo más afectado por casos de **Meningitis** en un **58,90%** y **41,10%** por casos de **Neumonía**; con un intervalo de confianza de 95% (IC_{95%}) de 70,8 a 86,5. El **promedio** de edad en meses es de **17,5**; una desviación estándar de 16,5; la mediana de 12,5 meses.

Los serotipos encontrados en orden de frecuencia son: **6, 19, 14, 23, 5, 7, 18, 1, 9, 11, 12, 24, 10, 28, 33, 4, 8, 15, 17 y 34**, de los cuales 12 son los más frecuentes; ocupando los serotipos **6(18,80%), 19(17,90%) y 14(15,20%)**, los tres primeros lugares; estos mismos serotipos han sido reportados en otros países del mundo particularmente en países en desarrollo.

Se realizó el estudio analítico, utilizando medidas de asociación estadística de acuerdo a la clasificación de variables principalmente **Chi** cuadrado, la cual mostró que no existía ninguna asociación con los serotipos y el tipo de muestra, procedencia, sexo, edad ni cuadro clínico mostrando un valor **p** de significancia de **0.2111, 0.1096, 0.4187, 0.2953, 0.14215** respectivamente, siendo el valor **p** de asociación **< 0,05**.

Los resultados obtenidos nos dan una visión de los serotipos que están afectando a este grupo etareo, así mismo nos permitirá elaborar estrategias de control y prevención de estas patologías a través de la aplicación a futuro de una vacuna conjugada que contenga los serotipos más predominantes encontrados en estos tres departamentos, sin embargo es necesario continuar con la vigilancia de este patógeno, ampliando el proyecto a todos los departamentos de Bolivia lo cual nos permitirá un mayor conocimiento epidemiológico de la infección neumocócica.

SUMMARY

The invasive diseases meningitis and pneumonias produced by *Streptococcus pneumoniae* still continue being a very important problem of health that affects the pediatric age, specially in the developing countries. Several serotypes of pneumococcus produce these invasive diseases, wich vary according to the time, the geographic area and the age.

The present study prospective was made with the purpose of determining the more frequent circulating serotypes of *Streptococcus pneumoniae* producers of meningitis and pneumonia, wich is during years **2.000 – 2.005**, in children smaller to **five years**, hospitalized in the pediatric rooms of eight sentinel hospitals of Cochabamba, Santa Cruz and La Paz cities. The technique used for the serotyping was the **Quellung** or capsule precipitation.

Of a total of **112 isolations**, **59(52,70%)** corresponded to **LCR**, **41(36,60%)** to **blood** and **12(10,7%)** of **pleural liquid**; the age of the patients oscillated between **0 to 5 years** of age, **79,50%** belonged to the group between **0-25 months** of age (smaller to 2 years) group more affected by cases of **Meningitis** in a **58,90%** and **41,10%** by cases of **Pneumonia**; with an confidence interval of 95% (IC_{95%}) from 70,8 to 86,5. The average of age in months is of 17,5; a standard deviation of 16,5; the medium one of 12,5 months.

The serotypes found in frequency order are: **6, 19, 14, 23, 5, 7, 18, 1, 9, 11, 12, 24, 10, 28, 33, 4, 8, 15, 17** and **34**, of which **12** are the most frequent; occupying serotypes **6 (18,80%),19(17,90%) and 14(15,20%)**, the three first places; the same serotypes have been reported in other countries particularly in developing countries.

The analytical study was made, using statistical association according to the variables classification mainly Chi- square, which showed no association with the serotypes and the type of sample, origin, sex, age nor clinical picture showing a **p** value significance of 0.2111, 0.1096, 0.4187, 0.2953, 0.14215 respectively, being the value **p** of association <0,05.

The obtained results give us a sight of the serotypes that are affecting to this group, as well as it let us to make control and prevention strategies of these pathologies through eventual application of a conjugate vaccine that contains the prevailing serotypes founding in these three departments, nevertheless is necessary to keep going with this pathogen surveillance, extending the project to all the Bolivia's departments wich would give us a biggest epidemiologic acknowledgement of the neumococcic infection.

1. INTRODUCCIÓN

Streptococcus pneumoniae (neumococo), se ubica dentro de las principales prioridades como problema de salud pública tanto en países industrializados como aquellos menos desarrollados. Es responsable de una elevada morbilidad y mortalidad a nivel mundial,⁽¹⁾ causa una gran variedad de cuadros clínicos que van desde infecciones benignas como otitis media y sinusitis agudas, a infecciones severas como endocarditis, meningitis, neumonía y septicemias.⁽²⁾

La neumonía como síndrome afecta aproximadamente a 4 millones de niños menores de cinco años y de un número similar de adultos mayores de 60 años en el mundo, por otro lado con el transcurso del tiempo se ha producido un cambio epidemiológico de las infecciones causadas por este agente con un aumento real de la incidencia sobre todo en infecciones sistémicas como meningitis.^(2,3)

Los principales factores de riesgo señalados por la OPS/OMS (Organización Panamericana de Salud y Organización Mundial de la Salud) son el hacinamiento, déficit de vacunas específicas, ausencia de lactancia materna, bajo peso al nacer, desnutrición, barreras de acceso a la consulta médica, y en algunos casos por déficit de vitamina A. La vía de transmisión de este agente es aérea, a través de gotas de saliva, por contacto estrecho de persona a persona, todas las edades, razas y sexos son susceptibles a la enfermedad.^(2,4,5)

La cápsula polisacárida es el principal factor de virulencia de esta bacteria, actualmente se han descrito 90 serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en base a la composición antigénica de la cápsula, esta variedad fenotípica se observa también a nivel genotípico, recientemente se ha determinado que el gen *Gaaj* es el responsable de la biosíntesis del polisacárido capsular que dan los distintos serotipos, sin embargo la experiencia clínica mundial muestra que son doce los serotipos con mayor impacto clínico, y son: 1,3,4,5,6,7,8,9,14,18,19,23 responsables del 80% o más de las infecciones neumocócicas invasoras.

Los portadores pueden albergar diferentes serotipos al mismo o en diferentes tiempos, de modo continuo o en forma intermitente, varían con el tiempo, el cuadro clínico y la región geográfica, su distribución es diferente en los niños y en los adultos, algunos son aislados en todas las edades, mientras unos cuantos son aislados más frecuentemente en los niños.^(2,3,6)

La identificación de serotipos se realiza mediante reacciones antígeno-anticuerpo, existiendo numerosas técnicas, las más utilizadas son: Reacción de

Quellung, aglutinación de partículas de Látex y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).⁽²⁾

Nuestro país no cuenta con datos respecto a los serotipos circulantes, en la población infantil menor de cinco años que cursan con procesos invasivos, por ello el presente trabajo dirigido pretende realizar un estudio que determine los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* más frecuentes, empleando para tal efecto la técnica de Reacción de Quellung o precipitación capsular utilizando antisueros específicos.

2. JUSTIFICACION

Streptococcus pneumoniae, continua siendo hoy en día, más de un siglo después de su descubrimiento, un patógeno bacteriano capaz de producir enfermedades graves como meningitis y neumonías y otras enfermedades menos graves como otitis, sinusitis, etc.

Siendo que estas enfermedades invasivas constituyen una causa principal de morbilidad y mortalidad infantil tanto a nivel mundial como en nuestro país; en el que se registra alrededor de 200 casos anuales de meningitis bacteriana y 180 casos de neumonías bacterianas, junto a las secuelas graves que se produce en algunas de ellas, hace que resulte importante la prevención de las enfermedades tanto desde el punto de vista de tratamiento como por la posibilidad de actuar preventivamente a través de programas de vacunación, es por esta razón que surge el presente trabajo dirigido como una urgente necesidad de disponer de datos regionales sobre la frecuencia de serotipos circulantes en cepas de *Streptococcus pneumoniae* aislados de Líquido cefalorraquídeo (LCR), Sangre y Líquido Pleural, que afectan principalmente a la población pediátrica menor a cinco años, tomando en cuenta además que el país no cuenta con datos ni estudios que se hubiesen realizado sobre este tema.

El conocimiento de los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que circulan en el país será de gran importancia no solo para evaluar las coberturas de las vacunas que actualmente se están aplicando en otros países, si no también dicha información será de utilidad para el desarrollo a futuro de una vacuna conjugada específica que permita una vigilancia continua en Bolivia, considerando además que las vacunas utilizadas actualmente han sido elaboradas en base a serotipos encontrados en otros continentes, lo cual no significa que necesariamente sean los encontrados en nuestro país, ya que los serotipos varían con el tiempo, la edad y el área geográfica.

Para el siguiente estudio se han seleccionado ocho hospitales que concentran mayor población pediátrica, además de tener capacidad previa instalada clínico-epidemiológica y de laboratorio bacteriológico en el país, ubicados en los departamentos de La Paz, Cochabamba, Santa Cruz, quienes fueron identificados como hospitales centinela para la vigilancia de este microorganismo, cuya función es el aislamiento de cepas, para posteriormente remitirlos al laboratorio coordinador de bacteriología del Instituto Nacional de Laboratorios en Salud – INLASA, quien se encargará de la serotipificación de cepas de acuerdo al sistema de nomenclatura Danés, utilizando la técnica de Quellung o precipitación capsular que es la que actualmente se utiliza a nivel latinoamericano.

Se determino que el laboratorio coordinador para la vigilancia de este microorganismo, sea el laboratorio de bacteriología del INLASA, porque como centro Nacional de Referencia cuenta con la tecnología y experiencia necesaria como para garantizar la calidad de los resultados obtenidos, además de la accesibilidad de obtención de las cepas no solo de la ciudad de La Paz, sino también del interior del país.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

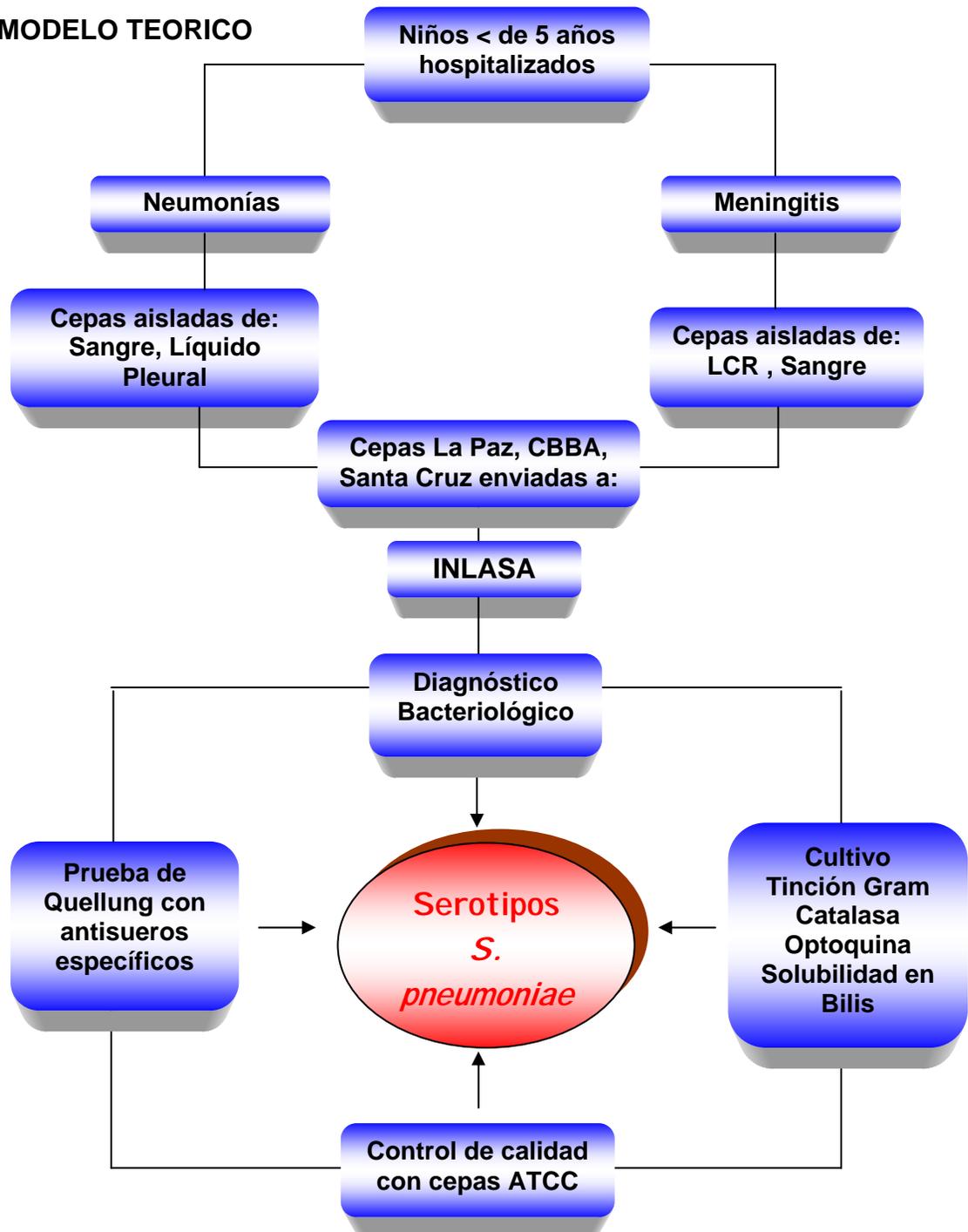
Determinar los serotipos circulantes en cepas de *Streptococcus pneumoniae* aislados de procesos invasivos como neumonía y meningitis en niños menores de 5 años internados en hospitales centinela pediátricos de los departamentos de La Paz, Cochabamba y Santa Cruz de Bolivia desde los años 2000 a 2005

3.2 Objetivos Específicos

- Serotipificar todas las cepas de *Streptococcus pneumoniae* enviadas por los laboratorios centinela empleando el método de reacción de Quellung, utilizando antisueros específicos, previa confirmación de diagnóstico bacteriológico.
- Determinar frecuencia de aislamiento y distribución de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* según tipo de muestra.
- Determinar frecuencia de aislamiento y distribución de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* según lugar de aislamiento.
- Determinar frecuencia de aislamiento y distribución de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* según cuadro clínico.
- Determinar frecuencia de aislamiento y distribución de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* según grupo étnico.
- Determinar frecuencia de aislamiento y distribución de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* según sexo.
- Determinar frecuencia de aislamiento de *Streptococcus pneumoniae* según Laboratorios centinela

4. DISEÑO TEÓRICO

4.1. MODELO TEORICO



Las cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas de procesos invasivos en niños hospitalizados menores de cinco años, serán recolectados y enviadas desde

los laboratorios centinela de La Paz, Cochabamba y Santa Cruz, al laboratorio de Referencia Nacional del INLASA (Instituto Nacional de Laboratorios de Salud), donde previa confirmación de diagnóstico bacteriológico a través de pruebas bioquímicas, serán serotipificadas siguiendo el método de Quellung, utilizando antisueros específicos contenidos en 12 pools y adquiridos del Statens Serum Institut de Dinamarca.

Todos los procedimientos, desde la toma de muestra, identificación y serotipificación se realizarán bajo estricto control de calidad, utilizando cepas ATCC (American type Control Culture), siguiendo normas de la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard), actualmente denominada CLSI (Clinical Laboratory Standard International).

4.2. MARCO REFERENCIAL

4.2.1. ANTECEDENTES

Datos estadísticos proporcionados por la OMS (Organización Mundial de la Salud), revelan que en 1.998 3,5 millones de personas murieron de neumonía en todo el mundo, más que cualquier otra enfermedad infecciosa, siendo el agente causal más frecuente *Streptococcus pneumoniae*.⁽⁴⁾

La OPS (Organización Panamericana de Salud), informó en 1.999 el fallecimiento de 72.000 niños menores de cinco años por infecciones respiratorias agudas (IRAS), de ellas el 80% son neumonías y el 50% causado por el *Streptococcus pneumoniae*.⁽⁴⁾

Según datos aportados por el BID (Banco Interamericano de Desarrollo) en Latinoamérica se producen cada año 9.000 casos de meningitis bacteriana aguda con un 10% de letalidad promedio y 30% de secuelas.⁽²⁾

Las tasas por 100.000 habitantes en países industrializados fueron menores, así en Finlandia 6,3 %, en EE.UU. 15%, los Ángeles 16,5%, en Israel 16,7%.⁽⁴⁾

En Francia, la incidencia de enfermedad invasora especialmente neumonía neumocócica es alta, datos proporcionados en Gambia señalan una tasa superior a 554/100.000 en niños menores de un año, que sería más de 10 veces superior a la registrada en países desarrollados como EE.UU.^(4,7)

En EE.UU se estima que el neumococo provoca anualmente 3.000 casos de meningitis, 50.000 de bacteriemias y 500.000 de neumonías.^(4,8)

A nivel mundial se estima que en el año 2.000 ocurrieron casi 4 millones de defunciones por infecciones de vías respiratorias inferiores.

Estudios de vigilancia epidemiológica de más de 4.000 aislamientos en hospitales municipales de diferentes áreas de EE.UU. han encontrado 12 serotipos que son los causantes del 80% de las infecciones, estos son el 8,4,14,7,12,9,1,18,6,23, cerca del 65% fueron aislados de lactantes y niños y los serotipos responsables de bacteriemias son los mismos a excepción del serotipo 12.⁽⁹⁾

Un estudio con 3.600 pacientes bacteriémicos en 10 hospitales de EE.UU. mostró 6 tipos capsulares (18,14,1,2,4,3) cuya frecuencia va en orden decreciente y es responsable del 50% de los casos. Otros tipos capsulares (12,6,18,9,19 y 23) son causantes del 25%.⁽¹⁰⁾

En Puebla - México se estudiaron procesos invasivos producidos por este microorganismo en menores de 5 años encontrándose que el 58% a 77% corresponden a meningitis más sepsis y el 10 a 20% corresponde a neumonías.⁽¹¹⁾

En Uruguay en siete años de vigilancia (1994-2000) fueron aislados 520 cepas de procesos invasivos, los serotipos más frecuentes encontrados fueron el 14,5,1,3 y 7F.⁽¹²⁾

Actualmente en Chile el *Streptococcus pneumoniae* es la segunda causa de meningitis bacteriana aguda, responsable de un 15,2%.⁽²⁾

En Santiago de Chile M. Levine et. al realizó un estudio prospectivo basado en vigilancia de hospitales durante el periodo de 1994 – 1995 registrándose una incidencia de 90,6/100.000 lactantes de 0 a 11 meses, 18,5/100.000 niños de 12 a 23 meses, el 45% correspondían a neumonía y 31,3% a meningitis. El grupo etéreo de mayor riesgo son menores de un año con un 8% de todas las meningitis y neumonías.⁽⁴⁾

Estudios realizados en Chile, demostraron que un sujeto puede estar colonizado por cuatro diferentes serotipos al mismo tiempo, algunos de ellos como el 14,5 y 23 se asocian con mayor frecuencia a infecciones invasivas en niños.⁽⁴⁾

El ISP (Instituto de Salud Pública de Chile) ha documentado que los neumococos de ciertos serotipos capsulares son proclives a desarrollar resistencia a los antimicrobianos y son el 23F, 19F, 6B, y que la distribución de cepas invasoras no es igual a la de las colonizaciones en infecciones de superficies mucosa como otitis media aguda, sinusitis agudas y neumonías.⁽¹³⁾

Sin embargo durante los últimos 40 años se ha observado una disminución gradual de los serotipos 1,2 y 3.⁽⁹⁾

En julio de 1.992 la OPS Washington DC, a través del grupo SIREVA (Sistema Regional de Vacunas) y un grupo de expertos de diversos países organizó un protocolo para la vigilancia de *Streptococcus pneumoniae* causante de enfermedades invasivas en niños menores de 5 años cuyos objetivos están dirigidos a conocer la prevalencia de serotipos, la resistencia a la penicilina y otros antimicrobianos, de esta manera orientar a la formulación de una vacuna conjugada ideal y específica para países latinoamericanos; el proyecto contó con el apoyo financiero de la Agencia de Investigación de Canadá (CIDA) y el aporte técnico del CDC de Ottawa del Centro Nacional de Referencia de Estreptococos (NCS) de la Universidad de Alberta, Edmonston, Canadá.⁽¹⁴⁾

El estudio se inició con la participación de 6 países latinoamericanos: Argentina, Brasil, Chile, Colombia, México y Uruguay; estableciéndose una red de vigilancia integrada por hospitales centinela que internan población pediátrica.⁽¹⁴⁾

El Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” de la Argentina, fue designado como laboratorio de referencia para la serotipificación del *Streptococcus pneumoniae*, el 10 % de todos los aislamientos pasó por un control de calidad externo realizado por el Centro Nacional de Referencia del Canadá garantizando la confiabilidad de la información obtenida.^(4,14)

Se estudiaron a 3.393 niños con infecciones sistémicas por *Streptococcus pneumoniae*, 1.578 correspondían a neumonías, y un 63,8% eran menores de 2 años, los serotipos aislados con mayor frecuencia en los 6 países fueron : 14, 6A, 6B, 5, 1, 23F, 18 E, 19 A, 9F, 9U , 3, 4, 9N, destacándose el serotipo 14 de mayor porcentaje, registrándose en Argentina más del 30%.⁽²⁾

Actualmente se esta aplicando tanto en países europeos como algunos países latinoamericanos, la vacuna polisacárida 23-valente licenciada por la FDA en 1.983 que fue elaborada con el aporte de 13.000 cepas, ninguna de estas pertenecía a nuestro continente.⁽⁴⁾

4.2.2. SITUACIÓN EN BOLIVIA

En Bolivia los indicadores epidemiológicos corroboran que las infecciones respiratorias agudas (IRAS) forman parte de las principales causas de consulta en policlínicos pediátricos, dentro de estas infecciones y sus complicaciones se destacan las neumonías y meningitis cuyo agente etiológico mas frecuente es el *Streptococcus pneumoniae*.⁽¹⁵⁾

Según datos de la ENDSA (Escuela Nacional de Demografía y Salud) en 1.994 Bolivia, las neumonías constituyen la segunda causa de mortalidad infantil, sin embargo, en los hospitales de tercer nivel no se tienen datos estadísticos

disponibles respecto a estas patologías, ni mucho menos los serotipos de *Streptococcus pneumoniae*.⁽¹¹⁾

El Servicio Departamental de Salud (SEDES) indica que en la ciudad de La Paz durante el año 1.999 reporto un total de 213,938 casos de infecciones respiratorias agudas (IRAS), lo que corresponde a una tasa de 4.026 por 100.000 habitantes, el 47,8% de estos pacientes pertenecían a un nivel socio-económico bajo, en cuanto al sexo de los pacientes se presentan en un 50% en varones y 50% en mujeres.⁽¹⁶⁾

Según últimos datos proporcionados por la Secretaría Departamental de Salud (SEDES) indica que los procesos infecciosos respiratorios agudos (IRAS) ocupan nuevamente el primer lugar de mortalidad infantil en menores de 5 años, el porcentaje de un total de IRAS fue de 51,63%.⁽¹⁶⁾

En 1.999 el país ingresa a formar parte del proyecto OPS-SIREVA, inicialmente se realizó un taller sobre técnicas de laboratorio conducido por un profesional del INS (Instituto Nacional de Salud) - Colombia, y el INLASA (Instituto Nacional de Laboratorios en Salud) - Bolivia, en la que participaron profesionales responsables que formaron parte del grupo de Hospitales Centinela y Focales de los tres departamentos que concentran mayor población pediátrica como Cochabamba, Santa Cruz y La Paz; de esta manera se inicia a partir del año 2.000 el aislamiento, recolección, y serotipificación de cepas de *Streptococcus pneumoniae*.

4.2.3. MARCO TEÓRICO

4.2.3.1. Historia

Streptococcus pneumoniae, es uno de los microorganismos más estudiados desde que fue descubierto por Pasteur en Francia en 1.881, cuando inoculó conejos con saliva de un niño muerto por rabia, al que se denominó inicialmente como “**microbio septicémico de la saliva**” en ese mismo año Stemberg, en Estados Unidos aísla este microorganismo denominándolo como ***Micrococcus pasteurii***, al año siguiente Friedlander demostró su asociación con la neumonía lobar aguda, en 1.886 fue denominado **neumococo** por Frankel por que causaba enfermedades pulmonares, posteriormente en 1.920 fue denominado como ***Diplococcus pneumoniae*** y recién en 1.981 Chester le da la denominación actualmente vigente ***Streptococcus pneumoniae***.^(9,17,18,19)

En 1.926 Felton y Bar consiguieron la separación del polisacárido capsular del *Streptococcus pneumoniae* y demostraron que esta era la fracción responsable de la inmunidad; actualmente se han descrito 90 antígenos de polisacáridos.^(9,19)

En 1.927, Frederick Griffit, médico británico, observo que cuando inyectaba subcutáneamente a ratones un cultivo de neumococos vivos, sin virulencia junto a una especie muerta de neumococos letales, que los ratones morían al día

siguiente, las bacterias inofensivas se habían transformado en la misma especie de neumococos letales que transferían esa virulencia a su progenie. ^(20,21)

En 1.931 Oswald Theodore Avery, médico del Instituto Rockefeller juntamente con Michael Heidelberg Avery descubrió la naturaleza bioquímica de las envolturas capsulares de cuatro tipos de neumococos que no solo eran responsables de su toxicidad, sino también de su especificidad serológica.⁽²¹⁾

En 1.937 fue la primera vez que el material capsular se utilizó para la producción de la vacuna, que contenía dos polisacáridos, finalmente se fueron desarrollando vacunas con 4 valencias (tetravalentes), con 6 valencias (hexavalentes), y luego con 7,14 y 23 valencias.⁽²¹⁾

En 1.943 – 1.944 Avery, Colin MacLeod y Mac Carty, anunciaron que el ADN (Ácido Desoxirribonucleico) puro obtenido de neumococos encapsulados muertos de tipo III podían transformar un cultivo de neumococos tipo II no capsulados, así se empezó a conocer la capacidad patógena de recombinación genética que posee este microorganismo.^(4,21)

4.2.3.2. Epidemiología

Las enfermedades neumocócicas son endógenas, es decir no se adquieren de novo de otros pacientes con enfermedades activas, si no que ocurren cuando los propios neumococos del sujeto lo atacan, viven en forma sintomática en la región superior del aparato respiratorio de 5 a 7% de la población.⁽²²⁾ La infección neumocócica está usualmente precedida por la colonización de la nasofaringe humana, siendo esta un importante factor de riesgo para desarrollar la enfermedad.^(22,23) En Nueva Guinea se demostró que más del 95% de los niños son colonizados durante sus dos primeros años de vida por *Streptococcus pneumoniae*.⁽²⁵⁾

Streptococcus pneumoniae es la causa principal de neumonías y meningitis bacterianas en todo el mundo.⁽³²⁾ La neumonía neumocócica es considerada una de las más prevalente tanto en países en desarrollo como los desarrollados afecta principalmente a niños menores de 5 años y ancianos con factores de riesgo, se estima una tasa de mortalidad mundial de más de 1.500.000 decesos anuales por neumonías neumocócicas, en niños menores de cinco años.⁽²⁶⁾

A nivel mundial ocupa el segundo lugar en frecuencia como causa de meningitis bacterianas precedida a menudo de neumonía, esta neumonía neumocócica es el tipo más frecuente adquirido en la comunidad, su índice de mortalidad en los casos no complicados es aún relativamente alto (5-7%) incluso cuando se instituye un rápida terapia adecuada, además ocasiona otras enfermedades como otitis media,

sinusitis purulenta, en ocasiones peritonitis, etc. sobre todo en pacientes jóvenes con síndrome nefrótico.⁽²⁷⁾

Los neumococos son transportados en la nasofaringe de personas sanas y constituyen el mayor reservorio para las infecciones neumocócicas, la tasa de portación varía con la edad, el medio y la presencia de infecciones en el tracto superior.⁽⁹⁾

La tasa de portación es mayor en niños de edad preescolar (25 al 30%) en los adultos es de solo el 5%, en mayores de 40 años la tasa es 3 a 4 veces más alta.

En grupos cerrados de población como guarderías, escuelas, servicio militar, instituciones para enfermos crónicos la incidencia de infecciones es alta con una tasa que puede llegar hasta el 60%.⁽⁹⁾

En EE.UU la neumonía es la forma bacteriana más común, se estima que la tasa es de 68 a 260 por 100.000 habitantes y entre 150.000 y 300.000 casos anuales.⁽⁹⁾

Un grupo de expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó para el año 1.995 una mortalidad por IRAS entre 16 a 30 por 100.000 niños menores de 5 años, en Canadá y EE.UU, más de 100 y hasta 2.000 por 100.000 en los países subdesarrollados como Haití, Bolivia, Paraguay y otros.^(18, 28)

A la fecha se han identificado 90 serotipos de *Streptococcus pneumoniae* y aproximadamente 45 serogrupos, en base a diferencias antigénicas de sus polisacáridos capsulares.^(2, 19) Las primeras cepas identificadas fueron aquellas que causan enfermedades más frecuentes, es decir las virulentas, así los serotipos con los números bajos son los que aparentemente se encuentran implicadas con enfermedades humanas.⁽¹⁹⁾

La inmunización pasiva o activa estimula la aparición de anticuerpos serotipo específicos que causan aglutinación o hinchamiento de la cápsula de *Streptococcus pneumoniae*, más conocida como Reacción de Quellung.

La serotipificación fue relevante desde el punto de vista clínico, en la década de los 30 cuando el antisuero era administrado para terapia, hoy en día es de gran interés epidemiológico y de salud pública.

4.2.3.3. Clasificación taxonómica

Streptococcus pneumoniae pertenece a la familia *Streptococcaceae* y al género *Streptococcus*.⁽¹⁹⁾

4.2.3.4. Morfología

Streptococcus pneumoniae es una bacteria Gram positiva, encapsulada, característicamente tienen forma de diplococos lanceolados de 0,5 a 1,25 μm de diámetro, cuyos lados adyacentes son redondos y sus extremos distales más agudos, lo que le da una apariencia lanceolada o en llama de bujía, se disponen en pares o en cadenas cortas, son inmóviles y no forman esporas. ^(3,10,11,14,19)

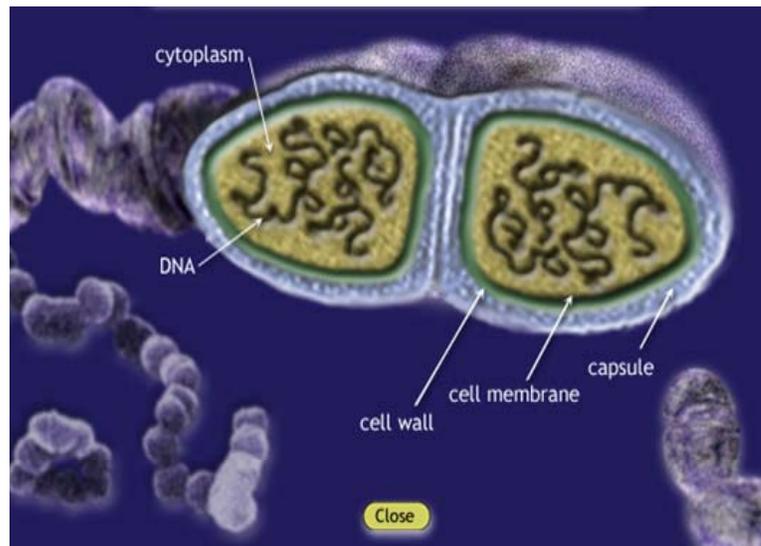


Figura 1. Morfología de *Streptococcus pneumoniae*

4.2.3.5. Biología

Streptococcus pneumoniae es una bacteria anaerobia facultativa que puede utilizar una amplia variedad de carbohidratos fermentables, su metabolismo productor de energía es del tipo ácido láctico, la cantidad de ácido que se acumula es pequeña, dado que no produce catalasa ni peroxidasa, la acumulación de peróxido de hidrógeno destruye al microorganismo, a menos que se proporcione catalasa al medio de cultivo mediante el agregado de eritrocitos que es una excelente fuente de esta enzima; es soluble en bilis, sensible a la optoquina y muchos serotipos son virulentos para el ratón. ^(8,9,10) Los neumococos no tienen citocromos de manera que respiran mediante un sistema de flavoproteínas que transforman el oxígeno en peróxido de hidrógeno⁽⁵⁴⁾.

4.2.3.6. Condiciones de crecimiento

Los neumococos presentan un crecimiento muy pobre en los medios de cultivo ordinario, necesitando medios enriquecidos con sangre, suero, glucosa, etc; puede proliferar en medios sintéticos químicamente definidos, pero para su primer aislamiento se recomienda utilizar agar infusión enriquecido y caldos como tripticasa soja o infusión de cerebro corazón, enriquecida con 5% de sangre defibrinada. En caldo suero crece con una turbiedad uniforme y un depósito que varía con el tiempo de incubación, no forma película.⁽¹¹⁾

Crece a un pH comprendido entre 6,5 a 8,3; siendo el pH óptimo para su proliferación de 7,4 a 7,8; no se observa desarrollo a pH de 9,6. Es un microorganismo anaerobio facultativo que presenta una marcada tendencia a acumular peróxido de hidrógeno cuando crece en condiciones aerobias; por ello, crece mejor en una atmósfera que contenga un 5% de CO₂.⁽²²⁾

En agar sangre ovina después de las 18 a 24 horas de incubación a 35°C y presencia de CO₂, aparecen colonias circulares, pequeñas y elevadas de 0,5-1mm de diámetro, con una superficie lisa, brillante y de bordes enteros, rodeadas de una zona de lisis eritrocitaria incompleta, denominada hemólisis alfa (α). Si se realiza una incubación prolongada, la zona central de la colonia se puede deprimir por autólisis celular progresiva.^(2,10,11,19) Cuando se incuban en ambiente anaeróbico los neumococos producen beta hemólisis sobre el agar sangre porque sintetizan una proteína de 63Kd llamada neumolisina O.⁽²²⁾ La morfología de muchas colonias de neumococo en agar sangre es muy parecida a las colonias alfa hemolíticas de *Streptococcus viridans*.^(2,10,11,19)

Cuando se produce una excesiva síntesis de polisacárido capsular, producen colonias mucoides de apariencia característica que pueden alcanzar diámetros de 3mm, esto es frecuente en cepas del serotipo 3 y otros capsulados.^(2,10,11,19)

Aunque son cocos Gram positivos durante la fase exponencial de crecimiento en medios artificiales, se vuelven Gram negativos de modo progresivo al envejecer los cultivos. Si la incubación continúa, disminuye el número de células viables y el cultivo tiende a clarificarse. Estos cambios se deben a la acción de enzimas autolíticas, que primero transforman las células en Gram negativas y posteriormente causan su lisis.^(2,10,11,19)

4.2.3.7. Análisis Estructural

Los neumococos presentan la estructura clásica de una bacteria Gram positiva, siendo su característica más destacada, la de estar rodeado por una cápsula de naturaleza polisacárida. *Streptococcus pneumoniae* presenta un genoma con 2.270 Kb, aunque la ausencia de un mapa genético ha sido un gran impedimento para la

investigación en el campo de la genética molecular de este microorganismo. La característica de separar fragmentos largos de ADN por electroforesis de campo pulsado (pulse-field gel electrophoresis (PFGE)) ha sido utilizada para realizar mapas bacterianos cromosómicos, gracias a la utilización de enzimas de restricción como *SmaI*, *Apal*, *SacII*.⁽⁴⁹⁾

4.2.3.7.1. Componentes de superficie de *Streptococcus pneumoniae*

Los principales componentes de la superficie del neumococo son: **Membrana plasmática, la pared celular y la cápsula.**

4.2.3.7.1.1. Membrana Plasmática

En la membrana plasmática se encuentran proteínas a las que se atribuyen actividades enzimáticas importantes, tales como autolisinas, endonucleasas, proteínas activadoras e inhibidoras y proteínas fijadores de penicilina (PBPs o Penicilin Binding Proteins).^(50,51)

En esencia todo el lípido que puede extraerse del neumococo está presente en la membrana plasmática, también se encuentra en la membrana un ácido teicoico que contiene colina, similar a la de la pared pero unido de manera covalente a los ácidos grasos; este ácido lipoteicoico es el portador del antígeno F, un determinante inmunológico que reacciona de manera cruzada con las series de Forssman de antígenos de superficie de mamíferos.^(29,30)

4.2.3.7.1.2. Pared Celular

La pared celular del *Streptococcus pneumoniae* tiene la estructura general de las bacterias Gram positivas, consiste en un esqueleto de péptido-glucano constituida por sub unidades alternadas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetil murámico enlazadas por puentes peptídicos, un componente importante es el ácido teicoico rico en galactosamina, fosfato y colina, esta última sustancia es exclusiva de esta bacteria y cumple una función reguladora importante en la hidrólisis de la pared. En esta estructura se anclan el polisacárido C, polisacárido capsular, y las proteínas.^(2,30)

4.2.3.7.1.3. Cápsula

La cápsula se puede definir como una estructura superficial que presentan muchas bacterias, consistentes en acumulación de material mucoso o viscoso, situado externamente respecto de la pared celular.⁽³⁰⁾

La cápsula neumocócica está constituido por grandes polímeros polisacáridos de alto peso molecular, que forman geles hidrófilos en la superficie de los microorganismos, están conformadas por unidades repetitivas de oligosacáridos (dextranos y lévanos), ligados por enlaces covalentes a la pared celular.⁽⁹⁾

Esta estructura es la piedra angular de la patogénesis de las infecciones neumocócicas, la composición antigénica es variable en diferentes cepas y permite agrupar a *S. pneumoniae* en más de 90 diferentes serotipos capsulares y aproximadamente 45 serogrupos. Se definen como pertenecientes a un mismo serogrupo, los serotipos que presentan inmunogenicidad cruzada como el serotipo 6A y 6B.

También es considerada como el principal factor de virulencia de este microorganismo, debido a su resistencia a la fagocitosis.⁽³⁰⁾ La cápsula se sintetiza rápidamente durante la fase logarítmica del crecimiento bacteriano y puede ser detectado en el suero y orina de pacientes con enfermedades neumococcicas.⁽³⁰⁾

La composición química de la cápsula es variable, incluso dentro del mismo serotipo, estudios químicos de este antígeno revelan que la mayoría de los serotipos poseen una cápsula cargada negativamente (excepto el 7 y 14 que son neutros) y poseen componentes ácidos como el ácido D-glucorónico (en los tipos 1,2,3,8, 9A y 9V), o fosfato en enlaces fosfodiester (en los tipos 6A, 6B, 11A, 15F,19F,19A y 23F).⁽³²⁾⁽⁵³⁾ Por ejemplo, la cápsula del neumococo serotipo 3 consiste en unidades repetidas de ácido celobiurónico disacárido formado por ácido D-glucorónico y D-glucosa conectados por enlaces glucosídicos beta 1-4.

El polímero presenta grupos carboxilos libres, lo cual contribuye a la electronegatividad del organismo encapsulado.⁽⁵³⁾

Las cápsulas tienden a ser mayores durante la fase exponencial de crecimiento, cuando la síntesis del polisacárido es máxima. En las últimas fases de crecimiento, las cápsulas disminuyen debido a la difusión del polisacárido en el medio que los rodea.

Los neumococos, generalmente capsulados, pueden perder la propiedad de formar cápsula por mutación espontánea. Esta alteración se denomina comúnmente "mutación S-R" pues hace cambiar la superficie de las colonias de una textura lisa (smooth) y brillante S, a otra relativamente rugosa (rought) R. Cuando ocurre esta mutación, se produce una pérdida de virulencia frente al animal huésped, normalmente susceptible. Se ha demostrado que serotipos sin cápsula son menos virulentos y por lo tanto son captados y destruidos por los fagocitos con más facilidad que los capsulados (virulentos) y esto determina su incapacidad para producir una infección eficaz.⁽⁵⁴⁾

Las cápsulas pueden ser observadas con facilidad por medio del examen de montajes húmedos de microorganismos virulentos en tinta china o por el uso de anticuerpos específicos de grupo homólogos como en la reacción de Quellung, el tamaño de la cápsula varía con el tipo de neumococo.⁽⁹⁾ Es probable que la capacidad de anticuerpos específicos que ocasiona el aparente ensanchamiento de la cápsula se relaciona con un aumento del tamaño efectivo de esta debido al enlace del anticuerpo con la cápsula y un incremento de la refracción.⁽²²⁾

La regulación genética de esta cápsula también es compleja y es así que algunas cepas pueden experimentar una transformación o cambio de serotipo, que ocurre por recombinación genética en el que se reemplaza el locus (parte del genoma) que codifica para la expresión de la cápsula, uno de estos serotipos es el 19F que surgió como variante de un clon serotipo 23F multirresistente detectado en España, que se ha diseminado a diferentes países.^(2,33,34)

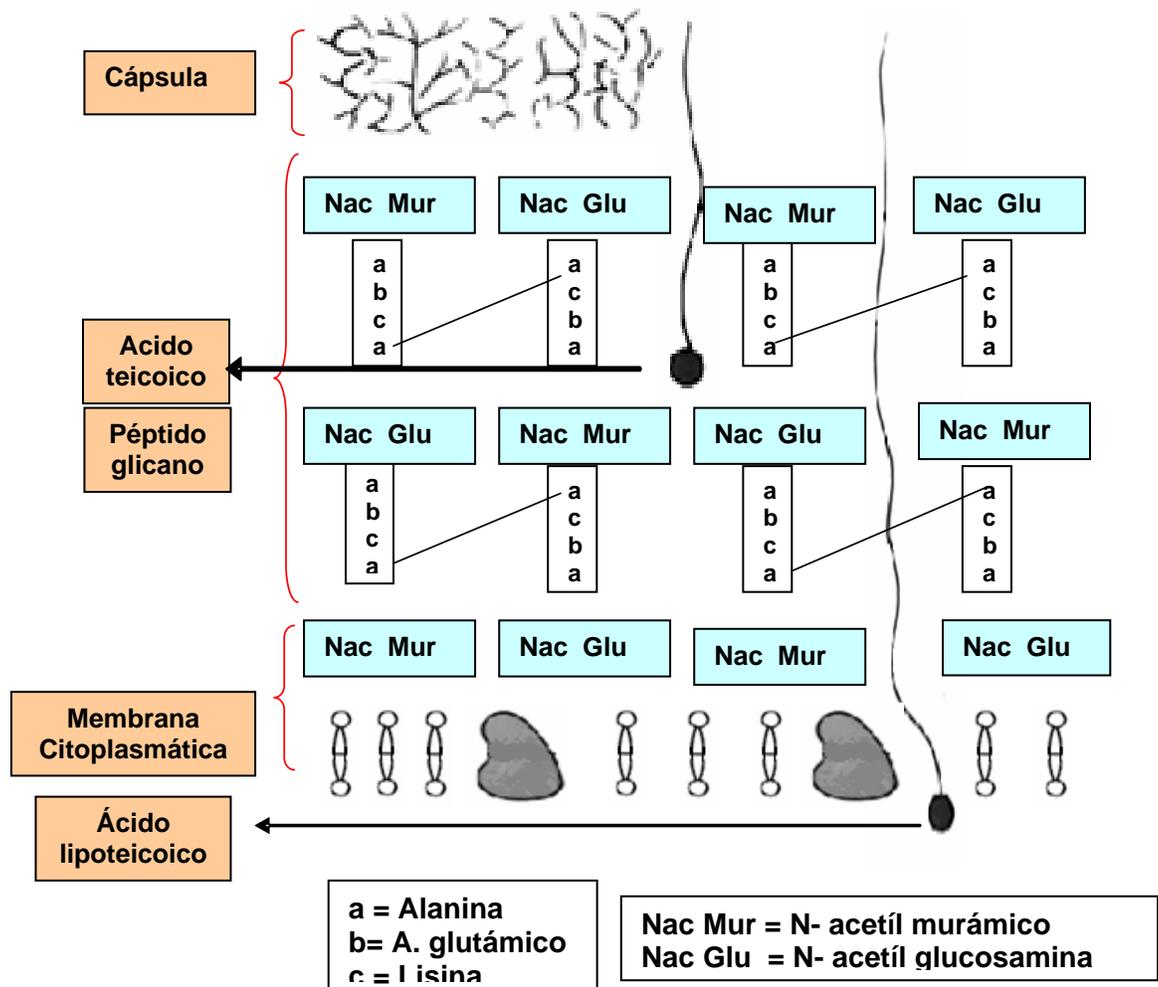


Figura 2. Componentes de superficie de *Streptococcus pneumoniae*

4.2.3.7.1.3.1. Estructura química de los polisacáridos capsulares

Los polisacáridos capsulares poseen generalmente una estructura compleja y variable, debida tanto a los azucares que la componen como a los enlaces que los unen. El polisacárido puede encontrarse unido a la superficie bacteriana, a través de enlaces covalentes o no, permitiendo el anclaje a la pared celular en el caso de las bacterias Gram positivas, así por ejemplo se ha demostrado la existencia de una unión covalente en el caso del serotipo 6A de neumococo.⁽⁵⁵⁾

Por otro lado, los distintos tipos capsulares, varían en cuanto a su capacidad inmumogénica, así existen polisacáridos cuya estructura es idéntica o muy similar a ciertos poli u oligosacáridos de la superficie celular, de la matriz extracelular del huésped o de fluidos corporales como sangre, el líquido sinovial o el líquido cefalorraquídeo.⁽⁵⁶⁾

4.2.3.7.1.3.2. Biosíntesis de polisacáridos capsulares

La expresión de polisacáridos capsulares en la célula bacteriana es un proceso bioquímico complejo, que incluye una serie de etapas asociadas a distintos compartimentos celulares. En el caso de microorganismos Gram negativos, gran parte de estas etapas se encuentran bien caracterizadas, mientras que en bacterias Gram positivas, se conoce relativamente poco sobre estas rutas metabólicas.

Aunque los procesos implicados en la biosíntesis de la cápsula deben ser notablemente diferentes entre organismos Gram positivos y Gram negativos, como consecuencia de la gran diferencia estructural existente entre sus respectivas envueltas celulares, existen no obstante ciertos procesos metabólicos que cumplen normas comunes.

4.2.3.7.1.3.3. Precursores Biosintéticos

La primera etapa en la biosíntesis de los polisacáridos capsulares bacterianos consiste en la formación de los precursores o moléculas donadoras de los monosacáridos que formaran la unidad repetitiva; estos son frecuentemente ésteres glicosídicos de nucleótidos.⁽⁵⁷⁾

En bacterias Gram positivas, la parte nucleotídica de estos precursores ha sido identificada generalmente como UDP (Uridin Di fosfato), Así en neumococo se conoce desde hace varias décadas la acumulación de varios compuestos de este tipo durante su fase estacionaria de crecimiento, como UDP-glucosa, UDP N-acetilglucosamina o UDP-galactosa. En algunos serotipos, sin embargo pueden encontrarse también otros nucleótidos formando parte de los precursores, así por ejemplo en el serotipo 2, existen derivados de TDP (Timidin di fosfato) y tanto en el serotipo 6 como en el 34, se encuentran derivados de CDP (Citidin di fosfato).⁽⁵⁸⁾

4.2.3.7.1.3.4. Formación de la unidad básica y polimerización

Tras la formación de los precursores tiene lugar la síntesis de las unidades repetitivas de las que constara el polisacárido y la posterior polimerización de estas. Se han descrito dos mecanismos de síntesis de polisacáridos en bacterias Gram negativas, diferenciándose básicamente, en la forma en que se produce la elongación de la cadena del polisacárido. En la primera modalidad de síntesis, la polimerización consiste en unidades repetitivas, unidas cada una a un intermediario lipídico, se unen de forma que la última unidad en incorporarse a la cadena en crecimiento quede a su vez unida al intermediario lipídico, es decir, el crecimiento se produce por la “cabeza” de la molécula (crecimiento capital).⁽⁶⁵⁾

La segunda modalidad tiene lugar mediante la incorporación sucesiva de monosacáridos, a partir de los precursores en forma de derivados de nucleótidos, a una cadena en crecimiento anclada al intermediario lipídico (crecimiento caudal).⁽⁶⁵⁾

En cuanto a los microorganismos Gram positivos en los que los mecanismos que utilizan para la biosíntesis capsular son casi desconocidos, no se ha podido identificar ningún intermediario de la síntesis a pesar de que, a partir de extractos de *S. pyogenes*, se consiguió por primera vez la síntesis de un polisacárido capsular. Tanto la activación de los monosacáridos como su polimerización se producen de forma asociada a la membrana citoplasmática, gracias al carácter altamente hidrofóbico del intermediario. En el caso de *S. pneumoniae* todo parece indicar que existe un intermediario aceptor de los monosacáridos, aunque no se conoce su naturaleza química.⁽⁶⁵⁾

4.2.3.7.1.3.5. Transporte y modificación del polisacárido capsular

El siguiente paso en la síntesis del polisacárido capsular, implica su transporte desde el citoplasma al exterior, en el caso de las bacterias Gram positivas, y al periplasma en caso de bacterias Gram negativas. El transporte del polisacárido se efectúa a través de un sistema de proteínas especializadas que requieren energía, denominados Transportadores ABC, por (ATP- Binding Cassete).⁽⁶⁵⁾

En general, los polisacáridos capsulares presentan una estructura bastante regular, sin embargo, en determinados casos, se observa la existencia de cadenas laterales de forma irregular. Estos sustituyentes pueden ser de diversa naturaleza, aunque lo habitual es que se trate también de carbohidratos. Los mecanismos por los que se produce este fenómeno son variados, en todos los casos descritos hasta el momento, las reacciones de modificación del polisacárido tienen lugar a nivel del oligosacarido unido al intermediario lipídico.⁽⁶⁵⁾

4.2.3.7.1.3.6. Genética de la biosíntesis capsular

Los experimentos genéticos relacionados con la biosíntesis de los polisacáridos capsulares constituyen la base de la biología molecular, ya que fueron los estudios realizados por Griffith en los años 20 sobre la transformación genética en neumococo (Griffith 1928) los que permitieron, casi dos décadas más tarde a Avery y colaboradores identificar al DNA como la base química de la herencia genética (Avery y cols. 1944) A partir de este momento se produjo un creciente interés en la investigación de las cápsulas bacterianas, aunque en el caso de bacterias Gram positivas, hubo que esperar hasta 1992 para conocer la estructura y organización de los genes capsulares en bacterias de los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus*.

A pesar de estos precedentes y del conocimiento de la implicación de la cápsula bacteriana en la virulencia, conviene señalar que hasta muy recientemente no se ha aplicado las técnicas de biología molecular al estudio de los genes que intervienen en la biosíntesis de los polisacáridos capsulares, especialmente en el caso de microorganismos Gram positivos.

4.2.3.7.1.3.7. Estructura química de algunos polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae*

Como se indicó anteriormente, hasta el momento se han descrito 90 serotipos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* química e inmunológicamente diferentes. En el cuadro 1 se muestra la estructura de algunos serotipos y los monosacáridos que lo componen.

4.2.3.8. Análisis antigénico

4.2.3.8.1. Antígenos capsulares

La constitución química de algunos antígenos capsulares de los nuevos tipos de neumococos todavía no se ha determinado. Sin embargo, se puede asumir con seguridad que cada tipo de neumococo está caracterizado por un polisacárido capsular específico que determina su comportamiento antigénico. Estos tipos se pueden identificar por aglutinación, reacción de Quellung o por pruebas de precipitación realizadas con un extracto de las cápsulas neumocóccicas.

4.2.3.8.2. Antígenos no capsulares

4.2.3.8.2.1. Polisacárido de la pared celular (C-PS)

El polisacárido capsular no es, de hecho, el único constituyente antigénico del neumococo. En 1930, se aisló otro componente que presentaba todas las reacciones usuales de un polisacárido, no se inactivaba por digestión peptídica o trípica, y producía en hidrólisis, alrededor de un 30% de azúcares reductores, y contenía un 61% de nitrógeno. Sin embargo, difería del polisacárido capsular en que contenía ácido fosfórico. No era tipo específico, pero parecía caracterizar al neumococo como especie.

Se le designó como “polisacárido C” o somático y se parece en algunos aspectos a los antígenos grupo específicos de los estreptococos hemolíticos.

Este carbohidrato específico de especie, es el mayor componente estructural de la pared celular de todos los neumococos, es un polímero de ácido teicoico que contiene fosfocolina como determinante antigénico mayoritario. La fosfocolina es la responsable de la aglutinación de los neumococos por ciertas proteínas del mieloma y de la interacción del polisacárido C con una beta-globulina del suero en presencia de calcio; esta beta globulina llamada “proteína C reactiva”, no es un anticuerpo sino una proteína que en la sangre normal se encuentra presente en baja concentración, pero su concentración es elevada en la sangre de pacientes con enfermedades inflamatorias agudas.⁽³⁰⁾

El polisacárido de la pared bacteriana denominado también polisacárido C(C-PS), es un carbohidrato específico de especie, componente estructural principal de la pared celular de todos los neumococos,⁽³⁰⁾ forma parte del antígeno de Forssman o F.⁽³¹⁾

El polisacárido C activa el sistema del complemento por la vía alterna, estudios realizados en ratones, con anticuerpos monoclonales y poli clónales anti C-PS, demostraron que estos anticuerpos son protectores contra dosis letales para determinados serotipos, sin embargo esto no quiere decir que los anticuerpos anti C-PS presentes naturalmente sean protectores en la evolución de la enfermedad neumocócica aguda, debido probablemente a que las cepas encapsuladas están cubiertas con el polisacárido capsular lo que vuelve al C-PS inaccesible a los anticuerpos anti C-PS.⁽³⁰⁾

4.2.3.8.2.2. Antígeno de Forssman

Este antígeno es un ácido lipoteicoico que se parece al antígeno polisacárido C ya que contiene colina, pero se diferencia en que el antígeno F se encuentra

localizado en el exterior de la superficie de la membrana celular, donde esta fuertemente unido a ácidos grasos.

El antígeno F se parece, en sus propiedades físico-químicas y fisiológicas, a los ácidos teicoicos de membrana de bacterias Gram positivas, y esto sugiere que el antígeno F, con una estructura compleja, pueda considerarse un equivalente funcional de los más convencionales ácidos teicoicos de membrana. El antígeno F es un potente y altamente específico inhibidor de la autolisina homóloga, la cual es una enzima ácido N-acetil –murámico, L-lisina amidasa.⁽²³⁾ El hecho de que el antígeno F sea un potente inhibidor de la autolisina sugiere un papel fisiológico específico de las lipoproteínas en la regulación in vivo de la actividad hidrolasa de la mureína en el organismo. Además, realiza una importante función en los procesos de adherencia bacteriana.

4.2.3.8.2.3. Proteína A

Es una proteína de superficie (PspA), con estructura antigénica variable en las diferentes cepas de neumococo. Es una proteína transmembranal, de difícil purificación y de función desconocida, parece desempeñar algún papel en la adhesión, ya que su estructura primaria es similar a ciertas adhesivas encontradas en otras especies.⁽⁵⁹⁾

Se cree que es requerida para una completa expresión de la virulencia del neumococo pues está presente en la mayoría de los aislamientos recuperados de pacientes. En modelos murinos inmunizados en forma pasiva con antisueros poli y monovalentes contra PspA así como la inmunización activa con esta proteína ha demostrado protección contra los diferentes serotipos de neumococo.⁽³⁰⁾

4.2.3.9. Factores de virulencia en *Streptococcus pneumoniae*

El desarrollo de una infección bacteriana implica, en primer lugar, la existencia de interacciones entre estructuras superficiales de la bacteria y las superficies epiteliales, células del sistema inmunitario y factores humorales del huésped. Los procesos implicados en el transporte de neumococo desde la nasofaringe a otros lugares del huésped son poco conocidos y probablemente dependan de múltiples factores.⁽⁶⁰⁾

La virulencia de *Streptococcus pneumoniae* está relacionada directamente con la **capsula polisacárida, las envueltas celulares más internas, la pared celular y las proteínas**, que determinan la resistencia a la fagocitosis por los polimorfo nucleares, esto le permite un mecanismo de escape eficiente de las defensas del hospedero ⁽³²⁾. En la figura (3) se muestra un esquema de los principales Factores de virulencia de neumococo y sus efectos más importantes.

4.2.3.9.1. Cápsula polisacárida

En 1.928 Griffith puso de manifiesto que la cápsula del neumococo constituye el principal factor de virulencia en ratones, ya que la administración de células capsuladas producía la muerte, mientras que la inyección de células pertenecientes a una estirpe rugosa derivada de la anterior resultaba inocua.

En 1.931, Avery y Dubos pusieron de manifiesto que solo 10 bacterias de algunas estirpes capsuladas eran capaces de producir la muerte en ratones, mientras que se requerían 1'000.000 de bacterias no capsuladas de la misma cepa para obtener el mismo efecto. Esta implicación directa en la virulencia se debe al papel que desempeña la cápsula protegiendo frente a la fagocitosis.⁽⁶¹⁾

La virulencia e invasividad del neumococo varía de acuerdo con el serotipo y depende de la composición química y cantidad del polisacárido capsular que este produce, así por ejemplo las cepas de neumococo del tipo **3** y **37** producen gran cantidad de material capsular pero difieren en cuanto a la virulencia en animales; el tipo **3** compuesto por polímeros de glucosa y ácido glucorónico, es considerado como uno de los serotipos más virulentos y con alta capacidad invasora, el serotipo **37** compuesta de homopolímeros de glucosa, se asocia rara vez con enfermedad.⁽³²⁾

Por otra parte, se ha observado que las estirpes rugosas son virulentas en individuos con agranulocitosis, lo que demuestra las propiedades patogénicas de otras estructuras neumocócicas. Por otro lado, a pesar de que tradicionalmente se ha considerado que los polisacáridos purificados no son tóxicos, recientemente se ha descrito que algunos polisacáridos purificados que poseen grupos cargados son capaces de producir abscesos intra-abdominales.⁽⁶²⁾

A pesar de ser la cápsula el principal factor de virulencia, el mecanismo completo de su acción en el hospedero no es completamente conocido, se sabe que el polisacárido capsular no es tóxico, varias cápsulas son altamente polares e hidrófilas, por lo cual interfieren con la interacción de la bacteria con el fagocito. La capacidad de ingestión y destrucción por el fagocito del hospedero exige que el microorganismo esté cubierto por anticuerpos o complemento para la opsonización.⁽³²⁾

La cápsula polisacárida es esencial para la patogenicidad del neumococo y estimula la producción de anticuerpos protectores contra infecciones posteriores por neumococos del tipo homólogo.⁽⁹⁾

Estudios inmunológicos demuestran que este antígeno es Timo independiente y puede interactuar directamente con las células B para la producción de anticuerpos.

4.2.3.9.2 Pared celular

La pared celular desempeña un papel importante en la virulencia al liberarse sus componentes tras la lisis de la bacteria, los ácidos teicoicos y los fragmentos de peptidoglucano de la pared son los responsables de la reacción inflamatoria. Estos componentes son tan potentes que se comparan con el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram negativas. Durante la lisis bacteriana estos activan la vía alterna del complemento, lo que estimula a su vez, la producción de citoquinas, aumentan la permeabilidad del endotelio cerebral y del epitelio de los alvéolos pulmonares, y da como resultado fiebre y choque. Cuando estos componentes se inyectan en forma purificada, inducen una inflamación similar a la que se observa después de la infección con la bacteria total.⁽³²⁾

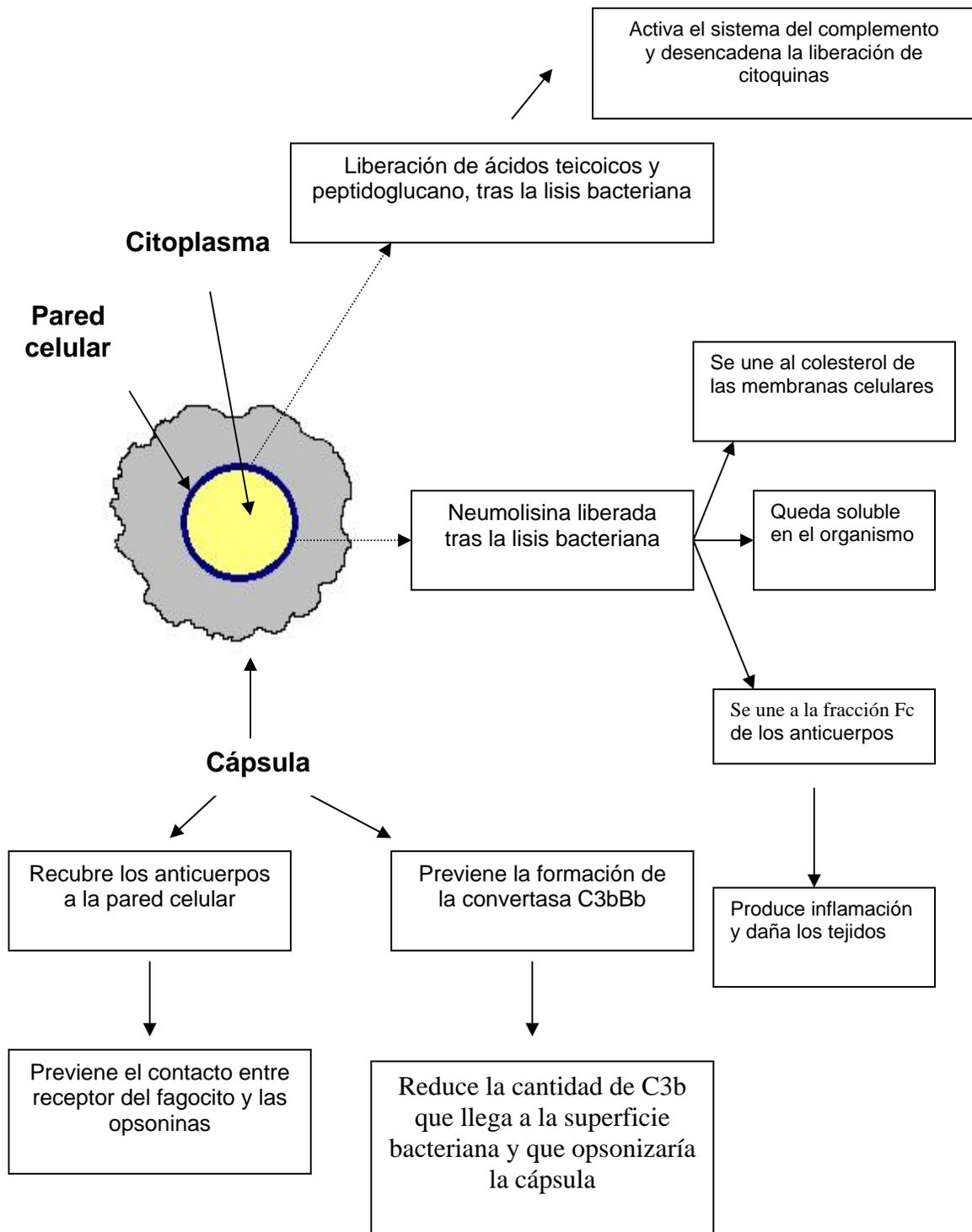


Figura 3. Factores de virulencia de *Streptococcus pneumoniae*

Cuadro 1. Estructura Química de polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* de importancia clínica

Serotipo	Estructura primaria
1	→3)-AAT-α-D-Galp-(1→4) α-D-Galp A-(1→3) α-D-Galp A-(1→0,3OAc
3	→3)- β-D-GlcpA-(1→4)- β-D-Glcp-(1→
5	→4)- β-D-Glcp-(1→4)- α-L -FucpNAc-(1→3)-β-D-Sugp-(1→ <div style="text-align: center;">3 ↑ 1</div> α-L-PnepNAc-(1→2)-β-D-GlcpA
6A	→2)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-Glcp-(1→3))-α-L-Rhap-(1→3)-D-Rib-o1-(5→P →
6B	→2)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-Glcp-(1→3))-α-L-Rhap-(1→4)-D-Rib-o1-(5→P →
7F	→6)-α-D-Galp-(1→3)-β-L-Rhap2Ac-(1→4)-β-D-Glcp-(1→3)-β-D-GalpNAc-(1→ <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">2 ↑ 1 β-D-Galp</div> <div style="text-align: center;">4 ↑ 1 α-D-Glcp NAc-(1→2)-α-L-Rhap</div> </div>
7A	→6)-α-D-Galp-(1→3)-β-L-Rhap2Ac-(1→4)-β-D-Glcp-(1→3)-β-D-GalpNAc-(1→ <div style="text-align: right; margin-right: 50px;">4 ↑ 1 α-D-Glcp NAc-(1→2)-α-L-Rhap</div>
9A	→4)-α-D-GlcpA-(1→3)-α-D-Galp-(1→3)-β-D-Manp-NAc(1→4)-β-D-Glcp-(1→4)- α-D-Glcp-(1→
14	→6)- β-D-Glcp-NAc(1→3)-β-D-Galp(1→4)-β-D-Glcp-(1→ <div style="text-align: center;">4 ↑ 1 β-D-Galp</div>
19F	→4)-β-D-Manp-NAc(1→4)-α-D-Glcp(1→2)- α-LRhap-(1-P→
23F	→4)-β-D-Glcp-(1→4)-β-D-Galp-(1→4)-β-L-Rhap-(1→ <div style="text-align: center;">2 ↑ 1 α-L-Rhap</div>

4.2.3.9.3. Proteínas

4.2.3.9.3.1 Neumolisina

Desde el punto de vista fisiológico puede considerarse una citotoxina no secretable que pertenece al grupo de las citolisinas activadas por tiol; es una proteína intracelular, y solamente se libera cuando ocurre lisis bacteriana, su peso es de 52,8 kda. Esta proteína actúa insertándose en la membrana de las células del huésped como consecuencia de la interacción de la proteína con el colesterol de la membrana de la célula diana; es la que destruye la membrana de los glóbulos rojos, aunque puede hacerlo sobre cualquier célula animal que posea colesterol en su membrana. Posterior a la inserción en la membrana se produce una oligomerización que implica entre 20 y 80 moléculas, formándose un poro transmembranal y produciéndose la lisis celular.⁽⁶³⁾ Es la responsable de la hemólisis que se observa cuando se cultiva *S. pneumoniae* en medios con sangre y en ambiente anaeróbico.^(2,32) Recientemente las zonas biológicamente significativas de la neumolisina han sido estudiadas mediante anticuerpos monoclonales⁽⁶⁴⁾, Se ha demostrado *in vitro*, que la neumolisina rompe la integridad del epitelio respiratorio humano, por lo que podría intervenir en los primeros pasos de la patogénesis de la neumonía neumocócica.^(2,32,66) Recientemente se ha observado que los neumococos deficientes en neumolisina son menos eficientes (menos virulentos) en el desarrollo de neumonía y septicemia en el ratón, que las cepas productoras de la enzima.^(32,67,68) Además, se ha visto que la ausencia de neumolisina retarda la aparición de neumococos en sangre⁽⁶⁷⁾ debido posiblemente a la implicación de esta proteína en la producción de daños en el endotelio de los vasos sanguíneos. Sin embargo, se ha observado también que, aunque la neumolisina puede estimular la cascada inflamatoria en el sistema nervioso central, no es necesaria para la patogénesis de la meningitis.⁽⁶⁹⁾

Otra observación importante acerca del papel desempeñado por la neumolisina en la virulencia del neumococo, es el hecho de que aumenta el tiempo de supervivencia de la bacteria *in vivo*, probablemente debido a su capacidad para inhibir la acción bactericida de los fagocitos o para degradar los componentes del sistema de complemento, también se ha descrito la capacidad de activar el sistema de complemento relacionada con la afinidad que posee por unirse a la porción FC de la inmunoglobulina humana de IgG.⁽⁷⁰⁾

Estudios en ratones han demostrado que cepas mutantes deficientes en la producción de neumolisina, tienen menor virulencia, también se demostró que esta proteína cuando está inactiva induce la producción de anticuerpos protectores. Por lo tanto esta proteína, en forma conjugada con el polisacárido capsular, podría incrementar la eficacia de una vacuna.⁽³²⁾

4.2.3.9.3.2. Neuramidasa

Es una proteína de 107 Kda, asociada a la pared celular causa daño en el huésped, es capaz de hidrolizar el ácido siálico terminal de las glicoproteínas, glicopéptidos y oligosacáridos presentes en la superficie de las células y en fluidos corporales, por lo tanto tendría un papel importante en la diseminación, adhesión y multiplicación de esta bacteria a las células epiteliales del huésped.^(2,32)

Además de causar daño a los tejidos sobre los que actúa, se ha observado que en pacientes con meningitis neumocócica, se produce bacteriemia y se llega al estado de coma mas a menudo que cuando existen concentraciones elevadas de ácido N-acetil neuraminico en el liquido cefalorraquídeo, probablemente debido a la acción de la neuramidasa.

Los modelos de inmunización activa con la neuramidasa purificada han demostrado un aumento en la sobrevivencia de los ratones después de la infección con el neumococo, lo cual sugiere una contribución de esta proteína con la patogenicidad del neumococo.⁽³²⁾

Hasta el momento se han descrito dos genes codificantes de neuramidasa en *S. pneumoniae*, ⁽⁷¹⁾ coexistiendo ambos en el cromosoma de neumococos de distintos serotipos.

4.2.3.9.3.3. Autolisinas

Estas enzimas están localizadas en la membrana celular, es una enzima que hidroliza la capa de péptido-glucano en un sitio específico, en la forma inactiva se unen al ácido lipoteicoico y a través de esta a la membrana de la bacteria. Estas enzimas están relacionadas con el proceso de división bacteriana (separación de las células hijas), de la transformación genética, y de funciones biológicas básicas del neumococo.

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 bacteriano, la lisis del neumococo por sales biliares ocurre a través de la activación de esta enzima. Recientemente se ha demostrado que esta autolisina es activada por la lisozima humana que es liberada durante la infección, e induce así a la lisis del neumococo.⁽³²⁾

4.2.3.9.3.4. Otros factores de virulencia

Se han descrito varias proteínas de superficie del neumococo que podrían intervenir en la patogénesis. Una de estas es la proteína de superficie (**PspA**),

unida a la pared celular y con capacidad antigénica. Hasta ahora no se ha podido determinar su función precisa, aunque se ha comprobado que su presencia en la superficie bacteriana de estirpes no capsuladas (rugosas o R) inoculadas a ratones, les confiere protección inmunológica contra cepas de distintos serotipos.

Desde hace décadas se conoce la capacidad de neumococo de producir una **hialuronidasa** (1.944) que es secretada al medio durante la fase exponencial de crecimiento *in vitro*, su sustrato es el ácido hialurónico, el cual rompe liberando los monosacáridos que lo componen, ácido glucorónico (Glc A) y N-acetil glucosamina (GlcN Ac), por lo tanto la hialuronidasa podría desempeñar un papel en la patogénesis neumocócica permitiendo el acceso de la bacteria a los tejidos del huésped para su colonización y facilitando la dispersión del microorganismo entre distintos tejidos.⁽⁷²⁾

Streptococcus pneumoniae produce una **proteasa** que rompe las inmunoglobulinas Ig A1 en un punto determinado de la zona bisagra, liberando así los fragmentos Fab y Fc. Los fragmentos Fab mantienen la especificidad por el antígeno uniéndose a este y, de este modo, bloquean la unión de la Ig A1 intactas, protegiendo a la bacteria del sistema inmune del huésped. Esta proteasa podría cumplir una función importante a la hora de anular la inmunidad local de la mucosa del huésped, principalmente desempeñada por inmunoglobulinas de la clase A, facilitando por lo tanto la colonización de la nasofaringe por la bacteria.

Existen, además, **otros factores de patogenicidad:**

- Neumococo secreta varias enzimas con actividad **serin proteasa** que degradan el tejido conjuntivo del huésped.⁽⁷³⁾
- Posee una o varias **proteasas de superficie** con capacidad de degradar sub unidades alfa y beta del factor C3 del complemento.⁽⁷⁴⁾
- El **peroxido de hidrogeno** producido por el metabolismo del neumococo resulta toxico para las células del epitelio alveolar.⁽⁷⁵⁾

Cuadro 2. Factores de virulencia de *Streptococcus pneumoniae*

Factor de virulencia	Acción
Cápsula	Inhibe la fagocitosis en ausencia de Anticuerpos específicos
Neumolisina	Hemolisina dermatóxica
Neuramidasa	Factor de difusión
Amidasa	Autolisina importante en la división celular

4.2.3.10. Diagnóstico bacteriológico

Es responsabilidad del médico y del laboratorista la recolección apropiada de las muestras clínicas, para el aislamiento del microorganismo, debido a que es un microorganismo de crecimiento fastidioso (exigente nutricionalmente), no sobrevive mucho en hisopos secos o en solución fisiológica, de manera que una vez obtenida la muestra debe ser cultivada de inmediato en medios sólidos como el agar sangre con 5% de sangre de cordero o en caldos enriquecidos como caldo soya tripticasa. Cuando se sospecha de una neumonía neumocócica se debe tomar una muestra de sangre para hemocultivo antes de la administración de antibióticos, la proporción de la muestra de sangre en relación al caldo de cultivo debe ser 1:10.⁽⁶⁾

Una vez cultivada la muestra en estufa a una temperatura de 35°C con la adición de 5% de CO₂, durante 18 a 24 horas, se observa desarrollo de colonias características alfa hemolíticas (hemólisis verde), pequeñas, mucoides con una depresión central producto de la autólisis celular progresiva, luego se realiza tinción Gram de las colonias, la observación al microscopio muestra diplococos Gram positivos lanceolados.⁽⁶⁾

Los procedimientos utilizados en laboratorio para la identificación de *Streptococcus pneumoniae* están ideados en primer lugar para diferenciarlos de los *Streptococcus viridans*, ya que ambos producen hemólisis alfa (verde) en agar sangre, y son negativos a la prueba de catalasa (peróxido de hidrógeno al 3%).⁽⁶⁾

La prueba presuntiva más usada es la de optoquina (clorhidrato de etilhidrocupreina) que es un derivado de la quinina que inhibe la proliferación del neumococo, pero no el de los *Streptococcus viridans*; para la prueba se aplica un disco de papel impregnado con el fármaco sobre el cultivo puro del microorganismo. ⁽⁶⁾

Otra prueba confirmatoria es la prueba de solubilidad en Bilis, se basa en la presencia de una amidasa autolítica, que escinde la unión entre alanina y el ácido murámico en el peptidoglucano, esta amidasa es activada por agentes tensioactivos como la bilis o las sales biliares (taurocolato o desoxicolato de sodio) que producen la lisis de los microorganismos, para esta prueba debe utilizarse 10% de desoxicolato de sodio con pH neutro y microorganismos frescos viables ⁽⁶⁾.

El método confirmatorio, rápido y útil para la identificación de este microorganismo es la reacción de Quellung de Neufeld. Esta prueba no solo identifica al microorganismo si no que además especifica el serotipo, puede identificar al neumococo en muestras de esputo, líquido cefalorraquídeo, exudados o cultivos. La prueba consiste en mezclar en un porta objetos una pequeña cantidad de muestra con 1µL de antisuero antineumocócico y azul de metileno, se examina con lente de inmersión 100X observándose la cápsula refringente, más retráctil e hinchada, sumada además a la aglutinación de los neumococos.⁽⁶⁾

También pueden utilizarse otras técnicas serológicas tales como la aglutinación con látex, coaglutinación ⁽⁶⁸⁾, el dot blot ⁽⁶⁹⁾, o amplificación génica mediante PCR, estas técnicas de tipificación sin embargo solo están disponibles en laboratorios de referencia.⁽²⁾

4.2.3.11. Patogénesis

El primer paso en la patogénesis de la neumonía es la colonización de la nasofaringe, seguida de la micro aspiración o inhalación del microorganismo hacia los pulmones, el agente debe sobrepasar los amplios mecanismos de defensa del tracto respiratorio que incluyen; células secretoras de moco, reflejos de la epiglotis, cilios, tos linfáticos, leucocitos polimorfonucleares, macrófagos, opsoninas, complemento y anticuerpos locales.⁽³⁰⁾

La adherencia a las células nasofaríngeas, resulta de la interacción entre proteínas superficiales bacterianas y células receptoras de mamíferos.⁽¹⁷⁾

Streptococcus pneumoniae se une a las células alveolares tipo II y la enfermedad se debe a la rápida multiplicación del agente en los espacios alveolares, el exudado intra- alveolar aumenta la multiplicación del neumococo. El exudado purulento compuesto de fibrina, polimorfonucleares y bacterias pasa de alveolo en alveolo a través de los poros de Kohn, horas después se presenta edema, el primer día empieza a producirse la hepatización roja (respuesta secundaria). La hiperemia local conduce a edema y acumulación de polimorfonucleares, de modo que al 2^{do} y 3^{er} día de la enfermedad el peso del pulmón puede llegar a ser de 3 a 4 veces de lo normal, luego se produce un exudado sanguinolento con congestión capilar y ocupación de los alvéolos por las bacterias y eritrocitos, luego los alvéolos son ocupados por fibrina, de modo que al 4^{to} y 5^{to}

día los pulmones tienen una apariencia blanca grisácea con abundantes leucocitos pero con escasas bacterias, se encuentra generalmente bronquitis purulenta difusa y adenopatía local. La resolución se caracteriza por la cicatrización completa sin necrosis tisular evidente.⁽³⁰⁾

Rara vez la neumonía neumocócica es una infección primaria y se produce solo cuando las barreras de defensa normales del tracto respiratorio están alterados. Una de las causas predisponentes más común es la infección viral del tracto superior, que contribuyen al establecimiento de la neumonía, los neumococos presentes en la nasofaringe proliferan en el medio modificado por los virus, son aspirados y arrastrados hacia los alvéolos por las finas secreciones bronquiales, especialmente si existen factores predisponentes como desnutrición, u otros que alteren la respuesta inmunitaria.^(23,33)

Por otro lado varias afecciones clínicas predisponen a la neumonía como: insuficiencia cardiaca congestiva, gases tóxicos y éstasis pulmonar, en todos estos casos se acumula liquido en los alvéolos lo cual constituye un excelente caldo de cultivo para el microorganismo.^(23,25)

El polisacárido capsular de este microorganismo juega un papel importante en el establecimiento de la infección que le permite resistir la fagocitosis, así las formas lisas son las encapsuladas y virulentas, lo contrario ocurre con las cepas rugosas.^(23,30)

La infección neumocócica en el hombre se manifiesta de varias maneras, puede presentarse desde el estado de portador sin afección del tracto respiratorio a un cuadro invasivo de neumonía lobar, empiema, meningitis, artritis, endocarditis, bacteriemia o a infecciones purulentas como otitis media y conjuntivitis. La bacteriemia ocurre en asociación con una faringitis hasta una septicemia fulminante. La meningitis neumocócica es una complicación más común de sinusitis, mastoiditis, otitis o neumonía,^(3,11,23) por lo tanto el estado inmune del portador en el momento de la colonización así como la virulencia de la cepa adquirida determinará si el neumococo invade o no al hombre.

4.2.3.12. Definición de Neumonía

La neumonía se define como la inflamación y condensación del parénquima pulmonar causada por un agente infeccioso; en la neumonía existe un reemplazo del contenido aéreo de los alvéolos y conductos alveolares por células y exudado inflamatorio.⁽³⁰⁾

Hasta hace pocos años atrás se designaba a la neumonía lobar o lobular provocada por el neumococo, en la actualidad abarca todos los procesos inflamatorios agudos del pulmón, que se manifiestan por exudación e infiltración celular localizada en los alvéolos, los intersticios y los pequeños bronquiolos

respiratorios, esta afección puede ser causada por numerosos agentes como son los microbianos, los físicos y químicos.⁽³⁴⁾

En general se considera que *Streptococcus pneumoniae*, es el agente etiológico más común de neumonía extrahospitalaria (NEH) o neumonía adquirida en la comunidad (NAC), dando cuenta del 15-80% de los casos, además puede ser responsable de un 10% de neumonías intrahospitalarias (NIH). En su conjunto produce morbi-mortalidad importante en todo el mundo.⁽³⁰⁾ También es la causa más común en personas con enfermedades de base y solo un 25% de los casos de neumonía se presenta con bacteriemia detectable por hemocultivo.⁽³⁵⁾

4.2.3.13. Definición de Meningitis

Son las inflamaciones agudas de carácter infeccioso que afectan a las meninges, principalmente a la blandas piamadre y aracnoides.⁽³⁴⁾

Streptococcus pneumoniae es la causa más común de meningitis bacteriana, se puede producir como consecuencia de la extensión directa desde los senos paranasales u oído medio, o más frecuentemente como resultado de una bacteriemia que alcanza los plexos coroideos, así mismo es el agente más frecuente en pacientes que han sufrido fractura de la base del cráneo con pérdida de LCR. Las secuelas suelen ser graves como retraso mental, espasticidad, paresia, convulsiones, sordera y otras afecciones neurológicas graves.⁽³⁵⁾

4.2.3.14. Definiciones Operacionales

- Se considera **caso sospechoso de neumonía** a todo niño menor de 5 años en que el médico sospecha neumonía por aumento de frecuencia respiratoria y/o tiraje subcostal.⁽³⁶⁾
- Se considera **caso probable de neumonía** a todo caso sospechoso con radiografía de pulmón, glóbulos blancos y VES (velocidad de eritrosedimentación) alterados.⁽³⁶⁾
- Se considera **caso confirmado de neumonía** aquel caso probable con cultivo de Sangre o Líquido pleural positivo para *Streptococcus pneumoniae*.⁽³⁶⁾
- Se considera **caso sospechoso de meningitis** a todo niño de un mes a menor de 5 años que presente cuadro clínico de meningoencefalitis.⁽³⁶⁾
- Se considera **caso probable de meningitis** a todo caso sospechoso con LCR turbio, resultado positivo de tinción de Gram o resultado citoquímico sugestivo con pleocitosis, hipoglucorraquia y proteinorraquia.⁽³⁶⁾

- Se considera **caso confirmado de meningitis** aquel caso probable con cultivo de LCR y prueba de Látex o reacción de Quellung positivo.⁽³⁶⁾

4.2.3.15. Definición de Enfermedad neumocócica invasiva

Se define así a cualquier infección en la que se aísla *Streptococcus pneumoniae* de la Sangre, LCR, líquido pleural u otra zona normalmente estéril. Las infecciones neumococcicas invasoras son mucho menos frecuentes que la otitis media o la neumonía. La incidencia de bacteriemia neumocócica es elevada en neonatos y niños menores de dos años, disminuye en adolescentes y adultos jóvenes y aumenta de nuevo en los adultos de mayor edad.

La mortalidad por bacteriemia neumocócica es del 16 al 36% entre todos los adultos y del 28 al 51% en mayores de 65 años. En la infancia la mortalidad es variable, entre 1,3 y 6,6%, el 90% de los serotipos que causan enfermedad invasora están incluidos en la vacuna polisacárida de 23 valencias.

4.2.3.16. Concepto de Serología

Es una rama de la inmunología que estudia las proteínas séricas y los cambios que suceden en el suero y otros líquidos orgánicos, a consecuencia de la entrada de un antígeno en el cuerpo y las reacciones antígeno-anticuerpo producidas.

4.2.3.17. Concepto de Serotipo

Es una individualidad dentro de una especie, producto de la diferenciación frente a reacciones antígeno-anticuerpo (antisueros) que permiten la clasificación por características específicas de estructuras antigénicas ubicadas en el soma, flagelo o cápsula.

4.2.3.18. Concepto de virulencia

Se define como virulencia a la frecuencia con la cual un serotipo está implicado en la infección humana, también se la define como la posibilidad de un serotipo se producir la enfermedad, una vez determinado el portador, causa neumonía o bacteriemia, en cuyo caso los serotipos al parecer más virulentos son el 1.2.3.5.8 y 12F.^(7,30)

4.2.3.19. Clasificación de Serotipos de *Streptococcus pneumoniae*

Hasta el momento se conocen 90 serotipos de *Streptococcus pneumoniae*, en base a diferencias en sus polisacáridos capsulares, los primeros 80 se identificaron en 1957, tres más fueron adicionados durante los siguientes 28 años.^(4,23)

En 1.985, Ahusarían describió el tipo 16A y Henrichsen en 1.995 describió los tipos 10B, 10C, 12B, 25A y 33D. El primer serotipo fue llamado F por primero (first), los siguientes serotipos los identificaron con los sufijos A, B, C, etc. basados en el orden de identificación del descubrimiento, una excepción a este sistema de identificación son los pertenecientes al serotipo grupo 9.⁽²⁸⁾

Mientras el sistema Americano asigna a los serotipos simplemente con números en secuencia del 1 al 90, el sistema Danés agrupa los serotipos basándose en similitudes antigénicas, por ejemplo el grupo Danés incluye tipos 19F, 19A, 19B, 19C, los que en el sistema Americano son 19, 57, 58, y 59 respectivamente.⁽⁴⁾

4.2.3.20. Serotipificación de *Streptococcus pneumoniae*

Si el aislamiento de *Streptococcus pneumoniae* es sensible a la optoquina y soluble en bilis, la identificación puede ser confirmada utilizando un OMNI suero, el cual es una mezcla de sueros polivalentes producidos en conejos, este suero contiene 83 antisueros Anti *Streptococcus pneumoniae* y es empleado en la reacción capsular o prueba de Neufeld Quellung que es producido por el Statens Seruminstitut de Copenhagen, Dinamarca.⁽²⁸⁾

Los títulos de anticuerpos tipo específico presentes en el omni-suero (>1:4) pueden no ser lo suficientemente altos para poner en evidencia o hacer visible las cápsulas, pero pueden producir una aglutinación microscópica, la cual puede ser considerada como una reacción positiva. Esta reacción es rara y es solamente informada cuando no ocurre una reacción significativa con uno de los otros sueros tipificadores en un aislamiento sensible a la optoquina y soluble en bilis.⁽²⁸⁾

El título bajo del omni-suero puede dar como resultado una reacción falsa negativa con ciertos aislamientos que son tipificables. Por esta razón, un aislamiento, no puede considerarse no serotipificable basado solamente en el resultado de la reacción del omni-suero.⁽²⁸⁾

Los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* son examinados inicialmente con la mezcla de sueros (título >1:8), y luego con los tipos o grupos no específicos (título >1:16). Las colonias rugosas pueden presentar una auto-aglutinación con diferentes sueros, si esto ocurre la cepa debe considerarse como no tipificable.⁽²⁸⁾

De acuerdo con la experiencia del Centro Nacional para *Streptococcus* en Alberta, el serotipo 3 ocasionalmente no reacciona con el pool B, la apariencia mucóide de los aislamientos es la clave para su identificación. Los aislamientos con esta morfología deben ser estudiados con el antisuero serotipo 3, a pesar de obtener resultados negativos con el pool B antes de ser clasificados como cepas no serotificables.⁽²⁸⁾

En 1.933 fue normalizada, una técnica simplificada para la serotipificación de *Streptococcus pneumoniae*, este sistema utiliza 12 pooles y un tablero de identificación, con el cual se pueden identificar 21 de los serotipos o serogrupos más comúnmente distribuidos en el mundo, todos estos serotipos forman parte de la vacuna 23-Valente.^(28,37)

Cuadro 3. Sistema del tablero de ajedrez para la serotipificación de *Streptococcus pneumoniae* con el empleo de 12 antisueros polivalentes

Polivalentes	Polivalentes					Tipos/Grupos no relacionados con la vacuna de 23 serotipos
	P	Q	R	S	T	
A	1	18*	4	5	2	
B	19*	6*	3	8		
C	7*				20	24*, 31, 40
D			9*		11*	16*, 36, 37
E			12*	10*	33*	21, 39
F				17*	22*	27, 32*, 41*
H	14	23*		15*		13, 28*
G ^a						29, 34, 35*, 42, 47*
I ^a						25, 38, 43, 44, 45, 46, 48

Fuente: Manual de *Streptococcus pneumoniae* OPS 2002. Bogotá- Colombia.

* Grupo

^a Los polivalentes G e I no reaccionan con los tipos incluidos en la vacuna de 23 serogrupos, por lo tanto no están incluidos en el nuevo sistema del tablero de Ajedrez.

Cuadro 4. Factores de los sueros requeridos para subtipificar las cepas que pertenecen a los grupos y patrón de reactividad esperado

Tipo	Fórmula Antigénica	Factor de Suero			
		6b	6c		
6A	6a, 6b	+	-		
6B	6a, 6c	-	+		
		7b	7c	7e	7f
7F	7a, 7b	+	-	-	-
7A	7a, 7b, 7c	+	+	-	-
7B	7a, 7d, 7e, 7h	-	-	+	-
7C	7a, 7d, 7f, 7g, 7h	-	-	-	+
		9b	9d	9e	9g
9A	9a, 9c, 9d	-	+	-	-
9L	9a, 9b, 9c, 9f	+	-	-	-
9N	9a, 9b, 9e	+	-	+	-
9V	9a, 9c, 9d, 9g	-	+	-	+
		10b	10d	10f	
10F	10a, 10b	+	-	-	
10A	10a, 10c, 10d	-	+	-	
10B	10a, 10b, 10c, 10d	+	+	-	
10C	10a, 10b, 10c, 10f	+	-	+	
		11b	11c	11f	11g
11F	11a, 11b, 11e, 11g	+	-	-	+
11A	11a, 11c, 11d, 11e	-	+	-	-
11B	11a, 11b, 11f, 11g	+	-	+	+
11C	11a, 11b, 11c, 11d, 11f	+	+	+	-
11D	11a, 11b, 11c, 11e	+	+	-	-
		12b	12c	12e	
12F	12a, 12b, 12d	+	-	-	
12A	12a, 12c, 12d	-	+	-	
12B	12a, 12b, 12c, 12e	+	+	+	
		15b	15b	15e	15h
15F	15a, 15b, 15c, 15f	+	+	-	-
15A	15a, 15c, 15d, 15g	-	+	-	-
15B	15a, 15b, 15d, 15e, 15h	+	-	+	+
15C	15a, 15d, 15e	-	-	+	-

Fuente: Manual de *Streptococcus pneumoniae* OPS 2002. Bogotá-Colombia.

Cuadro 4. Factores de los sueros requeridos para subtipificar las cepas que pertenecen a los grupos y patrón de reactividad esperado

Tipo	Fórmula Antigénica	Factor de Suero			
		16b	16c		
16F	16a, 16b, 11d	+	-		
16A	16a, 17c	-	+		
17F	17a, 17b	17a	17c		
		+	-		
17A	17a, 17c	-	+		
18F	18a, 18b, 18c, 18f	18c	18d	18e	18f
		+	-	+	+
18A	18a, 18b, 18d	-	+	-	-
18B	18a, 18b, 18e, 18g	-	-	+	-
18C	18a, 18b, 18c, 18e	+	-	+	-
19F	19a, 19b, 19d	19b	19c	19h	19f
		+	-	-	-
19A	19a, 19d, 19d	-	+	-	-
19B	19a, 19c, 19e, 7h	-	+	+	-
19C	19a, 19c, 19f, 7h	-	-	+	+
22F	22a, 22b	22b	22c		
		+	-		
22A	22a, 22c	-	+		
23F	23 ^a , 23b, 18b	23b	23c	28uabs	
		+	-	-	
23A	23 ^a , 23c, 15a	-	+	-	
23B	23 ^a , 23b, 23d	+	-	+	
24F	24 ^a , 24b, 24d, 7h	24c	24d	24e	
		-	+	-	
24A	24 ^a , 24c, 15a	+	+	-	
24B	24 ^a , 24b, 24e, 7h	-	-	+	
25F	25a, 25b	25b	25c		
		+	-		
25A	25a, 25c, 38a	-	+		

Fuente: Manual de *Streptococcus pneumoniae* OPS 2002. Bogota-Colombia.

Cuadro 4. Factores de los sueros requeridos para subtipificar las cepas que pertenecen a los grupos y patrón de reactividad esperado

Tipo	Fórmula Antigénica	Factor de Suero				
		28b	28c			
28F	28a, 28b, 16b, 23d	+	-			
28A	28a, 28c, 23d	-	+			
32F	32a, 27b	32a	32b			
		+	-			
32A	32a, 32b, 27b	+	+			
33F	33a, 33b, 33b	33b	33e	33f	6a	20b
		+	+	-	-	-
33A	33a, 33b, 33d, 20b	+	+	-	+	
33B	33a, 33c, 33d, 33f	-	-	+	-	
33C	33a, 33c, 33e	-	-	+	+	
35F	35a, 35b, 34b	35a	35b	35c	29b	42a
		+	+	-	-	-
35A	35a, 35c, 20b	+	-	+	-	-
35B	35a, 35c, 29b	+	-	+	+	-
35C	35a, 35c, 20b, 42a	+	-	+	-	+
41F	41a, 41b	41a	41b			
		+	+			
41A	41 ^a	+	-			
47F	47a, 35 ^a , 35b	47a	43b			
		+	-			
47A	47a, 43b	+	+			

Fuente: Manual de *Streptococcus pneumoniae* OPS 2002. Bogotá-Colombia.

4.2.3.21. Profilaxis y Prevención

Se indica quimioprofilaxis con penicilina V o ampicilina para pacientes con riesgo de infecciones repetidas por neumococos, hipogamaglobulinemia, esplenectomizados y probablemente en EPOC.⁽³⁸⁾

Los esfuerzos para controlar las infecciones producidas por *Streptococcus pneumoniae*, se han dirigido a la elaboración de vacunas (inmunoprofilaxis) a partir del polisacárido capsular del microorganismo.⁽³⁸⁾

El interés por el diseño y desarrollo de vacunas antineumocócicas ha pasado por varias fases a lo largo de este siglo. Desde los trabajos de Wrigh en 1.991 que utilizó una vacuna de células muertas para prevenir la neumonía neumocócica en mineros sudafricanos. Se produjeron y estudiaron varios productos: una vacuna tetravalente en 1.945 por Mc Leod y colaboradores y dos hexavalentes en 1.946. A finales de los años 40, debido al auge de la antibiotecoterapia recientemente descubierta, estas investigaciones perdieron interés, a mediados de los 60 se pusieron en marcha nuevos estudios al constatar que el 80% de las neumonías neumococcicas estaban causadas por 12 serotipos de los que 6 producían el 50% de las muertes. Es así que se autorizo en EE. UU. la vacuna de 14 polisacáridos capsulares que en 1.983 fue sustituida por la de 23 polisacáridos.⁽³⁹⁾

4.2.3.21.1. Vacuna polisacárida no conjugada 23 valente

En 1.983 se autorizo en EE.UU., esta vacuna polivalente compuesta por polisacáridos capsulares de 23 serotipos distintos de neumococo con 25 pg de cada uno en una suspensión total de 0,5mL; estos serotipos causan aproximadamente el 90% de las infecciones neumococcicas graves en Estados Unidos y en otros países.^(38,40)

Los serotipos incluidos en la vacuna son los siguientes: 1,2,3,4,5,6B,7F,8, 9N, 9V10,11,12F,14,15B,17F,18C,19,19F,20,22F,23F y 33F,^(33,34) esta vacuna además induce cierto tipo de protección cruzada frente al serotipo 27.⁽³⁹⁾

Los polisacáridos capsulares presentes en la vacuna, promueven la producción de anticuerpos específicos par cada tipo capsular.⁽³⁸⁾ Sin embargo no inducen inmunidad frente a infecciones causadas por otros tipos capsulares no presentes en la vacuna ni frente a otros patógenos no relacionados.⁽⁴⁰⁾ La respuesta inmune no es homogénea para todos los serotipos, algunos como el 3 y el 7 son mas inmunógenos que otros como el 9 y el 14.⁽³⁹⁾

En niños menores de 2 años no esta indicada esta vacuna, ya que los polisacáridos capsulares se comportan como antígenos independientes de los linfocitos T, por lo tanto la respuesta inmune es débil, de corta duración y no induce memoria inmunológica, por otro lado no esta indicada en las infecciones recurrentes del tracto respiratorio superior particularmente en otitis media y sinusitis. ^(38,40)

4.2.3.21.2. Vacuna polisacárida conjugada

Es un vacuna compuesta a partir de polisacáridos capsulares de diferentes serotipos de *Streptococcus pneumoniae* conjugados con una proteína transportadora como el toxoide tetánico diftérico, proteínas de membrana externa de meningococo tipo B y la proteína CRM 197,⁽⁴⁴⁾ cuyo objetivo es el de

transformar la respuesta inmune inducida de Timo independiente a Timo dependiente, su aplicación está recomendada en niños menores de 2 años. ^(38,40)

Los serotipos incluidos en la actual vacuna aprobada por la FDA y el ACIP en Estados Unidos es una 7-valente que contiene los serotipos: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F conjugados individualmente con un proteína transportadora, una mutante no toxica de la toxina diftérica CRM197, la vacuna contiene por cada 0,5ml 2ug de cada polisacárido capsular, excepto del serotipo 6B que tiene 4ug, 20ug de CRM197 y 0,125mg de fosfato de aluminio como adyuvante.⁽³⁸⁾

La aprobación de la vacuna se baso en un importante estudio de campo que hizo el Dr. Steven Black y el grupo permanente Káiser del Centro de Estudios de Oacland, California. Otras vacunas conjugadas 9-valentes y 11valentes están en fase de experimentación, que pueden elevar la potencial cobertura a 80 y 90% respectivamente. ^(38,41)

Cuadro 5. Vacunas conjugadas antineumocócicas

Vacuna	Serotipos	Laboratorios
7 serotipos Polisacáridos con CRN 197 Polisacáridos con PME	4,6B,9V,14,18C,19F y 23F	Wyeth, Cederle
9 serotipos Polisacáridos con CRM 197	Ídem anterior mas serotipos 1 y 5	Ídem
11 serotipos Polisacáridos con CRM 197 Polisacáridos con TD y TT Polisacáridos con porina D	Ídem anterior más serotipos 3 y 7V	Ídem

Fuente: Proyecciones de las vacunas antineumocócicas en Latinoamérica en Rev. Chilena 2.001.

4.2.3.21.3. Indicaciones de la vacunación

La vacuna neumocócica se recomienda a grupos de riesgo particulares definidos por la existencia de una patología subyacente o de un terreno debilitante, como pacientes con insuficiencias cardiacas, con antecedentes de infección pulmonar invasiva por neumococos, alcohólicos que presentan una hepatopatía crónica, sujetos infectados por HIV, cancerosos, inmunodeprimidos, la drepanocitosis y la existencia de una esplenectomía, etc.⁽⁴⁰⁾

Se pueden detectar anticuerpos específicos de tipo Ig M y Ig G a los 5 a 8 días post vacunación. En el 80% de las personas adultas sanas inmunizadas los anticuerpos persisten durante 5 años o mas, en los niños sanos la respuesta esta condicionada por la edad, siendo todavía pobre hasta los 8 a 19 años de edad, y a partir de entonces es comparable a la de la población adulta.⁽³⁹⁾ Se recomienda la revacunación cada cinco años para mayores de 65 años, en inmunodeprimidos, esplenectomizados de cualquier edad, pacientes con anemia drepanocítica y en múltiples enfermedades crónicas.⁽⁴²⁾

4.2.3.22. Tratamiento

A pesar de la antibiotecoterapia, la mortalidad por *Streptococcus pneumoniae* es abundante, sobre todo en pacientes de edades extremas (niños menores de dos años y adultos de 65 a 70 años).⁽¹¹⁾

La droga aconsejada para el tratamiento de infección neumocócica es la Penicilina G, administrada por vía intramuscular, en caso de alergia se utilizan Eritromicina, Cefalosporinas de tercera generación, Vancomicina y otros. Sin embargo ante la creciente resistencia de este microorganismo a los antibióticos betalactámicos, la droga de elección es la Vancomicina.^(17,42)

4.2.3.23. Epidemiología molecular

La epidemiología molecular permite reconocer características genéticas de las bacterias no reveladas por las técnicas de laboratorio convencionales,⁽⁴⁴⁾ el mismo ha revelado que el *Streptococcus pneumoniae* es naturalmente competente para la transformación genética, que le permite incorporar ADN (ácido desoxirribonucleico) externo que es asimilado al cromosoma bacteriano a través de eventos de recombinación constituyéndose en el motor principal de su proceso evolutivo.⁽²⁵⁾

Se demostró que los cambios de serotipo eran producto de una transformación genética horizontal entre neumococos que involucraba la transferencia de genes de biosíntesis de la cápsula, lo cual le ha permitido evadir presiones selectivas específicas como una respuesta inmunológica del hospedero o una resistencia a tratamiento con antimicrobianos.⁽⁴¹⁾

El fenómeno de cambio de serotipo ha sido documentado fundamentalmente en cepas resistentes a Penicilina,⁽²⁵⁾ esa resistencia a los antimicrobianos es el resultado de eventos independientes que involucran a cepas de diversos serotipos y linajes genéticos, claramente se destacan algunos clones de difusión intercontinental, como el clon serotipo 23F, altamente resistente a los betalactámicos, cotrimoxazol, cloranfenicol y tetraciclinas. Este clon fue identificado en España en la década de los 80 que se diseminó a países de los cinco continentes.⁽²⁵⁾

La introducción en Islandia de otro clon 6B del mismo origen, provocó un aumento de la resistencia a penicilina en ese país,⁽²⁵⁾ también el clon Francés que expresan alternativamente los serotipos 14, 9V y 19F se ha diseminado en Latinoamérica con un predominio en Uruguay y Argentina.⁽⁴¹⁾

Se aisló un gen “Gal U” que codifica una enzima identificada como pirofosforilasa que participa en la formación de UDP glucosa, componente de todos los *Streptococcus pneumoniae*. La inactivación de este gen conduce a la formación de cepas acapsuladas y por lo tanto de menor virulencia. Se postula que la proteína Gal U es una interesante diana a la hora de desarrollar nuevas drogas para controlar la expansión de bacterias patógenas como el neumococo.⁽⁴⁵⁾

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 Tipo de investigación

Al ser un estudio que pretende determinar las características epidemiológicas de los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* aislados en niños menores de cinco años que cursan procesos invasivos tales como neumonías y meningitis, en un tiempo determinado (2.000 – 2.005) se está realizando un estudio prospectivo y transversal.

5.2. Unidad de Análisis

Cepas de *Streptococcus pneumoniae* aislados de procesos invasivos, (Sangre, Líquido cefalorraquídeo y Líquido Pleural), de pacientes pediátricos menores a cinco años, con cuadros clínicos de neumonías y meningitis, durante las gestiones 2000-2.005.

5.3. Criterios de Inclusión

Niños menores a cinco años internados en ocho hospitales centinela de las ciudades de La Paz, Cochabamba y Santa Cruz, que presentaban cuadros clínicos sugestivos de meningitis y neumonías, no importando el sexo ni el nivel socio económico.

5.4. Tipo de muestra

Para el siguiente estudio se realizó el muestreo no probabilístico, con sujetos tipo que reúnen las características epidemiológicas, sociales y demográficas de dicho subgrupo. Es decir las cepas estudiadas cumplen el objetivo fundamental del

estudio que es la determinación de serotipos en muestras invasivas, no importando la cantidad, sino la calidad de la información obtenida, que representa a una población determinada.

5.5. Recolección de datos

Todos los laboratorios participantes aceptaron un protocolo básico propuesto por los asesores en epidemiología, en ese formulario se recogieron datos de filiación del paciente, hospital, sexo, edad, fecha de ingreso, diagnóstico clínico, radiológico y el resultado de los estudios bacteriológicos.(Anexo 1)

5.6. Recolección de cepas

La recolección de cepas se realizó con la participación de los profesionales bacteriólogos que trabajan en los ocho laboratorios centinela, quienes previamente fueron capacitados por el laboratorio de referencia (INLASA) a través de un Taller realizado en la ciudad de La Paz, sobre toma de muestra e identificación del *Streptococcus pneumoniae* siguiendo para ello normas de la CLSI (Clinical Laboratory Standard International).

La vigilancia de *Streptococcus pneumoniae* contó con el apoyo económico de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), quien proporcionó todos los insumos y reactivos necesarios para la toma de muestra, procesamiento e identificación, así como del envío de las cepas al centro de referencia nacional.

El Laboratorio Nacional de Referencia, se encargó de la confirmación bacteriológica, así como de la serotipificación de las cepas recepcionadas, bajo estrictas normas de control de calidad interno a través de cepas ATCC. (American Type Control Culture).

Todas las cepas serotificadas por el laboratorio de referencia a su vez, fueron sometidas a un control de calidad externo y confirmación de resultados, realizado por el Instituto Nacional de Salud Pública de Bogotá – Colombia.

5.7. Procesamiento de datos

El recuento de datos se realizó de manera descriptiva por el sistema de Microsoft Excel, los datos se presentan en tablas y gráficas.

El análisis de los resultados se efectuó en el paquete STATA versión 6.0 y Epi INFO versión 3.3.2 (2.003), utilizando el estadístico Chi cuadrado. Se inicio la exploración de los datos confirmando su validez, se procedió después al estudio

descriptivo observando la distribución de las variables de acuerdo a su naturaleza estadística, se considero como estadísticamente significativo un $p < 0,005$.

6. MATERIAL, REACTIVOS, METODOS Y PROCEDIMIENTO

6.1 METODOS

Se definió al INLASA como laboratorio de Referencia Nacional para la recepción de cepas, identificación bacteriológica y serotipificación del *Streptococcus pneumoniae*, quien tuvo la capacitación respectiva, replicando dicha capacitación a los responsables de los laboratorios centinela departamentales y focales de Santa Cruz, Cochabamba y La Paz encargados del aislamiento del microorganismo.

Los hospitales y laboratorios que participaron de esta vigilancia fueron:

Santa Cruz: Hospitales Universitario Japonés, Hospital de Niños Mario Ortiz Suárez, teniendo como laboratorio focal o de referencia departamental a CENETROP.

Cochabamba: Hospital Albina Patiño, Hospital Germán Urquidi, con su centro focal o de referencia departamental a la Escuela Técnica de Salud.

La Paz: Hospital de Niños Ovidio Aliaga, Hospital Obrero N°1, Hospital San Gabriel, teniendo como centro focal y de referencia Nacional al INLASA

Las funciones que cumplieron cada uno de los laboratorios fueron:

6.1.1. Laboratorio Centinela

- Toma de muestra
- Siembra primaria
- Pruebas de identificación bacteriana (Bioquimiotipia)
- Sensibilidad y resistencia I
- Envío de cepas al laboratorio focal

6.1.2. Laboratorio focal

- Recepción de cepas
- Resiembra
- Pruebas de Identificación bacteriana (Bioquimiotipia)
- Sensibilidad y Resistencia I
- Envío de cepa al laboratorio de referencia

6.1.3. Laboratorio de Referencia

- Recepción de cepas
- Resiembra
- Confirmación de diagnóstico bacteriano (Bioquimiotipia)
- Sensibilidad y resistencia I
- Sensibilidad y resistencia II
- Serotipia
- Envío de cepas para control de calidad externo al I.N.S. - Bogota
- Conservación de cepas

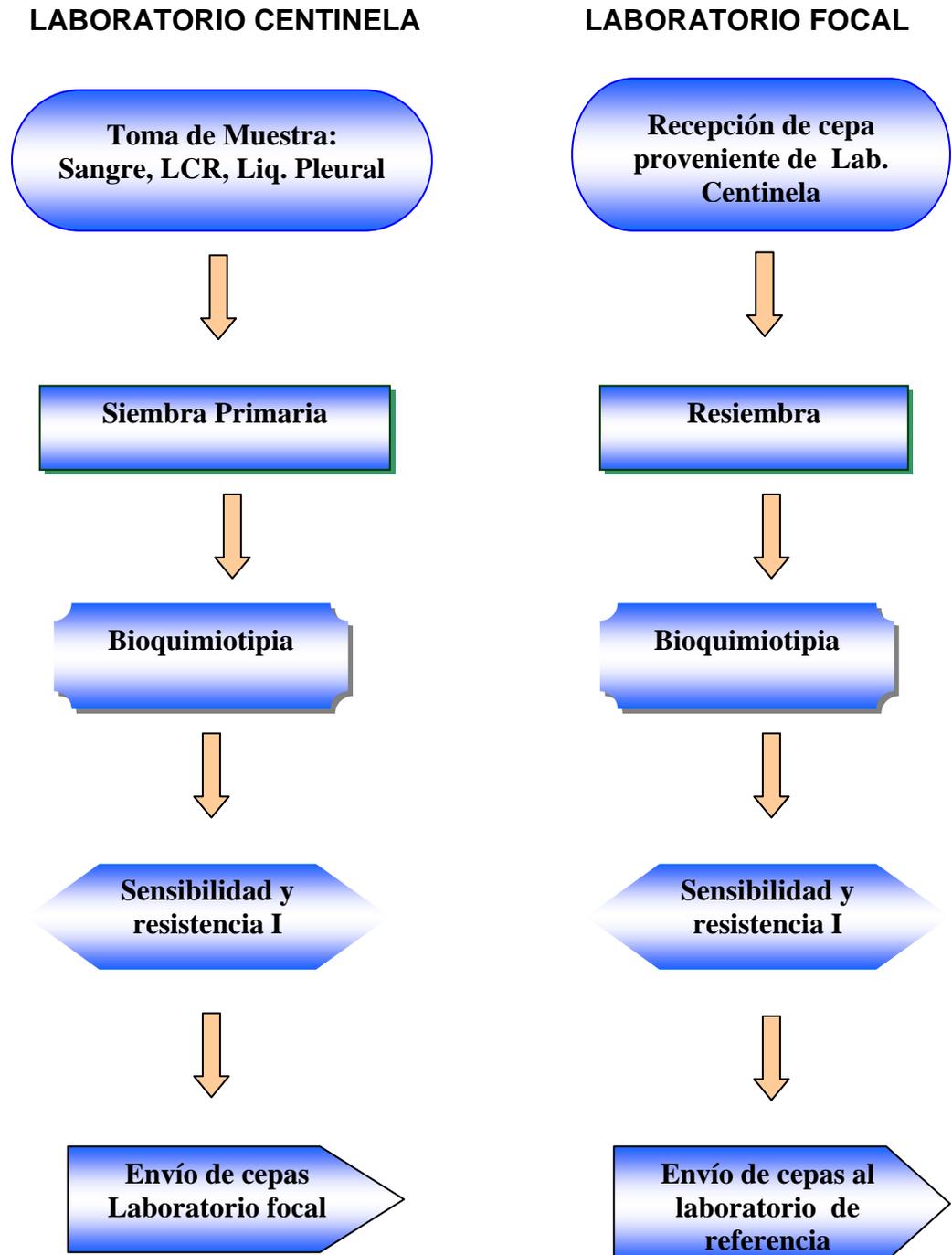
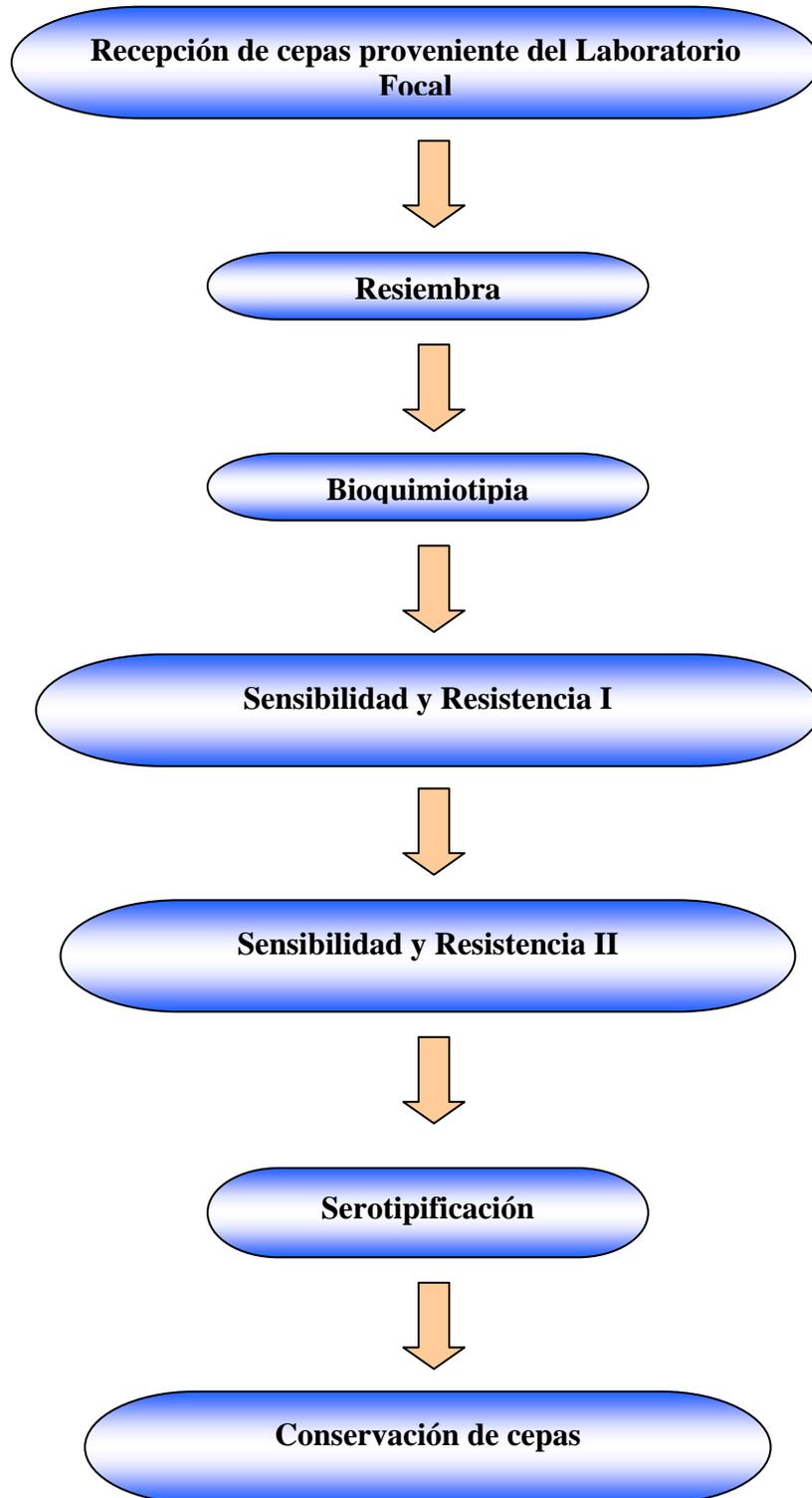
Figura 4. Funciones de los laboratorios Centinela y Focal

Figura 5. Función del laboratorio de Referencia

6.2. PROCEDIMIENTO

6.2.1. Toma de Muestras

La obtención de muestras de Sangre, LCR y Líquido pleural, fueron cuidadosamente establecidas, ya que se trataba de procedimientos que no estaban incorporados a la rutina de muchas instituciones, por lo que se realizó un taller de entrenamiento a todos los profesionales responsables de los laboratorios centinela, quienes se capacitaron en técnicas de laboratorio, incluida la identificación del microorganismos y pruebas de susceptibilidad (Anexo 5)

Los frascos de hemocultivo se incubaron a 35°C, se realizaron subcultivos hasta el séptimo día en placas de agar sangre de cordero al 5% con 5 a 10% de CO₂. (Anexo 2, 6)

El LCR y líquido pleural se centrifugaron; el sobrenadante fue decantado, con el sedimento se prepararon frotis para examen directo por tinción Gram y para siembra en placas de agar sangre de cordero al 5% con 5 a 10% de CO₂.(Anexo 5)

6.2.2. Recolección

Una vez que el microorganismo fue identificado y aislado por los laboratorios centinela de los tres departamentos, se enviaron al laboratorio de referencia del INLASA, utilizando el medio de Amies con carbón activado para el transporte de la cepa; medio que fue adquirido comercialmente (Anexo 6). El Laboratorio de referencia se encargo de confirmar el diagnóstico bacteriológico y la determinación de serotipos.

6.2.3. Cultivo y aislamiento de las cepas

Las cepas fueron cultivadas en agar sangre, al 5% de sangre de cordero, e incubadas a 35°C, con la adición de 5 a 7% de CO₂, durante 18 a 24 horas. (Anexo 6)

6.2.4. Observación Macroscópica

Después del periodo de incubación, se observaron colonias redondas lisas, pequeñas, brillantes, mucosas y no pigmentadas de 1 a 3mm de diámetro, rodeadas de un halo verde de hemólisis alfa (α), pasado las 24 horas, las colonias presentaron un aspecto umbilicado, con una depresión central producida por una autólisis celular progresiva. (Anexo 6)

6.2.5. Tinción de la Muestra

6.2.5.1. Frotis

Para realizar el frotis, se colocó una gota de agua destilada sobre un portaobjetos limpio, al que se le añadió una colonia bien aislada del cultivo fresco, se mezcló realizando un extendido homogéneo y delgado, posteriormente se fijó la muestra, inicialmente a medio ambiente y después por acción del calor proveniente de un mechero Bunsen.

6.2.5.2. Tinción Gram.

Una vez fijadas los extendidos, se procedió a teñir, utilizando la batería de Tinción Gram compuesta por violeta de genciana, lugol, alcohol acetona, y fucsina básica. (Anexo 3,6)

6.2.5.3. Observación Microscópica

Para la observación en microscopio se utilizó el objetivo de 100X, se colocó aceite de inmersión sobre el extendido teñido y se observaron diplococos lanceolados Gram positivos. (Anexo 3, 6)

6.3. PRUEBAS DIFERENCIALES CONFIRMATORIAS

6.3.1. Prueba de la catalasa

Esta prueba se realizó sobre un portaobjetos limpio, al que se le colocó una azada de colonias e inmediatamente el reactivo de peróxido de hidrógeno al 3%. (Anexo 3,6)

Streptococcus pneumoniae, da una reacción negativa porque no posee citocromos, ni la enzima catalasa para desdoblarse el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, por lo tanto no se observa burbujeo. (Anexo 3, 6)

6.3.2. Prueba de la Optoquina

Para esta prueba se realizó una siembra de la cepa en agar sangre ovina, se colocó un disco de optoquina de 5ug (etilhidrocupreína), se incubó durante 18 a 24 horas con 5% de CO₂, al cabo de este tiempo se realizó la lectura, *Streptococcus pneumoniae* es sensible a este reactivo dando un halo ≥ 14 mm. (Anexo 3, 6)

6.3.3. Prueba de Solubilidad en bilis

Para esta prueba se realizó una suspensión bacteriana de *Streptococcus pneumoniae*, igual a 1 de la escala de Mac Farland, al que se añadió desoxicolato de sodio al 10%, se incubó por un tiempo no mayor a 3 horas y se observó si se aclara o no la suspensión bacteriana.

Streptococcus pneumoniae es lisado por el desoxicolato de sodio, por lo que se observa un aclaramiento de la suspensión bacteriana, producto de la solubilización del microorganismo por el reactivo.(Anexo 3,6)

6.3.4. Prueba de Quellung

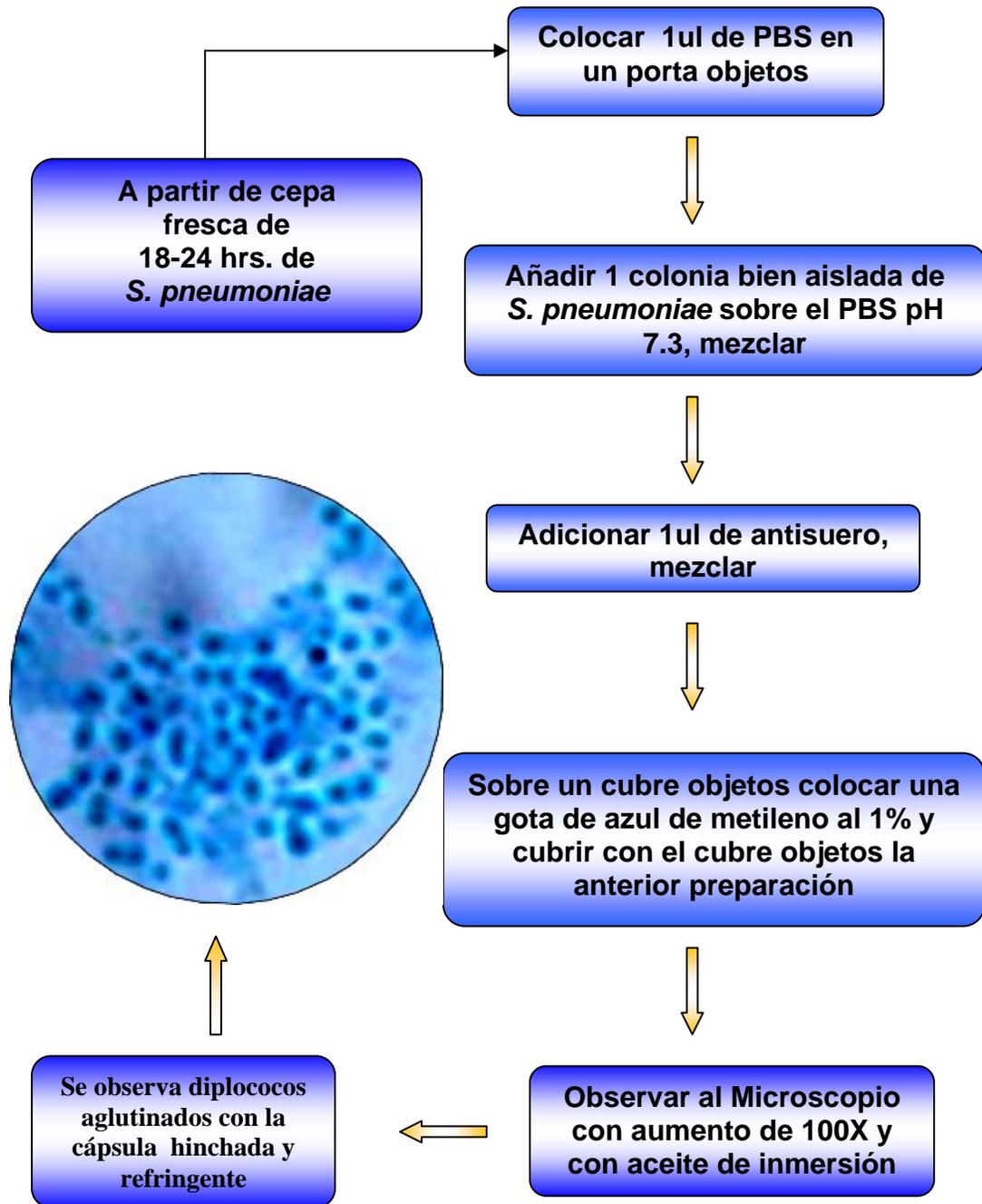
La determinación de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* se realizó mediante la reacción de Quellung, que pone de manifiesto la cápsula del neumococo. Para ello se prepara pequeñas suspensiones del microorganismo sobre un porta objetos, al que se le añade 1ul de antisero antineumocócico y azul de metileno, al cabo de unos minutos se examina la preparación al microscopio con objetivo de inmersión. La cápsula parece de este modo estar hinchada y se visualiza con un halo claro, refringente rodeando a la bacteria, este efecto se produce como consecuencia de un aumento en el índice de refracción del polisacárido capsular, al reaccionar con los anticuerpos, sumado además de una aglutinación de las bacterias. (Anexo 6)

Para la serotipificación se utilizó 12 pooles o mezclas de antisueros polivalentes: A,B,C,D,E,F,H,P,Q,R,S,T. Todas las cepas fueron serotipificadas siguiendo el sistema del tablero de ajedrez; inicialmente se examinaron con cada uno de los antisueros polivalentes P,Q,R,S,T (título 1:16), luego con cada uno de los antisueros polivalentes A,B,C,D,E,F,H (título>1:8); el serotipo se determinó en función a la reacción con uno de los antisueros probados.

Los antisueros (12 pooles o mezcla de sueros polivalentes producidos en conejos que contienen 83 antisueros anti *Streptococcus pneumoniae*), fueron suministrados por el Staten Seruminstitut de Copenhague, Dinamarca. (Anexo 6).

Finalmente se utilizaron los factores del suero para la identificación de los subtipos que estuvo a cargo del INS (Instituto Nacional de Salud) de Colombia.

Figura 6. Flujograma de la Técnica de Quellung



7. RESULTADOS

Tabla 1. Cepas de *Streptococcus pneumoniae* recolectadas por los Hospitales Centinela de las ciudades de La Paz, Cochabamba y Santa Cruz, que fueron serotipificadas en el INLASA y sub - tipificadas en el INS- Colombia, siguiendo el método de Quellung, durante las gestiones 2000 – 2005

Código	Edad paciente	Sexo paciente	Muestra	Procedencia	Institución	Dx. Presuntivo	Serotipo
Spn 1/00	5a	M	Sangre	La Paz	H. Obrero	Neumonía	6 B
Spn 2/00	3m	M	Sangre	La Paz	H. Obrero	Neumonía	6 B
Spn 3/00	1a 2m	M	LCR	Sta. Cruz	HN MOS	Meningitis	14
Spn 4/00	2a 4m	F	Sangre	La Paz	H. Obrero	Neumonía	6 A
Spn 5/00	8m	F	LCR	Sta. Cruz	HN MOS	Meningitis	15 C
Spn 6/00	5a	M	Sangre	La Paz	H. Obrero	Neumonía	19 F
Spn 7/00	2a 3m	M	LCR	La Paz	H. Obrero	Meningitis	10 A
Spn 8/00	1a 6m	M	LCR	La Paz	H. San Gabriel	Meningitis	24 F
Spn 9/01	1a 3m	M	L. Pleural	CBBA	H. Germán Urquidi	Neumonía	14
Spn 10/01	1a 8m	M	Sangre	CBBA	H. Albina Patiño	Neumonía	14
Spn 11/01	1a 8m	M	L. Pleural	CBBA	H. Albina Patiño	Neumonía	14
Spn 12/01	3a	M	LCR	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Meningitis	11 A
Spn 13/01	1a 8m	M	LCR	Sta. Cruz	Univ. Japonés	Meningitis	14
Spn 14/01	7m	M	Sangre	CBBA	H. Albina Patiño	Meningitis	19 F
Spn 15/01	7m	M	LCR	CBBA	H. Albina Patiño	Meningitis	19 F
Spn 16/01	1m	F	LCR	CBBA	Esc. Tec. de Salud	Meningitis	5
Spn 17/01	7m	F	LCR	CBBA	H. Albina Patiño	Meningitis	19 F

Código	Edad paciente	Sexo paciente	Muestra	Procedencia	Institución	Dx. Presuntivo	Serotipo
Spn 18/01	5a	M	Sangre	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Neumonía	19 F
Spn 19/01	3a	F	Sangre	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Neumonía	24 F
Spn 20/01	4a 2m	M	Sangre	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Neumonía	19 F
Spn 21/01	1a 5m	F	Sangre	CBBA	H. Albina Patiño	Meningitis	14
Spn 22/01	1a 5m	F	LCR	CBBA	H. Albina Patiño	Meningitis	14
Spn 23/01	5a	F	Sangre	La Paz	H. San Gabriel	Neumonía	6 B
Spn 24/01	9m	F	Sangre	CBBA	Esc. Tec. de Salud	Neumonía	6 B
Spn 25/01	5a	M	Sangre	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Neumonía	19 F
Spn 26/01	3a	F	LCR	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Meningitis	NST
Spn 27/01	1a 4m	M	LCR	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Meningitis	8
Spn 28/01	4a 1m	M	Sangre	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Neumonía	23 F
Spn 29/01	2m	M	LCR	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Meningitis	7 F
Spn 30/01	1m	M	LCR	CBBA	H. Albina Patiño	Meningitis	5
Spn 31/02	4m	M	LCR	CBBA	H. Albina Patiño	Meningitis	19*
Spn 32/02	1a 5m	F	Sangre	CBBA	H. Albina Patiño	Neumonía	19*
Spn 33/02	1a 4m	M	Sangre	CBBA	H. Albina Patiño	Neumonía	6*
Spn 34/02	3a 1m	F	Sangre	CBBA	H. Albina Patiño	Neumonía	6*
Spn 35/02	2a 9m	M	Sangre	La Paz	H. San Gabriel	Neumonía	19*
Spn 36/02	2m	M	LCR	CBBA	H. Albina Patiño	Meningitis	19*
Spn 37/02	2m	M	Sangre	CBBA	H. Albina Patiño	Meningitis	19*
Spn 38/02	1a	M	LCR	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Meningitis	6 B
Spn 39/02	4a	M	Sangre	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Neumonía	19 F
Spn 40/02	8m	M	LCR	CBBA	H. Albina Patiño	Meningitis	19 F
Spn 41/02	8m	M	Sangre	CBBA	H. Albina Patiño	Meningitis	19 F

/

Código	Edad paciente	Sexo paciente	Muestra	Procedencia	Institución	Dx. Presuntivo	Serotipo
Spn 42/02	6m	M	LCR	CBBA	H. Albina Patiño	Meningitis	6 B
Spn 43/02	3m	M	Sangre	CBBA	Esc. Tec. de Salud	Neumonía	7*
Spn 44/02	10m	M	LCR	CBBA	Esc. Tec. de Salud	Meningitis	34
Spn 45/02	8m	M	LCR	Sta. Cruz	HNNOS	Meningitis	33
Spn 46/02	6m	M	LCR	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Meningitis	7 F
Spn 47/02	7m	F	LCR	Sta. Cruz	HNMOS	Meningitis	11*
Spn 48/02	7m	F	LCR	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Meningitis	28 F
Spn 49/02	1a 2m	M	LCR	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Meningitis	11
Spn 50/02	1a 6m	M	LCR	CBBA	H. Albina Patiño	Meningitis	28 F
Spn 51/02	4m	F	LCR	Sta. Cruz	HNMOS	Meningitis	9 V
Spn 52/02	9m	M	LCR	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Meningitis	24
Spn 53/02	8m	M	LCR	Sta. Cruz	HNMOS	Meningitis	9 N
Spn 54/02	4a 4m	M	L. Pleural	CBBA	Esc. Tec. de Salud	Neumonía	14
Spn 55/02	1a 2m	F	Sangre	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Neumonía	9*
Spn 56/02	6m	M	LCR	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Meningitis	11*
Spn 57/02	1a 2m	M	LCR	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Meningitis	17*
Spn 58/02	3m	M	LCR	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Meningitis	12*
Spn 59/02	3m	F	LCR	CBBA	Esc. Tec. de Salud	Meningitis	7 F
Spn 60/02	6m	M	LCR	CBBA	H. Albina Patiño	Meningitis	23 B
Spn 61/02	4m	F	LCR	Sta. Cruz	HNMOS	Meningitis	14
Spn 62/02	1m	F	LCR	Sta. Cruz	HNMOS	Meningitis	12
Spn 63/03	5m	F	L. Pleural	CBBA	H. Albina Patiño	Neumonía	1
Spn 64/03	9m	F	Sangre	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Neumonía	18 C
Spn 65/03	2a	F	L. Pleural	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Neumonía	14
Spn 66/03	8m	M	LCR	CBBA	Esc. Tec de Salud	Meningitis	6 A

./.

Código	Edad del paciente	Sexo paciente	Muestra	Procedencia	Institución	Dx. Presuntivo	Serotipo
Spn 67/03	5m	F	LCR	CBBA	H. Albina Patiño	Meningitis	10 A
Spn 68/03	4m	F	LCR	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Meningitis	4
Spn 69/03	10m	M	LCR	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Meningitis	23 F
Spn 70/03	4a 11m	M	LCR	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Meningitis	1
Spn 71/03	1a	M	Sangre	CBBA	Esc. Tec de Salud	Neumonía	14
Spn 72/03	5a	F	Sangre	CBBA	Esc. Tec de Salud	Neumonía	1
Spn 73/03	4a	M	LCR	CBBA	Esc. Tec de Salud	Meningitis	NST
Spn 74/03	6m	F	LCR	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Meningitis	23*
Spn 75/03	1a 2m	M	LCR	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Meningitis	18 C
Spn 76/03	1a 1m	F	LCR	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Meningitis	14
Spn 77/03	1a 5m	F	LCR	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Meningitis	9*
Spn 78/03	3m	F	Sangre	CBAA	H. Albina Patiño	Meningitis	6*
Spn 79/03	3m	F	LCR	CBBA	H. Albina Patiño	Meningitis	6*
Spn 80/03	8m	F	Sangre	CBBA	Esc. Tec. De Salud	Neumonía	6*
Spn 81/03	6m	F	LCR	CBBA	Esc. Tec. de Salud	Meningitis	18*
Spn 82/04	8m	F	Sangre	CBBA	Esc. Tec. de Salud	Neumonía	6*
Spn 83/04	6m	F	LCR	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Meningitis	18
Spn 8404	3a	M	Sangre	CBBA	Esc. Tec de Salud	Meningitis	19*
Spn 8504	3a	M	LCR	CBBA	Esc. Tec de Salud	Meningitis	19*
Spn 8604	1a6m	M	LCR	CBBA	H. Albina Patiño	Meningitis	6*
Spn 8704	1 a	F	L. pleural	Sta. Cruz	HNMOS	Neumonía	5
Spn 8804	1a 8m	M	L. pleural	Sta. Cruz	HNMOS	Neumonía	5
Spn 89/04	5a	F	L. pleural	Sta. Cruz	HNMOS	Neumonía	23*
Spn 90/04	2a	F	LCR	Sta. Cruz	HNMOS	Meningitis	19 A
Spn 9104	1a2m	F	LCR	Sta. Cruz	HNMOS	Meningitis	19 A

///

Código	Edad del paciente	Sexo paciente	Muestra	Procedencia	Institución	Dx. Presuntivo	Serotipo
Spn 9204	11m	M	Sangre	Sta. Cruz	HNMOS	Neumonía	6 B
Spn 93/04	2a 2m	M	LCR	Sta. Cruz	HNMOS	Meningitis	33
Spn 94/04	1a 7m	F	LCR	Sta. Cruz	HNMOS	Meningitis	14
Spn 95/04	1a 5m	F	L. pleural	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Neumonía	6*
Spn 96/04	1a	M	Sangre	Sta. Cruz	HNMOS	Neumonía	14
Spn 97/04	1m	F	LCR	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Meningitis	14
Spn 98/05	1a4m	F	Sangre	CBBA	Esc. Tec. De Salud	Neumonía	5
Spn 99/05	1a8m	F	Sangre	Sta. Cruz	HNMOS	Neumonía	5
Spn 100/05	1a 5m	F	Sangre	Sta. Cruz	HNMOS	Neumonía	23*
Spn 101/05	4a	M	Sangre	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Neumonía	6*
Spn 102/05	1a 4m	F	LCR	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Meningitis	18*
Spn 103/05	4m	M	Sangre	Sta. Cruz	HNMOS	Meningitis	1
Spn 104/05	1a	M	Sangre	Sta. Cruz	HNMOS	Neumonía	6*
Spn 105/05	3a5m	M	LCR	CBBA	H. Albina Patiño	Meningitis	14
Spn 106/05	1a 6m	M	Sangre	Sta. Cruz	HNMOS	Neumonía	5
Spn 107/05	1a2m	M	L. pleural	Sta. Cruz	HNMOS	Neumonía	23*
Spn 108/05	7m	F	LCR	Sta. Cruz	Univ. Japonés	Meningitis	12*
Spn 109/05	2a	M	L. pleural	CBBA	Esc. Tec. de Salud	Neumonía	19*
Spn 110/05	4m	M	Sangre	Sta. Cruz	HNMOS	Neumonía	14
Spn 111/05	9m	M	Sangre	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Neumonía	5
Spn 112/05	1a5m	M	L. pleural	La Paz	H. Ovidio Aliaga	Neumonía	7*

////

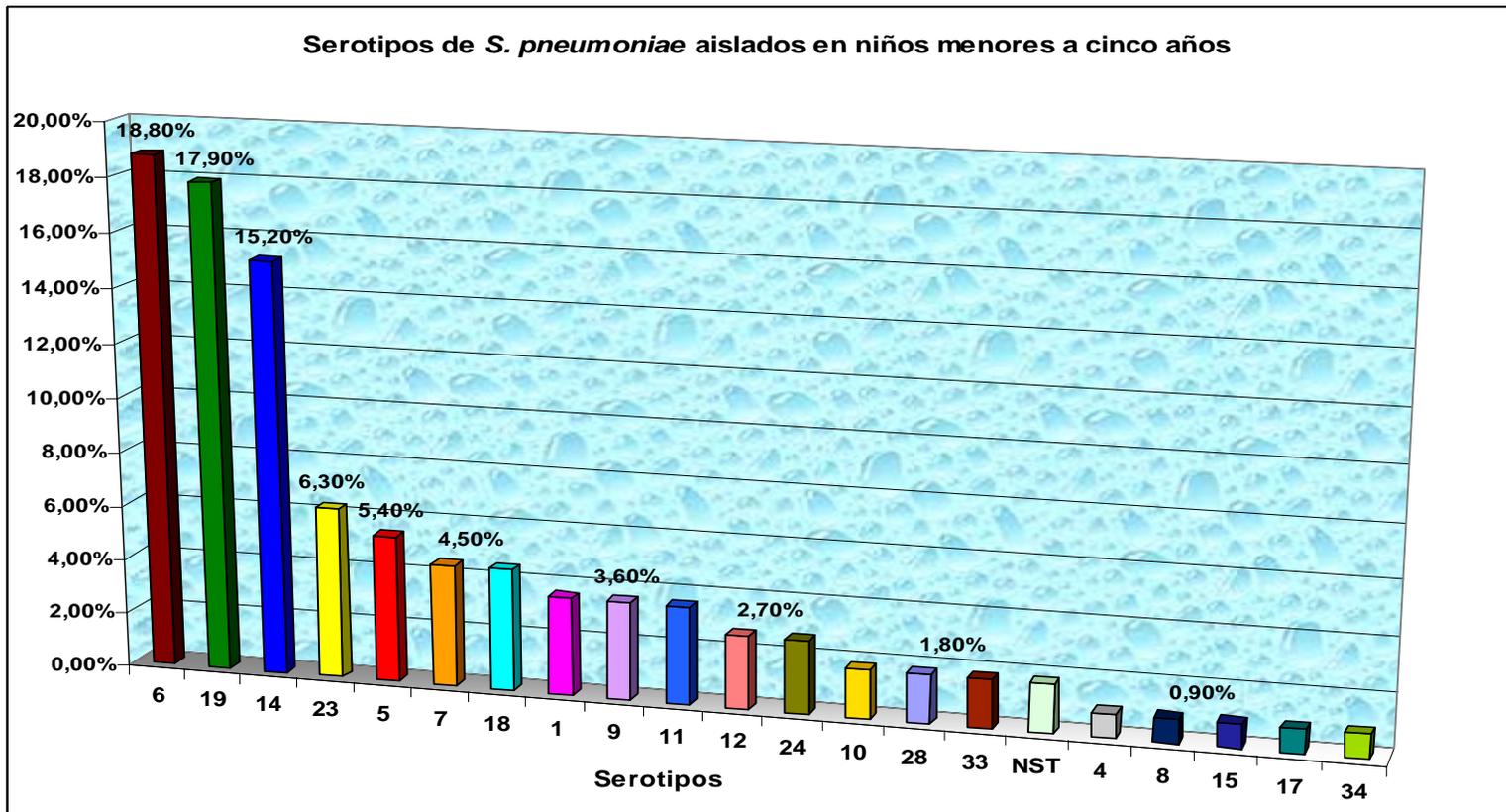
Fuente: Elaboración propia

* Cepas que no se ha determinado el subgrupo

De **129** cepas de *Streptococcus pneumoniae*, aisladas de muestras de Sangre, LCR y liquido pleural durante el periodo del 2.000 al 2.005, solo **112** cepas (**82,8%**) fueron recuperadas, serotipificadas y sub- tipificadas, resultando dos cepas (**1,8%**) como **No tipificables**.

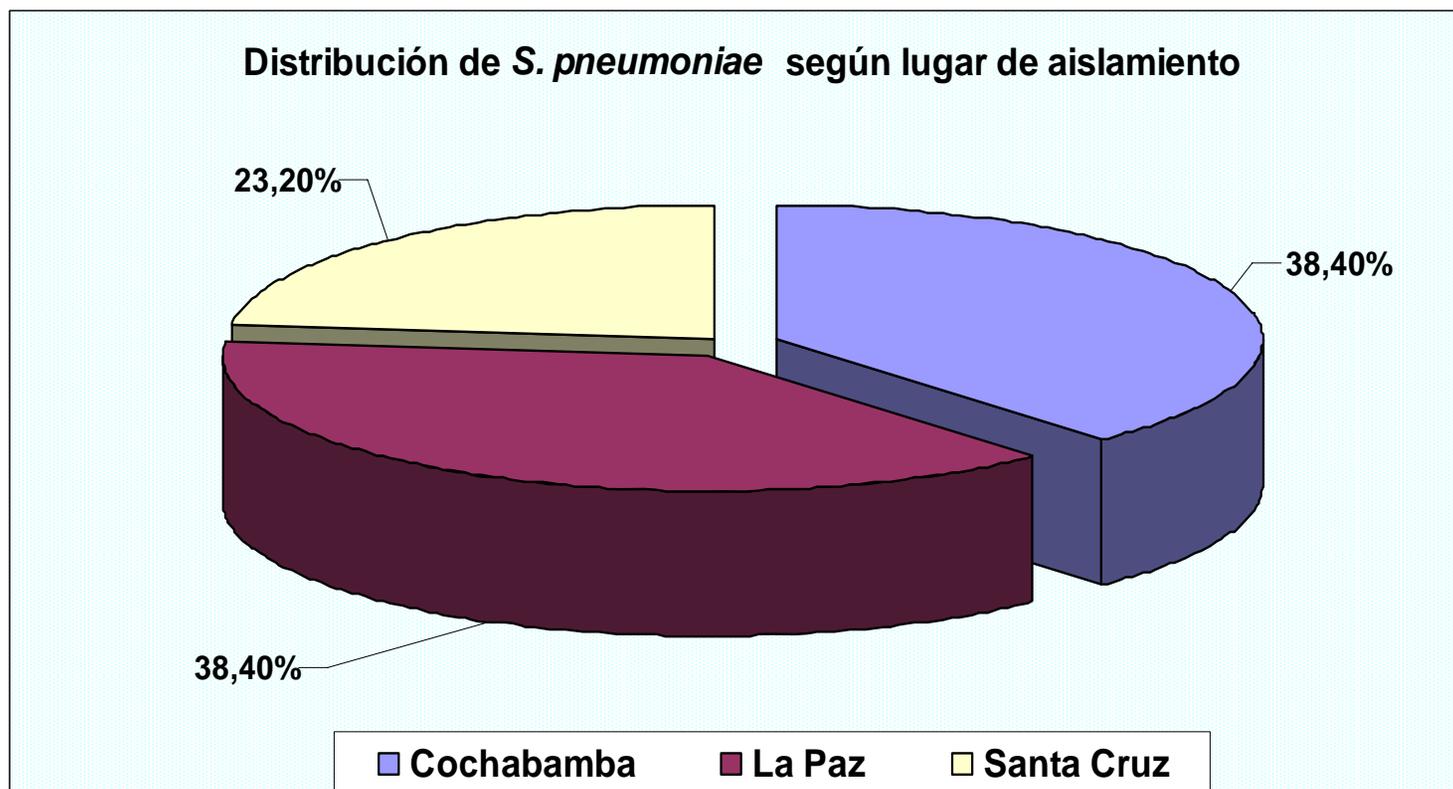
HNMOS: Hospital de Niños Manuel Ortiz Suárez

NST: Cepas No tipificables



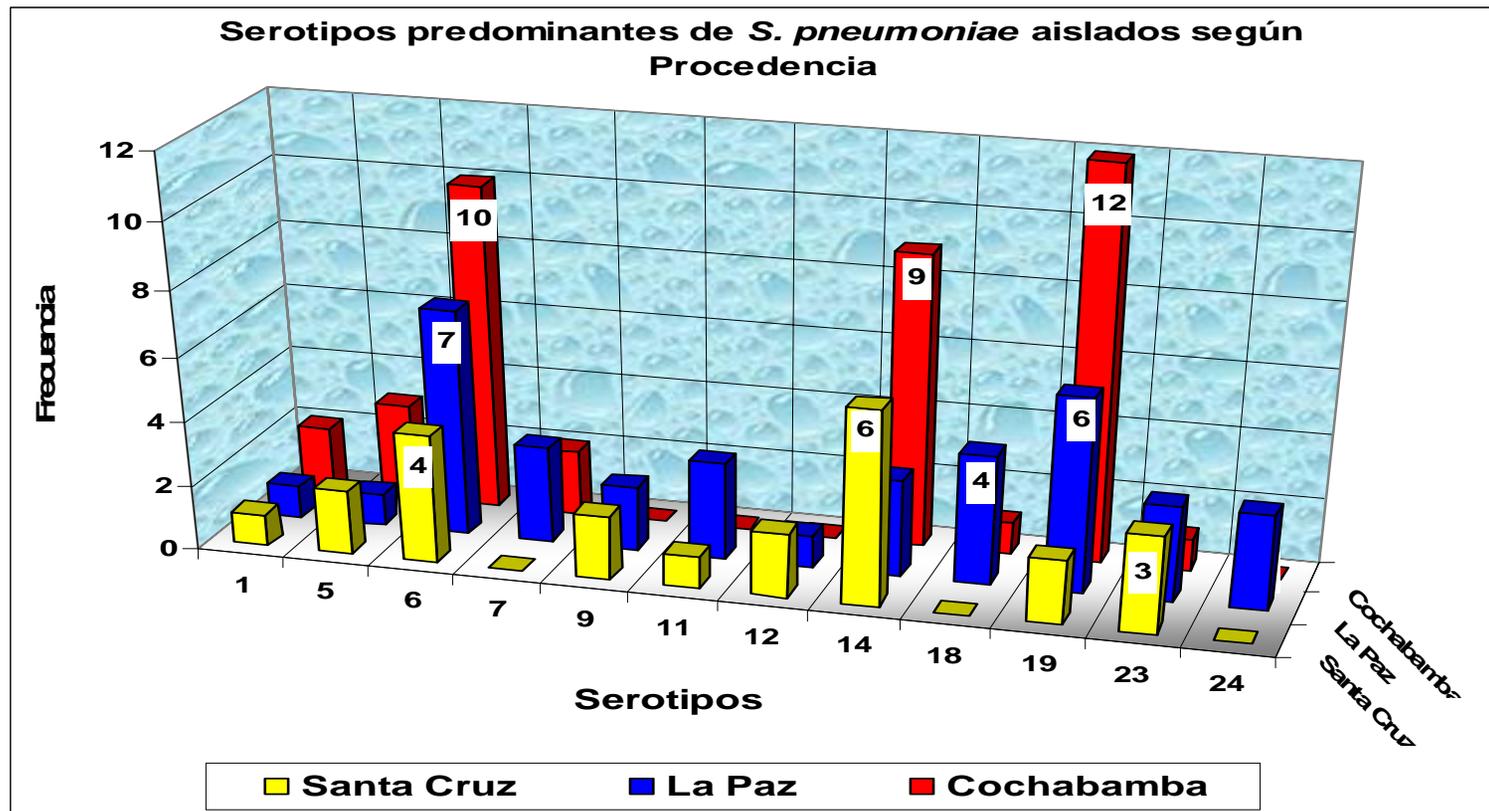
Grafica 1. Serotipos de *Streptococcus pneumoniae* aislados de muestras de Sangre, LCR y Líquido pleural, recolectadas por los laboratorios centinela de las ciudades de La Paz, Cochabamba y Santa Cruz, procesadas siguiendo el método de Quellung, durante las gestiones 2000 - 2005

La gráfica muestra los 20 serotipos encontrados, de los cuales 12 son los más frecuentes: serotipo 6 (18,8%), 19 (17,9%), serotipo 14 (15,20%), serotipo 23 (6,30%), serotipo 5 (5,40%), serotipo 7,18 (4,50%), serotipos 1, 9 ,11 (3,60%), serotipos 12 y 24 (2,70%).



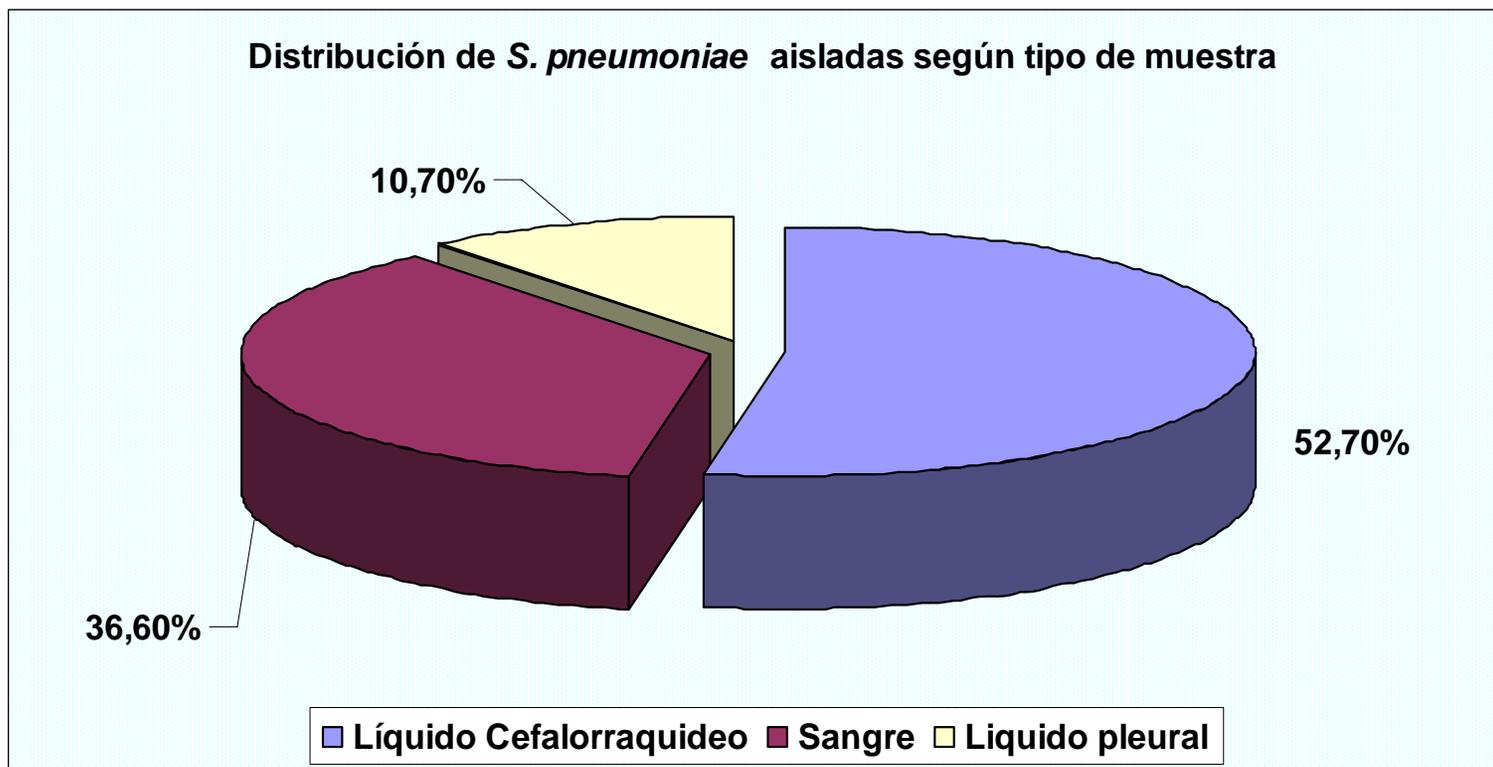
Gráfica 2. Distribución de cepas de *Streptococcus pneumoniae* aislados en las ciudades de La Paz, Cochabamba y Santa Cruz, procesadas en el INLASA, durante las gestiones 2.000 – 2.005

La gráfica muestra el aislamiento de *Streptococcus pneumoniae* en las ciudades de **La Paz y Cochabamba** fue el mismo con **38,40%**, mientras que en la ciudad de **Santa Cruz** fue menor con un **23,20%**.



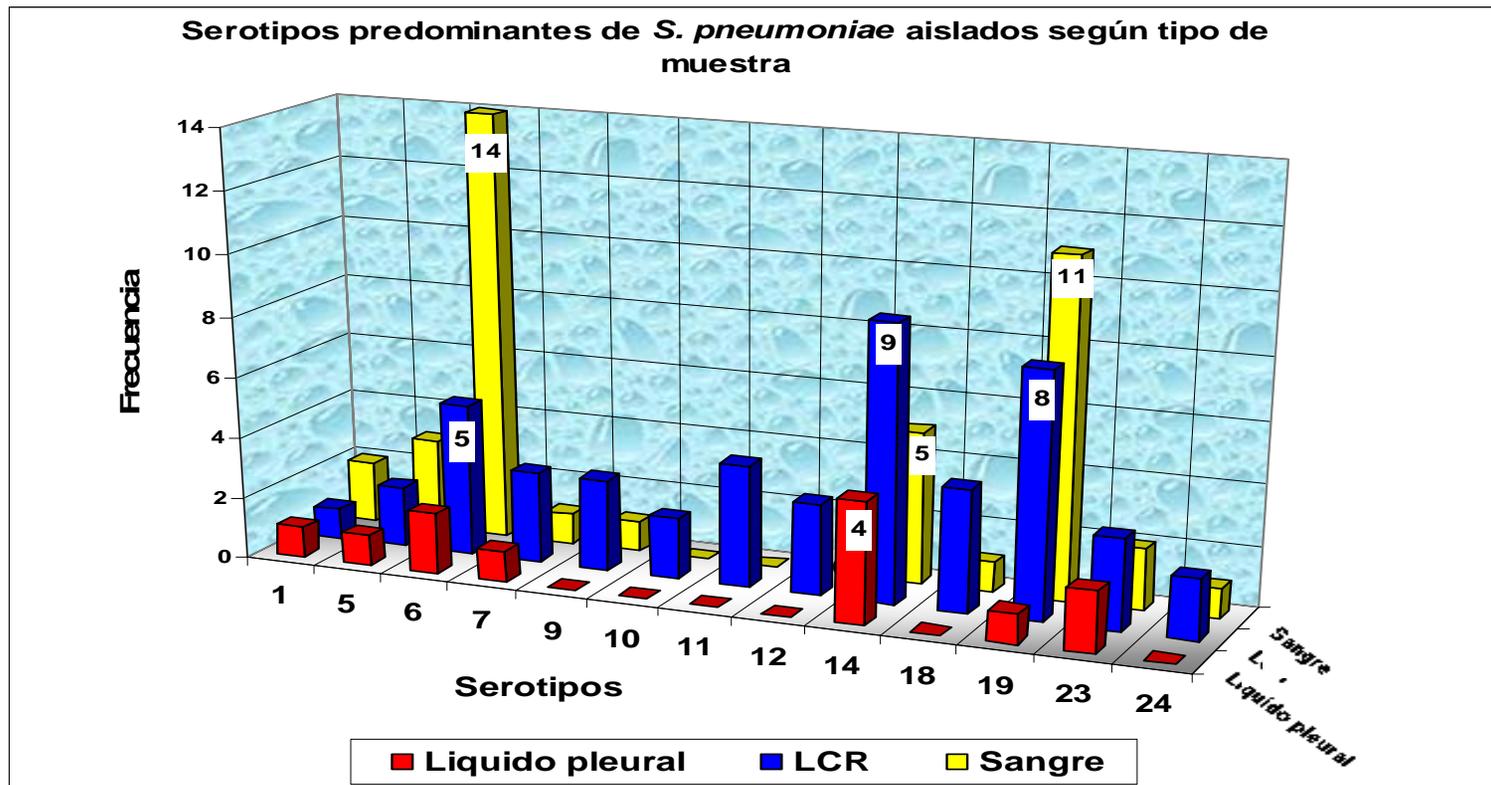
Grafica 3. Distribución de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* más frecuentes aislados en las ciudades de La Paz, Cochabamba y Santa Cruz siguiendo la técnica de Quellung, durante las gestiones 2.000 – 2.005

La gráfica muestra que los serotipos más frecuentes en la ciudad de Cochabamba son el 19, 6 y 14; en la ciudad de La Paz el 6 y 19 y 18, mientras que en Santa Cruz predominan el 14, 6 y 23



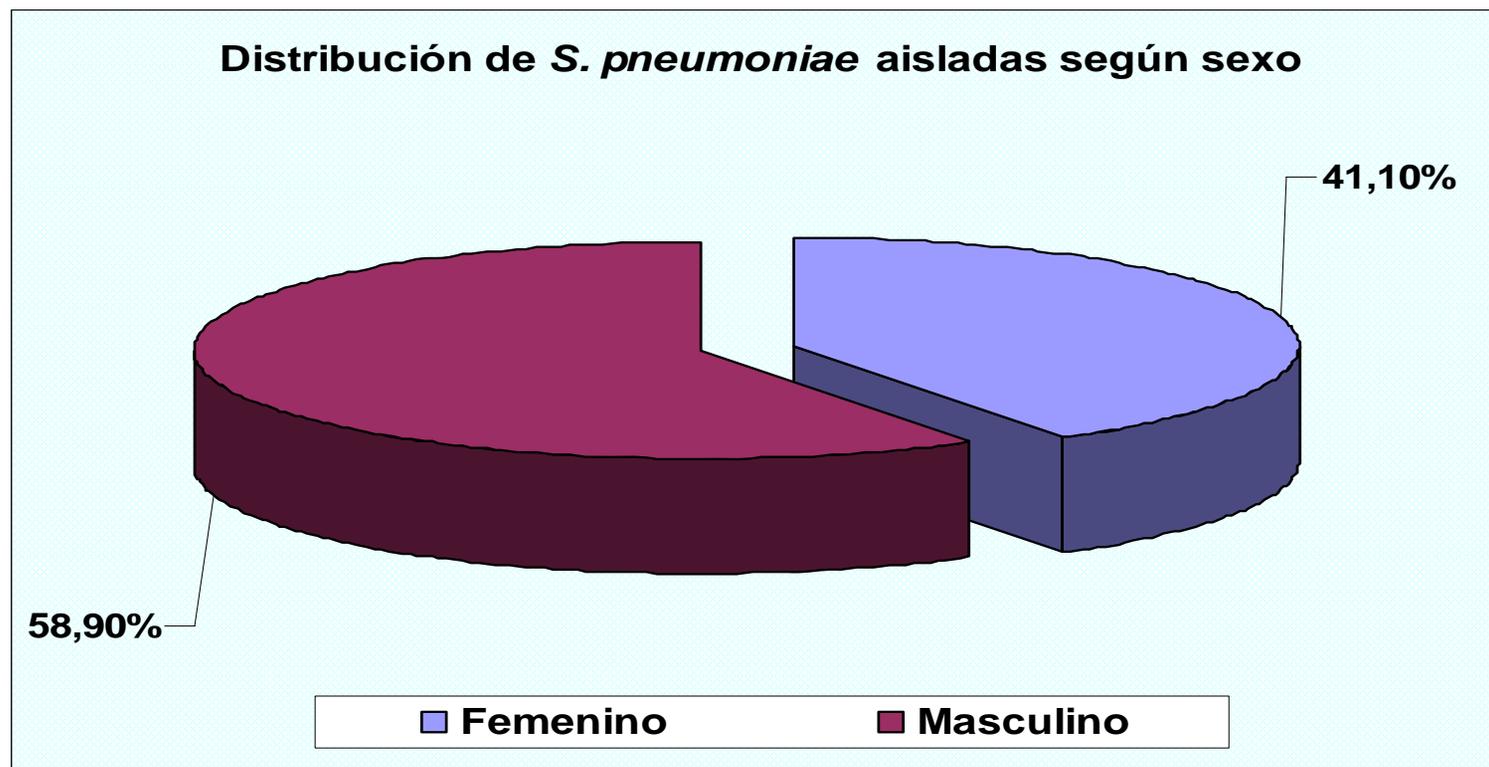
Grafica 4. Distribución de cepas de *Streptococcus pneumoniae* según el tipo de muestra, aisladas en las ciudades de la Paz, Cochabamba y Santa Cruz, procesadas en el INLASA, durante las gestiones 2.000 – 2.005

La gráfica muestra que el mayor porcentaje de cepas de *Streptococcus pneumoniae* fue aislado de **LCR** con **52,70%**, en muestras de **sangre 36,60%** y en **líquido pleural el 10,70%**



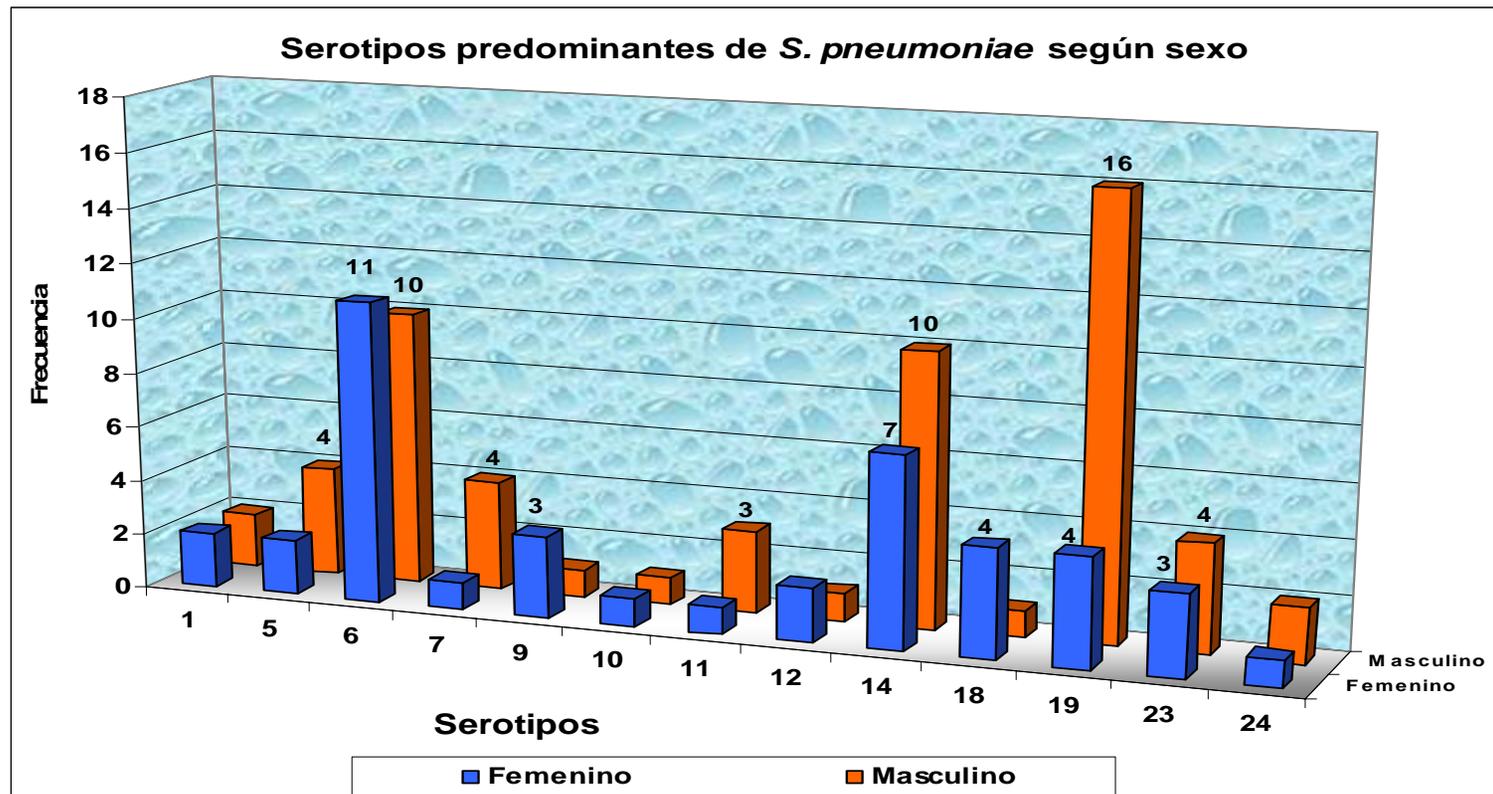
Grafica 5. Serotipos de *Streptococcus pneumoniae* más frecuentes aislados en muestras de Sangre, LCR y líquido pleural en la ciudades de La Paz, Cochabamba y Santa Cruz, procesadas en el INLASA siguiendo el método de Quellung, durante las gestiones de 2000 – 2005

La gráfica muestra que los serotipos más frecuentes en muestras de **sangre** son el **6, 19 y 14**; en **LCR** son el **14, 19 y 6**, en líquido pleural es el **14**.



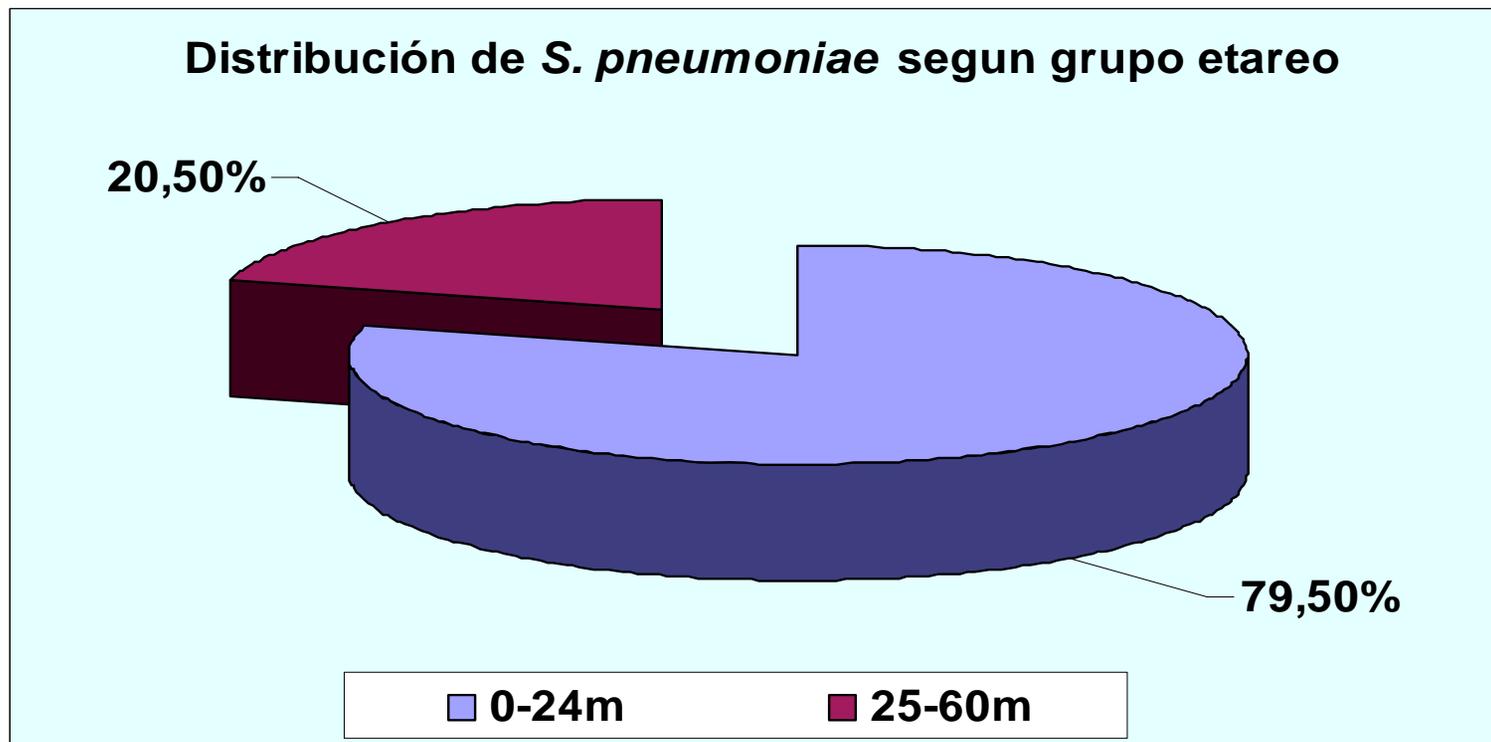
Grafica 6. Distribución de cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas según sexo, en los departamentos de La Paz, Cochabamba y Santa Cruz, procesadas en el INLASA, durante las gestiones 2.000 – 2.005

Esta gráfica muestra que *Streptococcus pneumoniae* se aisló más en niños de sexo **masculino (58,90%)** que en el sexo **femenino (41,10%)**.



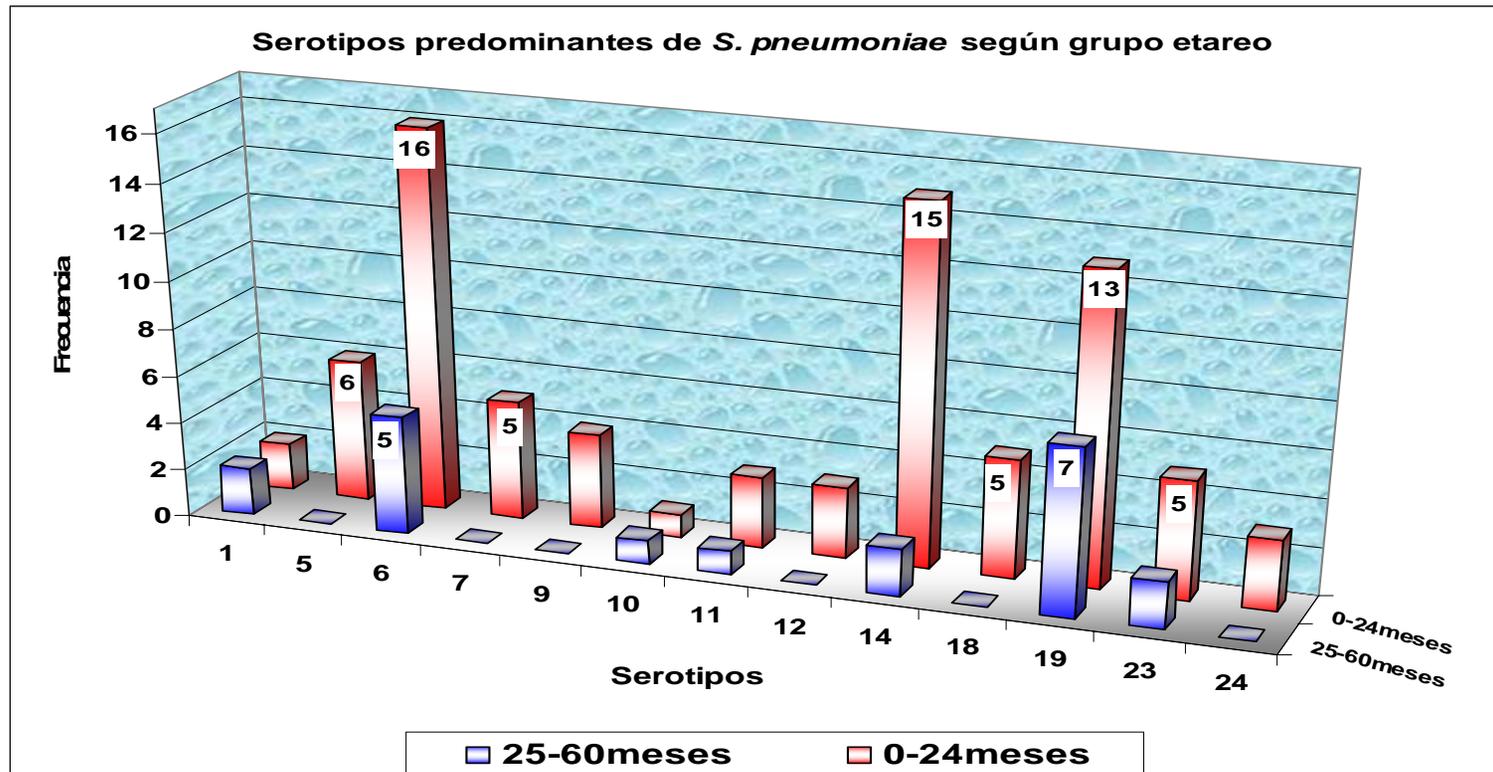
Grafica 7. Serotipos de *Streptococcus pneumoniae* más frecuentes según sexo, aislados en las ciudades de La Paz, Cochabamba y Santa Cruz, procesadas en el INLASA siguiendo el método de Quellung, durante las gestiones de 2.000 – 2.005

La gráfica muestra que los serotipos más frecuentes en el sexo **femenino** son: **6 y 14**; en el sexo **Masculino** son: **19, 14 y 6**



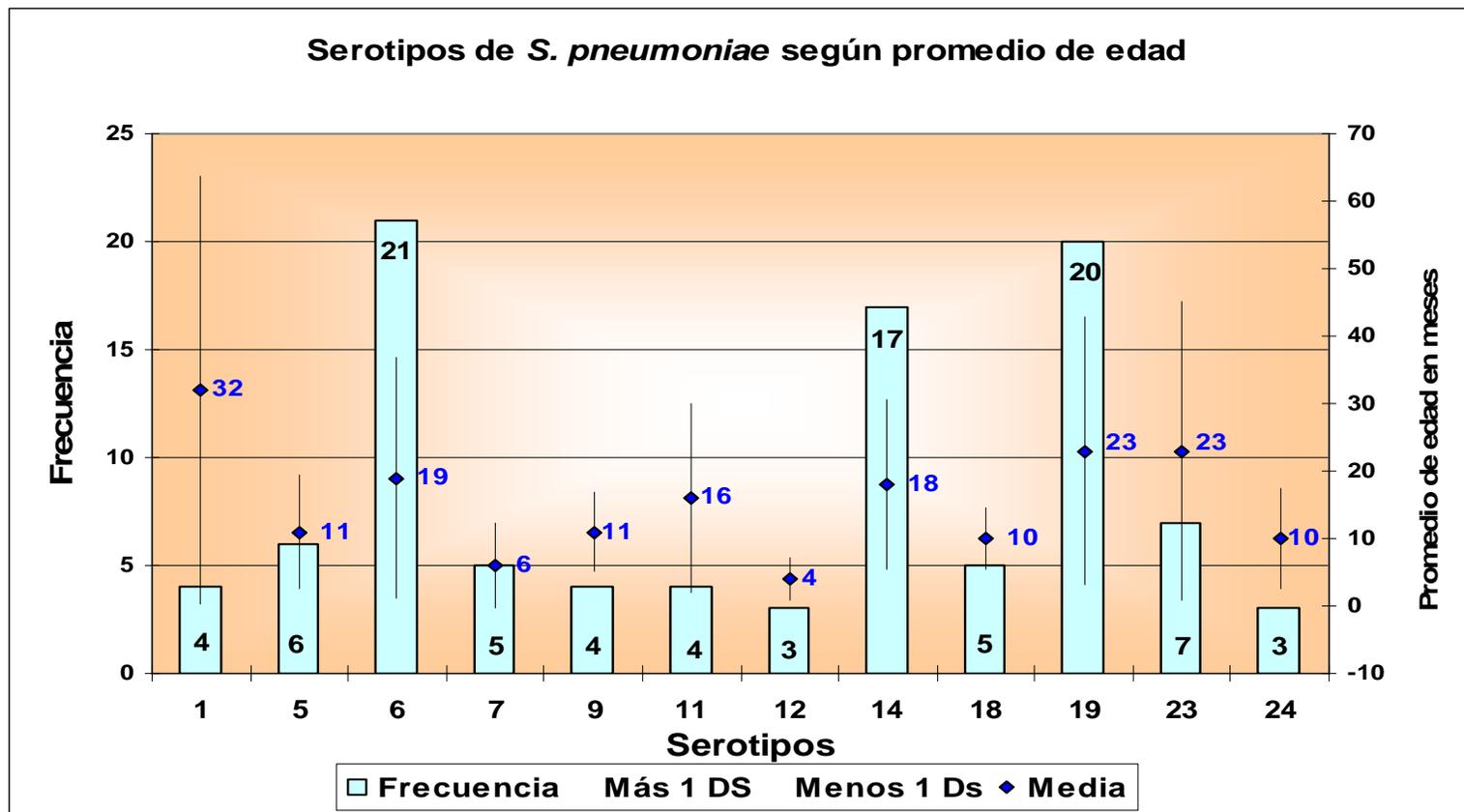
Gráfica 8. Distribución de cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas según grupo etáreo, en las ciudades de La Paz, Cochabamba y Santa Cruz, procesadas en el INLASA durante las gestiones 2.000 – 2.005

Esta gráfica nos muestra el predominio de aislamientos en **menores a los 2 años con 79,50%**.



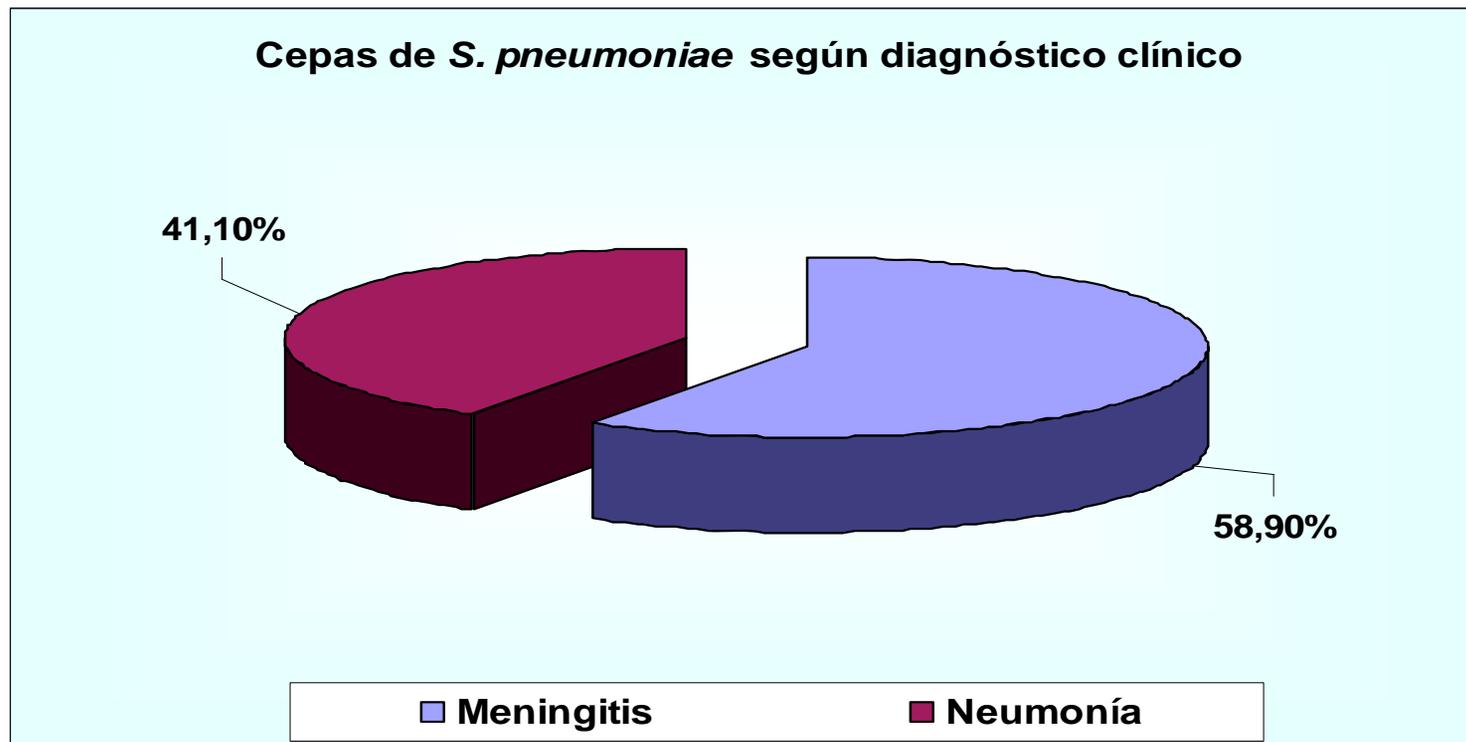
Gráfica 9. Serotipos de *Streptococcus pneumoniae* más frecuentes según grupo etáreo, aislados en las ciudades de La Paz, Cochabamba y Santa Cruz, procesadas en el INLASA siguiendo el método de Quellung, durante las gestiones de 2.000 – 2.005

La gráfica muestra el grupo etáreo más afectado comprendido entre 0 a 24 meses de edad, siendo los serotipos más frecuente el 6, 14, 19, 5 y 23.



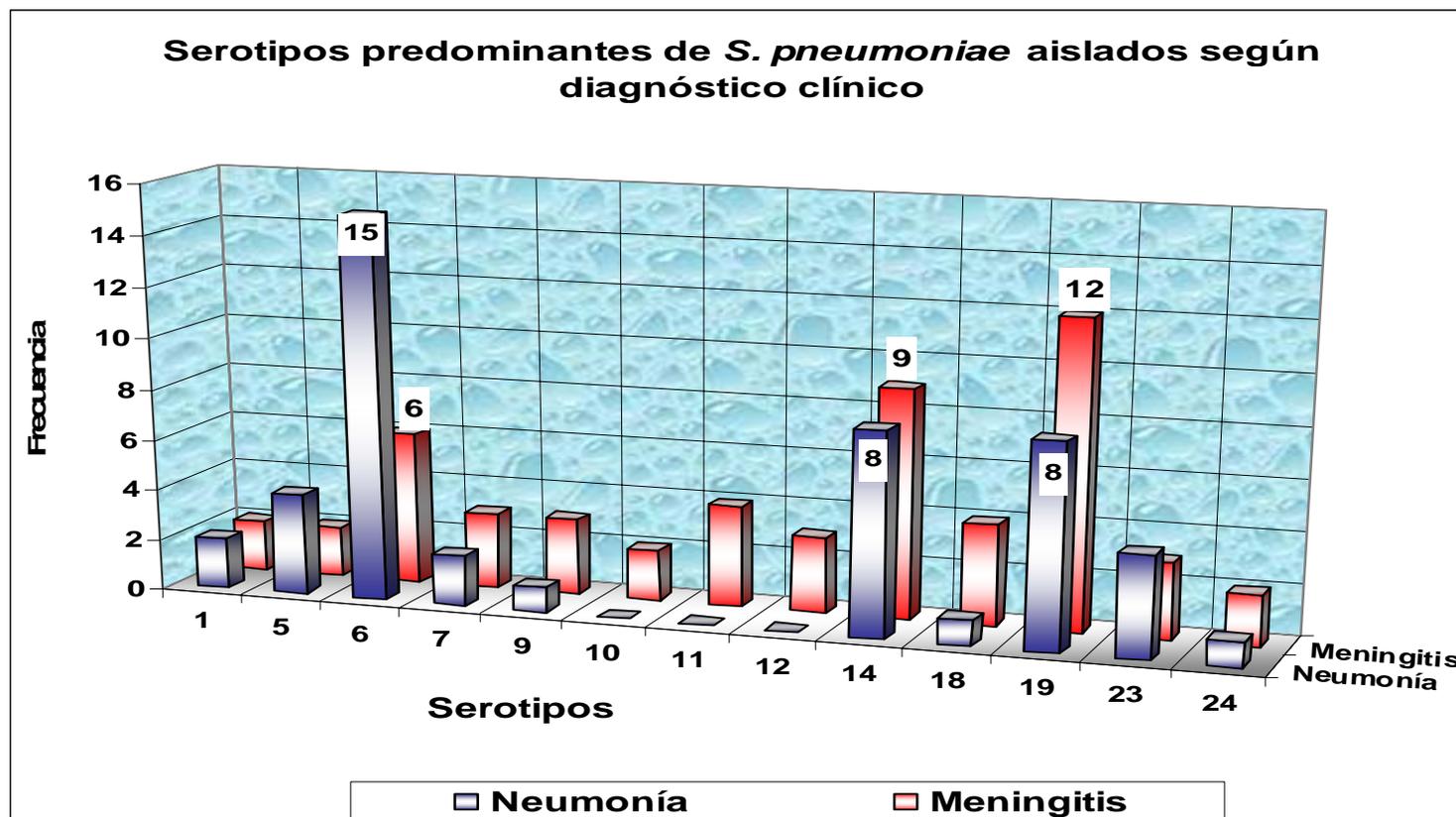
Gráfica 10. Distribución de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* más frecuentes según promedio de edad en meses, aislados en las ciudades de La Paz, Cochabamba y Santa Cruz, procesadas en el INLASA según la técnica de Quellung, durante la gestión 2.000 – 2.005

La gráfica muestra que los serotipos **6, 19 y 14** son los más frecuentes con **21, 20 y 17** aislamientos y un promedio de edad en meses de **19, 23 y 18** respectivamente



Gráfica 11. Distribución de cepas de *Streptococcus pneumoniae* según diagnóstico clínico, aisladas en las ciudades de La Paz, Cochabamba y Santa Cruz, procesadas en el INLASA durante las gestiones de 2.000 – 2.005

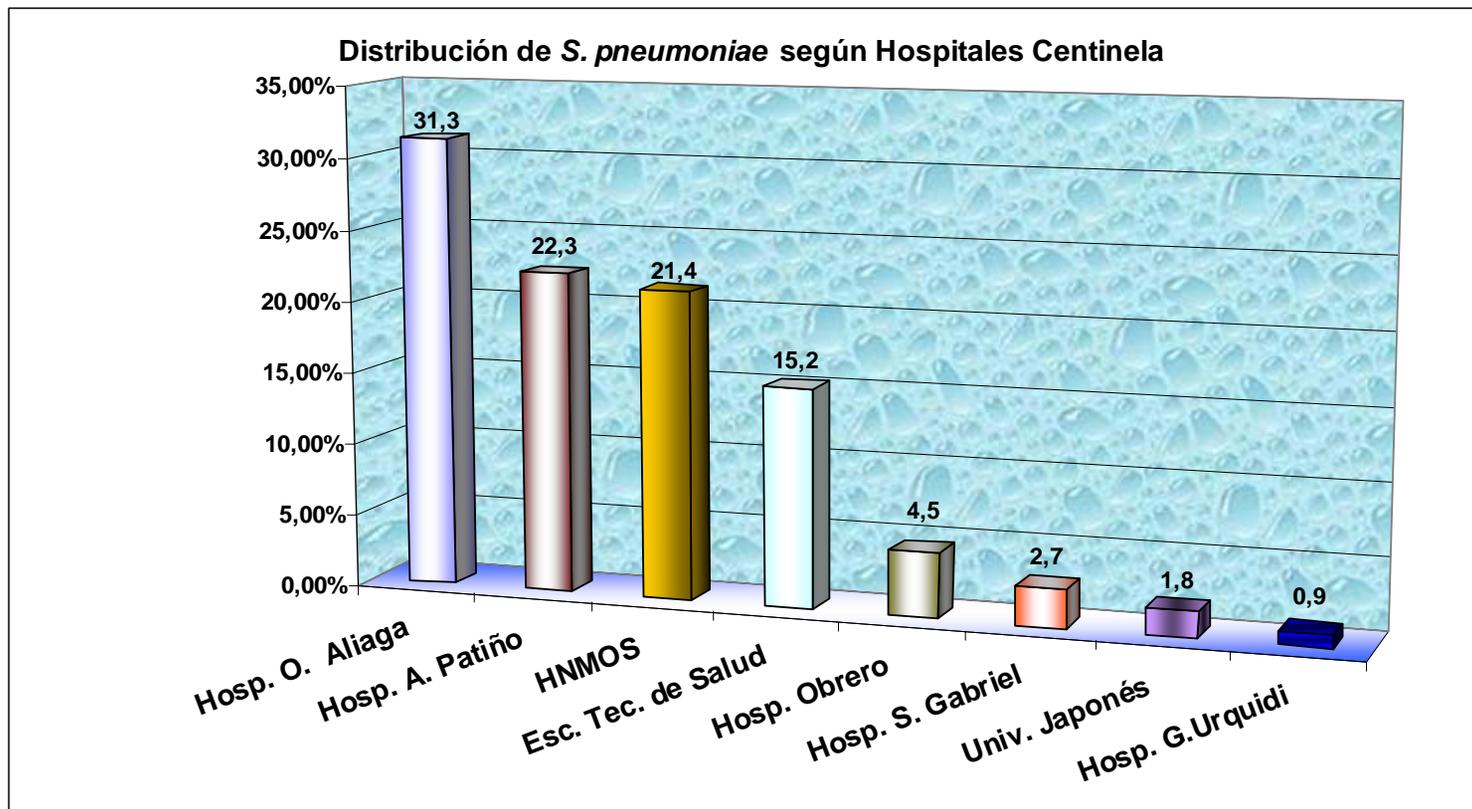
Esta gráfica muestra que el cuadro clínico predominante fue **Meningitis** con **58,90%** de los casos, mientras que **Neumonía** con **41,10%**.



Gráfica 12. Serotipos de *Streptococcus pneumoniae* más frecuentes aislados en cuadros de Meningitis y Neumonías, en las ciudades de La Paz, Cochabamba y Santa Cruz, procesadas en el INLASA siguiendo el método de Quellung, durante las gestiones de 2.000 – 2.005

Esta gráfica muestra que los serotipos más frecuentes en **neumonía** son el **6, 14, 19** mientras que en

meningitis los serotipos más frecuentes son el 19, 14 y 6.



Gráfica 13. Distribución de cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas según Hospitales Centinela, de las ciudades de La Paz, Cochabamba y Santa Cruz, procesadas en el INLASA, durante las gestiones 2.000 – 2.005

La gráfica muestra los Hospitales que más aislaron *S. pneumoniae* fueron: Ovidio Aliaga (31,3%),

Albina Patiño (22,3%), Hospital de niños Manuel Ortiz Suárez (21,4%) y Escuela Técnica de Salud (15,2%).

8. DISCUSION

El presente estudio constituye el primero de su género en nuestro país, motivo por el cual, los datos obtenidos son de gran aporte para la vigilancia epidemiológica, respecto a los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* circulantes en la población infantil menor a cinco años.

No es casual que este programa de vigilancia de neumonías y meningitis a nivel nacional tuviera su origen en el grupo SIREVA (Sistema regional de vacunas) de la OPS (Organización Panamericana de la Salud), pues este, forma parte de un proyecto muy amplio a nivel latinoamericano, cuyo interés primordial es el desarrollo de vacunas específicas que controlen las infecciones invasivas producidas por este microorganismo, que tienen un alto índice de mortalidad sobre todo en población pediátrica menor a cinco años.

El país forma parte de este programa de vigilancia a partir de 1.999, inicialmente paso por una etapa de organización que contemplo la identificación de los laboratorios centinela, capacitación de los profesionales responsables del aislamiento del microorganismo, así como de la adquisición de insumos y reactivos para el estudio.

A partir del año 2.000 se comienza con el aislamiento del microorganismo, obteniendo hasta el periodo del 2.005 un total de 112 cepas de *Streptococcus pneumoniae*, recolectadas de procesos invasivos como Neumonías y Meningitis de pacientes hospitalizados menores a los cinco años. Las cepas confirmadas bacteriológicamente, fueron serotipificadas siguiendo el método de Reacción de Quellung, técnica estandarizada tanto en Europa como a nivel latinoamericano.

Se encontraron 20 serotipos a lo largo de estos cinco años de estudio cuyo orden de frecuencia es el siguiente: **6, 19, 14, 23, 5, 7, 18, 1, 9, 11, 12, 24, 10, 28, 33, 4, 8, 15, 17 y 34**; de los cuales **12** fueron los mas frecuentes, observándose que los serotipos **6, 19 y 14** ocupan los tres primeros lugares con **18,80%, 17,90% y 15,20%** respectivamente. (Grafica 1)

Estos mismos serotipos fueron encontrados en seis países latinoamericanos: Argentina, Brasil, Colombia, México y Uruguay, quienes a lo largo de siete años (1993-1997) realizaron la vigilancia de infecciones invasivas causados por *Streptococcus pneumoniae*; encontrando **12** serotipos prevalentes: **14,1, 5, 6A/6B, 23F, 19F, 19A, 9V, 7F, 3, 18C, 4.**⁽⁴⁶⁾

De igual manera en distintos países de Europa, EE.UU, Canadá, Oceanía y África fueron encontrados los mismos serotipos, con ligeras variaciones en cuanto a la frecuencia, siendo los más prevalentes los serotipos: **23F, 6A/6B, 14, 3, 9, 11.**⁽⁷⁶⁾

De acuerdo con los datos recogidos en otro estudio realizado en 16 países de diferentes continentes, los 10 serotipos asociados comúnmente con enfermedad invasora (en orden decreciente) fueron el **14, 6, 9, 19, 18, 9, 23, 7, 4, 1 y 15** en países desarrollados y el **14, 6, 1, 5, 9, 9, 23, 18, 15 y 7** en los países en vías de desarrollo.⁽⁸⁰⁾

El porcentaje de aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, por área geográfica en nuestro estudio fue igual en las ciudades de **Cochabamba** y **La Paz** con un **38,40%** (43 aislamientos), mientras que en la ciudad de **Santa Cruz** fue del **23,20%** (26 aislamientos). (Gráfica 2)

La distribución de serotipos en estas mismas áreas mostró una gran variabilidad de serotipos, los que predominaron en **Cochabamba** fueron: **1, 5, 6, 7, 14, 18, 19, y 23**, en **La Paz**: **1, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 14, 18, 19, 23, y 24**, en **Santa Cruz** : **1, 5, 6, 9, 11, 12, 14, 18, 19, 23, 24**, de los cuales los serotipos más predominantes en las tres áreas geográficas fueron: **6, 19 y 14**. (Gráfica 3).

Todos los estudios realizados, tanto a nivel latinoamericano y Europeo presentan ciertas similitudes y diferencias, así en Argentina, Brasil, Chile, Uruguay y Colombia tienen de alguna manera una incidencia de serotipos similar, donde predominan los serotipos **14, 1 y 5**, en cambio México, es más parecido a lo observado en EE. UU, Francia y España donde los serotipos más frecuentes son el **23F, 6A/6B, 14 y 19**. En nuestro país con el universo obtenido (112 cepas) y los serotipos más frecuentemente encontrados: **6, 19 y 14** podríamos decir que tenemos mayor similitud con México, EE. UU y Europa.

Sin embargo es indiscutible que el serotipo **14** es el más frecuente en todos los estudios realizados, pues siempre ocupa uno de los tres primeros lugares, por esta razón es considerado como el serotipo pediátrico por excelencia. ^(12, 42)

Estudios realizados reportan que este serotipo proviene del clon Francés 9V, que habría sido importado a través del turismo internacional a muchos países tanto latinoamericanos como europeos, a partir de la década de los 80, confiriendo además resistencia a antibióticos como Penicilina y Cotrimoxazol. ⁽⁴³⁾ El serotipo 14, juntamente con el 23F son considerados entre los más virulentos, causantes de enfermedades severas con elevados índices de mortalidad sobre todo infantil.

De este manera confirmamos lo que indica la literatura que serotipos de *Streptococcus pneumoniae* no presentan una distribución homogénea y universal, sino por el contrario varían de país a país, de continente a continente, incluso se ve variaciones en la prevalencia de los distintos serotipos entre distintas regiones de un mismo país, además que cuando se los monitorea por largo plazo se observa variaciones con el tiempo, es decir serotipos que en un tiempo determinado son frecuentes, en otro tiempo desaparecen y se hacen frecuentes otros serotipos.⁽⁷⁷⁾

Por esta razón, es muy importante determinar los serotipos en cada área geográfica de manera independiente, cuya información orientara sobre la cobertura que tendrían las diferentes vacunas que se están aplicando actualmente (23-valente, 7-valente).

El porcentaje de aislamiento de este microorganismo por tipo de muestra, nos revela que fue mayor en LCR **52,70%** (59 aislamientos) seguido de un **36,60%** (41 aislamientos) en muestras de sangre y **10,7%** (12 aislamientos) de líquido pleural. (Gráfica 4). En cuanto a la distribución de serotipos según esta variable, encontramos que los más frecuentes en **LCR** son: **14, 19 y 6**; en **sangre** fueron el **6, 19 y 14**, y en líquido pleural el serotipo **14** (Gráfica 5); acá también observamos el predominio del serotipo 14 en los tres tipos de muestra con 50% (9 aislamientos) en LCR, 28% (5 aislamientos) en sangre y 22% (4 aislamientos) en líquido pleural. (Gráfica 4)

El estudio de los seis países latinoamericanos, reveló el aislamiento del microorganismo en mayor porcentaje de hemocultivos (54,3%), derrames pleurales (22,3%), LCR (20,6%), con una distribución de serotipos equiparable en los tres tipos de muestra. Lo que llamó la atención en estos países fue que los serotipos 1 y 5 que ocupan el segundo y tercer lugar de frecuencia fueron asociados a derrames pleurales. ^(46,76).

En nuestro país estos mismos serotipos (1 y 5) ocuparon el cuarto y séptimo lugar, aislados en un solo caso (cada serotipo) en líquido pleural. La baja frecuencia de aislamiento de estos dos serotipos en este tipo de muestra podría deberse a que en casos sospechosos de neumonía la toma de muestra de preferencia fue la de sangre y no así de derrames pleurales por ser más traumáticos para el paciente. (de 112 aislamientos solo en 12 casos se tomaron muestras de líquido pleural) Se sabe también por numerosos estudios realizados que el porcentaje de recuperación del microorganismo a partir de un hemocultivo sigue siendo bajo, oscila entre un 10 a 15 % de los casos ⁽⁴⁶⁾, de manera que para aumentar la sensibilidad de aislamiento sería conveniente tomar los dos tipos de muestras, (sangre y líquido pleural) de esta manera podríamos descartar o confirmar si hay asociación significativa con estos dos serotipos y el tipo de muestra.

De todas maneras por razones tanto asistenciales como epidemiológicas, se ha recomendado buscar alternativas de diagnóstico rápido que complementen las técnicas microbiológicas actuales o incrementen su sensibilidad como ser: la investigación de antígenos polisacáridos en derrames pleurales o en otros líquidos orgánicos, la determinación de la presencia de inmunocomplejos, determinación de anticuerpos antineumolisina por inmunoensayo, o la reacción en cadena de la polimerasa en diferentes muestras.

La gráfica 6 nos muestra que se aisló al microorganismo más en niños de sexo masculino (58,9%) que en el sexo femenino (41,1%). La distribución de serotipos fue muy variada, con un claro predominio de los serotipos **19,14 y 6** en el sexo **masculino** y en el sexo **femenino** el **6 y 14**. (Gráfica 7)

Respecto a la edad de **112** aislamientos, la **media** fue de **17,5 meses**, con una **desviación estándar** de **16,3** y una **mediana de 12,5**, con una **mínima** de **0,1** meses y una **máxima** de **60** meses.

El **79,50%** corresponde al grupo etáreo más afectado comprendido entre **0-24** meses de edad (menores de dos años) IC_{95%} de 70,80 a 86,50%; y **20,5%** a menores entre **25-60** meses de edad IC_{95%} de 13,50 a 29,20%; (Gráfica 8) .

La distribución de serotipos en menores de dos años (**0-24 meses**), fue muy variada, siendo cuatro los serotipos más frecuentemente aislados: serotipo **6**, serotipo **14**, serotipo **19**, serotipo **5** y serotipo **23**. En el grupo de **25-60** meses de edad (mayores de dos años) los serotipos más frecuentes fueron el **6 y 19**. (Gráfica 9). Se observó también que el promedio de edad de los serotipos más frecuentes en estos dos grupos etáreos: **6, 19, 14** es de 19, 23 y 18 meses respectivamente.(Gráfica 10)

Resultados similares se encontraron en la Argentina donde los niños menores a dos años son los más afectados con 69%, la media fue de 19,5 meses, con DE de 18,2 y una mediana de 12. ⁽⁷⁸⁾; El grupo SIREVA reportó (63,8%), para el mismo grupo etáreo, siendo los serotipos 14 y 6A/6B los más prevalentes para menores de dos años, mientras que los serotipos 1y 5 fueron más frecuentes en niños mayores a los dos años.⁽⁴⁶⁾

Estos resultados, plantean la necesidad de dedicar especial atención a la protección de este grupo de edad, ya que son los que concentran las tasas mayores de letalidad por infecciones invasivas, por lo cual se debe recurrir por ejemplo a la inmunización materna en el último trimestre de gestación, a la vacunación del recién nacido, o a la protección pasiva con inmunoglobulinas. La vacuna polisacárida antineumocócica 23-valente, en uso desde 1983,⁽⁴⁶⁾ no genera respuesta inmunológica en niños menores de dos años, lo que destaca la importancia del conocimiento epidemiológico de la enfermedad para la evaluación de las nuevas vacunas conjugadas en desarrollo que si son activas para este grupo etáreo (7valente y 11valente).

La forma clínica más frecuente fue **meningitis con 58,9%** (66 casos), mientras que las **neumonías con 41,10%** (46 casos),(Gráfica11). En los cinco países latinoamericanos la localización pulmonar (neumonía) representó una mayor porcentaje de los casos (51-67%).⁽⁴⁶⁾ En la Argentina se reportó 60,5% de neumonías asociadas a derrames pleurales y 26,6% de meningitis.⁽⁷⁸⁾ En Uruguay 67% para neumonía y 21% para meningitis.

Como sabemos en países en desarrollo las infecciones respiratorias agudas (IRAS), en especial neumonía, son causa reconocida de morbi-mortalidad en niños menores de 5 años. En nuestro caso el porcentaje relativamente inferior de neumonías observado, podría deberse a que la neumonía neumocócica es una entidad clínica infradiagnosticada por no contar con técnicas bacteriológicas con mayor sensibilidad que el hemocultivo, con el cual apenas se logra una sensibilidad de 10 a 15%, y aunque la sensibilidad aumenta cuando se dispone de muestras de derrames pleurales, no siempre son obtenidas por punción pulmonar. (Lo corroboran Garrido et, al 1995)⁽⁷⁹⁾; en algunos casos el tratamiento con antibióticos antes de la extracción de sangre para su cultivo interfiere con la positividad de los resultados, por otro lado esta patología no es de declaración obligatoria como las meningitis, existiendo un importante subregistro, por lo que se requiere de estudios prospectivos controlados con una mayor participación de hospitales centinela, para estimar el número real de neumonías, la magnitud del problema y el potencial impacto que proporcionarían las vacunas, de manera que nos permite tener una visión exacta de la realidad.

En cuanto a los serotipos en ambos cuadros clínicos hubo gran variabilidad, en **meningitis** los más frecuentes fueron el: **19(18%), 14(14%) y 6(9%)**, en **neumonía** el **6(33%),14(17%) y 19(17%)**, estos mismos serotipos se encontraron en otros estudios. (Gráfica 12).

SIREVA informo que el serotipo predominante en **neumonía** fue el **14** correspondiendo un porcentaje global de 32,6%, con una máxima en Uruguay(43,1%) y una mínima en México(10,9%); en este ultimo país el serotipo predominante fue el **23F(17,7%)** ubicado en el quinto lugar en el conjunto de los países, además del serotipo **6A/6B**, segundo en frecuencia.⁽⁴⁷⁾

En España un estudio multicentrico realizado en cinco comunidades a lo largo de un año, encontró que el serotipo más frecuente en casos de meningitis era el **19(28,6%)**, siendo este mismo serotipo el más frecuente en nuestro país (18%).

Los laboratorios y hospitales que participaron de este estudio aportaron con los siguientes porcentajes en el aislamiento de *Streptococcus pneumoniae* de un total de 112 cepas aisladas en estos cinco años de estudio (2000-2005). (Gráfica13)

En la **ciudad de La Paz**: Hospital Ovidio Aliaga aportó con 31,3% de las cepas; Hospital Obrero con 4,5%, Hospital San Gabriel con 2,7%.

En la **ciudad de Cochabamba**: Hospital Albina Patiño 22,3%, Hospital Germán Urquidí (0,9%). Escuela técnica de Salud (15,2%).

En la **ciudad de Santa Cruz**: Hospital de niños Manuel Ortiz Suárez (21,4%), Hospital Universitario Japonés (1,8%).

El número de aislamientos por los diferentes laboratorios fue un poco mayor (129) en estos cinco años de vigilancia, logrando ser serotificados solo 112 cepas, no se recuperaron 17 cepas debido a que al inicio de la vigilancia surgieron problemas tales como la conservación, envío, transporte y recuperación, que correspondieron básicamente al primer año de vigilancia (2000). Aun así aparentemente el número de aislamientos es bajo en relación a otros países como Argentina que en 7 años de vigilancia (1993-2000) logró el aislamiento de 1.288 cepas de *S. pneumoniae*. Sin embargo debemos considerar que en este país el estudio fue de ámbito nacional donde participaron en principio 15 hospitales centinela, posteriormente se incorporaron 19 hospitales más a partir de 1997; lo que le otorga a este país una gran representatividad a nivel nacional, mientras que nuestro estudio se limitó a tres departamentos del eje troncal con la participación de 8 hospitales que en los dos últimos años se redujo a seis hospitales, pues dejaron de participar del estudio el hospital Obrero y hospital San Gabriel.

Para tener una mayor representatividad nos cabe únicamente incrementar la participación de hospitales centinela en los nueve departamentos del país, de manera que no solo sea en el eje troncal, sino de ámbito nacional para obtener de esta manera la prevalencia real de serotipos de *S. pneumoniae*.

Estos cinco años de vigilancia sin embargo, confieren a nuestro estudio un especial valor, no solamente por ser el primero que determina los serotipos más frecuentes de *Streptococcus pneumoniae* que circulan en estos tres departamentos, si no porque se ha logrado consolidar una red de vigilancia que permite tener una visión clínico-epidemiológica y microbiológica de las neumonías y meningitis, que afectan principalmente a la población infantil menor a los cinco años, herramienta importante para el clínico y autoridades nacionales, respecto a la conducta a seguir en cuanto a tratamiento y prevención de enfermedades ocasionadas por este microorganismo a través de vacunas que contengan los mismos serotipos circulante en nuestro medio.

9. CONCLUSIONES

- En cinco años de estudio (2000-2005), se aislaron 129 cepas de *Streptococcus pneumoniae*, aislados de procesos invasivos (neumonía y meningitis) en niños menores de 5 años internados en hospitales centinela pediátricos; de las cuales solo 112 cepas (87,5%) fueron recuperadas y determinado los serotipos siguiendo la técnica de Neufeld Quellung, quedando dos cepas (1,8%) como NO Tipificables.
- Se encontraron 20 serotipos a lo largo de estos años cuyo orden de frecuencia es el siguiente: **6(18,8%), 19(17,9%), 14(15,2%), 23(6,3%), 5(5,4%), 7 y 18 (4,5%), 1, 9 y 11(3,6%), 12 y 24(2,7%), 10, 28 y 33(1,8%), 4, 8, 15, 17 y 34(0,9%)**; de los cuales **12** fueron los mas frecuentes, observándose que los serotipos **6, 19, y 14** ocupan los tres primeros lugares.
- El porcentaje de aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, por **área geográfica** fue igual en las ciudades de **Cochabamba** y **La Paz** con un **38,40%** (43 aislamientos), mientras que en la ciudad de **Santa Cruz** fue del **23,20%** (26 aislamientos).
- La distribución de **serotipos** en estas mismas áreas mostró una gran variabilidad de serotipos, los que predominaron en **Cochabamba** fueron: **1, 5, 6, 7, 14, 18, 19, y 23**, en **La Paz**: **1, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 14, 18, 19, 23, y 24**, en **Santa Cruz** : **1, 5, 6, 9, 11, 12, 14, 18, 19, 23, 24**, de los cuales los serotipos más predominantes en las tres áreas geográficas fueron: **6, 19 y 14**.
- El porcentaje de aislamiento de este microorganismo por **tipo de muestra**, nos revela que **fue mayor en LCR 52,70% (59 aislamientos)** seguido de un **36,60% (41 aislamientos)** en **muestras de sangre** y **10,7% (12 aislamientos)** de **líquido pleural**.
- La distribución de **serotipos** según el tipo de muestra fue muy variada, los más frecuentes en **LCR** son: **14, 19 y 6**; en **sangre** fueron el **6, 19 y 14**, y en líquido pleural el serotipo **14**, acá también observamos el predominio del serotipo **14** en los tres tipos de muestra con **50% (9 aislamientos)** en **LCR**, **28% (5 aislamientos)** en **sangre** y **22% (4 aislamientos)** en **liquido pleural**.
- Respecto a la **edad**, de **112** aislamientos, la **media** fue de **17,5 meses**, con una **desviación estándar** de **16,3**, una **mediana** de **12,5** con una **mínima** de **0,1** meses y una **máxima** de **60** meses
- El **79,50%** corresponde al grupo etáreo más afectado comprendido entre **0-24** meses de edad con un IC_{95%} de 70,80 a 86,50%; el **20,5%** correspondió al

grupo comprendido entre **25-60** meses de edad con un IC_{95%} de 13,50 a 29,20%.

- La distribución de serotipos en menores de dos años (**0-24 meses de edad**), fue muy variada, siendo **cinco** los serotipos más frecuentemente aislados: serotipo **6**, serotipo **14**, serotipo **19**, serotipo **5** y **23**. En el grupo de **25-60 meses de edad** (mayores de dos años) los serotipos más frecuentes fueron el **6** y **19**. El promedio de edad de los serotipos más frecuentes en los dos grupos etáreos (**6,19,14**) fue de **19, 23 y 18** meses de edad respectivamente.
- El **cuadro clínico** de mayor predominio por el que fueron internados los niños menores de cinco años en los diferentes hospitales centinela fue por **meningitis con 58,9%(66 casos)**, mientras que las **neumonías con 41,10% (46 casos)**.
- En cuanto a los **serotipos en ambos cuadros** clínicos fue muy variado. En **meningitis** los más frecuentes fueron el: **19(18%), 14(14%) y 6(9%)**, en **neumonía** el **6(33%),14(17%) y 19(17%)**, estos mismos serotipos se encontraron en otros estudios.
- Los laboratorios y hospitales que participaron de este estudio aportaron con los siguientes porcentajes en el aislamiento de *Streptococcus pneumoniae* de un total de 112 cepas aisladas en estos cinco años de estudio (2000-2005) :
 - En la **ciudad de La Paz**: Hospital Ovidio Aliaga aportó con 31,3% de las cepas; Hospital Obrero con 4,5%, Hospital San Gabriel con 2,7%.
 - En la **ciudad de Cochabamba**: Hospital Albina Patiño 22,3%, Hospital Germán Urquidi (0,9%). Escuela técnica de Salud (15,2%).
 - En la **ciudad de Santa Cruz**: Hospital de niños Manuel Ortiz Suárez (21,4%), Hospital Universitario Japonés (1,8%).

Viendo estos resultados ninguna de las variables puede asociarse a la variable dependiente o resultado que son los **Serotipos**, es decir que cada una es independiente de la otra.

Esto no es una conclusión, porque se trata de un estudio descriptivo de corte transversal donde no existió un grupo caso y un grupo control que permita ver si existía o no-asociación, por lo tanto con estos datos se pueden plantear futuras hipótesis para una próxima investigación analítica.

10. RECOMENDACIONES

- Para estudios epidemiológicos futuros respecto a este microorganismo, se recomienda ampliar la vigilancia con la participación de todos los departamentos de Bolivia, de manera que el universo de estudio sea mayor, reflejando la prevalencia real de los serotipos.
- Se debe mejorar la comunicación con los responsables de los centros hospitalarios para así lograr una mayor continuidad en la recolección y envío de las cepas.
- Se debe capacitar al personal, respecto a la adecuada conservación y envío de las cepas, para evitar que las mismas lleguen inviables al centro de referencia, ya que una de las causas de la No recuperación de las cepas ha sido precisamente este factor, haciendo énfasis sobre todo en el tiempo de viabilidad del microorganismo que no es mayor a una semana (en medio de transporte), pues se trata de microorganismos muy lábiles y de crecimiento fastidioso.
- Se sugiere realizar estudios respecto a la epidemiología molecular de este microorganismo, para un sistema de vigilancia más completo, reconociendo las características genotípicas de las cepas en cada área geográfica, completar con estudios de resistencia y su asociación con los serotipos, verificar si los serotipos 14 y 23 más frecuentes en nuestro estudio corresponden a los clones Francés y Español que circulan en Latinoamérica.
- Sería interesante también realizar estudios de serotipos en aislados nasofaríngeos, comparando de esta manera si son los mismos que se aislaron en muestras invasivas y si constituyen un factor de riesgo para la evolución de meningitis y neumonías que tanto afectan a menores de cinco años.

11. BIBLIOGRAFIA

1. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION “ **Defining the public health impact of drug – resistant *Streptococcus pneumoniae*: report of a working group** “ MMWR 1996; 45: 1-16
2. PRADO Valeria J. “**Conceptos Microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae***”. En revista Chilena de Infectología, vol 18 (1). 2001, pag 6-9.
3. SALYRS Abigail, “**Patogénesis Bacteriana: Enfoque Molecular**”, ed. Copyright, Washington,DC USA; cap 27, pag 322-31,1994.
4. RUBINSKY O. Raul “**Epidemiología y Resistencia a Antimicrobianos de las Enfermedades Latinamericanas**”. En revista Chilena de infectología, vol 18 (1). 2001, pag 10-11.
5. www.sepr.es/servicios_publicaciones.
6. WOLFGAN K. Joklink. et, al. **Zinsser Microbiology**. Ed. Médica Panamericana. S. A, Buenos Aires. 20 ed. 1994. pag. 956-957.
7. USEN S, ADEGBOLA R, MULHOLLAND F. et, al. “**Epidemiology of invasive pneumococcal disease in the Western Región the Gambia**”, *Pediatr Infect Dis J.* 1998, 17:23-8.
8. ADVISORY COMMITTEE ON INJUNIZATION PRACTICES (ACIP): Recommendation of the ACIP, MMWR 1997;46.
9. SMITH, T David “**Microbiología de Zinsser**” 1ed. Hispano Americano, 1995, pag. 600-603.
10. KONEMAN Elmer W, et. Al “**Diagnostico microbiológico**”, ed. Panamericana, buenos aires – Argentina, 1992, pag 432.
11. CARMONA Oswaldo “**Microbiología Médica de Divo**”, ed. McGraw-Hill Interamericana; ed. 5, México D.F. cap.18, pg 133-136, junio 1995.
12. **REVISTA MEDICA URUGUAY**, vol 18, 2002, pag 66-75 (snv.org.ug/publicaciones/rnv/2002/rt-8.pdf).
13. LAGOS Rossana, et al. “**Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* invasive disease in chilean Children Clinical Public Health Perspectives**” En revista Chilena de infectología. Vol 18 (1) 2001 pag. 15-21.

14. RUBINSKY O. Raul **“Infecciones invasivas por *Streptococcus pneumoniae*, estudio epidemiológico e importancia del desarrollo de un sistema de vigilancia”** arch. Argent pediatric. 2002, 100(1).
15. Departamento de Estadística **“Principales causas de morbilidad en Hospitalizados y Ambulatorios”** Hospital de Niño “Dr. Ovidio Aliaga Iría. 1999-2000, La Paz - Bolivia.
16. Sistema Nacional de Información en Salud – SNIS – **Bolivia “Casos de neumonía en niños menores de 5 años”**. Ministerio de salud y Previsión Social, Bioestadística, pag 141, 2002.
17. BURROWS William, et al; **“Tratado de Microbiología”**. ed. 18, Interamericana, S.A, México D.F. cap. 18, pag. 428-37.
18. RUBINSKY O. Raul **“Importancia de la Infecciones Respiratorias Agudas Bajas en Países latinoamericanas”** en neumología en Argentina. 2000.
<http://www.encolombia.com/medicina/neumologia/neumo12400con-impotancia.htm>
19. BASUALDO Juan Angel, et al. **“Microbiología Médica”**, 1ed. Atlante S.R.L, Buenos Aires-Argentina, 1996, pag 249-256.
20. Watson J.D, Crick FHC, **“Molecular Structure of nucleic acid. A structure for dayabose nucleic acid nature”** 1993, 171:731-738.
<http://mxgeocities.com/avolage/genes-b2historia-b2.html>.
21. GARCIA Nieto V. y CARDONA Hernandez R. **“Últimos estudios acerca de la vacuna neumocócica conjugada heptavalente en la infancia”** Depto. Pediatría. Santa Cruz de Tenerife. 2003.
22. STUART Walter **“Microbiología”**, editorial Mc Graw–Hill Interamericana, México 2001, pag 112-132.
23. WORLD HEALT ORGANIZATION, PROGRAMME FOR THE CONTROL OF ACUTE RESPIRATORY INFECTION. **“Pneumococcal conjugate vaccines report of a meeting”** Geneva: WHO, 15-17 november , 1993.pag 1-18.
24. DEJSRILERT S, OVERWEG K, SLUIJTER M, SAENGSUK L, GRATTEN M EZAKI T, et, al **“ Nasopharyngeal carriage of penicillin resistan *Streptococcus pneumoniae* among children with acute respitaotory tract infections in Thailand; a molecular epidemiological survey”**. J Clin Microbiol 1999, 37:1832-8.

25. MONTGOMERY JM, et, al **“Bacterial colonization of the upper respiratory tract and its association with acute lower respiratory tract infections in Highland children of Papua, New Guinea”**. Rev Infect Dis 1999; 12 (suppl28): S 1006-16.
26. BERMAN S. **“Epidemiology of acute respiratory infection in children of developing countries”** Rev. Infect dis . 1994; 13(6): 454-462.
27. SIDNEY M, FINEGOLD, et, al **“Bayley Scott Diagnóstico Microbiológico”** ed. Panamericana. Buenos Aires- Argentina, 7ma ed, 1995, pag 349-350.
28. PAHO/OMS **“Infecciones Respiratorias Agudas en las Américas”** Boletín epidemiológico, 16 (4): 1-5, dic 1995.
29. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD **“Taller sobre la identificación bioquímica y serológica de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*”** En manual de *Streptococcus pneumoniae*. Bogota- Colombia 1998, pag 10-13.
30. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD **“Manual de *Streptococcus pneumoniae*”**, mayo 2002, pag 3.
31. CORNEJO G. Mario, et, al. **“Neumonía Neumocócica”** Hospital Nacional del sur de Arequipa, Instituto Peruano de Seguridad Social, enero 1996.
32. MOLLERACH, Martha Eugenia. **“*Streptococcus pneumoniae*: factores de virulencia y resistencia a antibióticos”**Buenos Aires Argentina, programación científica 1998-2000, JB25
<http://www.rec.ubaar/pc98-00/htm/jb25.htm>.
33. COFFEY TJ, Enright MC, et,al **“Recombination exchanges at the capsular Polysaccharide biosynthetic locus led to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*”**. Mol. Microbiol. 1998; 27:73-83.
34. COFFEY TJ, Dowson CG, et, al **“Horizontal transfer of multiple penicillin binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural population of *Streptococcus pneumoniae*”**. Mol. Microbiol. 1999; 5:2255-60.
35. **“Prevención de la enfermedad neumocócica”** Dirección General de Salud Pública. Advisory Comité on Inmunización practices (ACIP) enero 2001.
<http://www.mundofrec.com/oropesa/vac-antineumoc.pdf>

36. MINISTERIO DE SALUD Y PREVISIÓN SOCIAL, DIRECCION GENERAL DE SALUD. PROGRAMA AMPLIADO DE INMUNIZACIONES PAI-II, “ **Linea de base en Hospitales Centinela para la vigilancia de *Haemophilus influenzae* tipo B y *Streptococcus pneumoniae***, Bolivia 2001
37. LOPEZ Sergio R. et, al, “**Manual de Procedimientos para el diagnóstico de meningitis bacteriana**” Programa de Reconstrucción pos Huracanes George y Match. Asociación de Laboratorios de Salud Pública de Estados Unidos de Norteamérica. agosto 2001. Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia. Nicaragua (CNRD), pag 36-38.
38. SANCHEZ E. PRATS, GARAU X, SALIERAS LI: “**Vacuna antineumocócica**”. En Saliera Li: Vacunaciones preventivas. Barcelona: Masson, 1998, 259-286.
39. Vacuna Antineumocócica. **Recomendaciones del Comité de Vacunas**. 2003.
<http://bus.insp.mx/componen/svirtvol/pprioru/03/ii/art.htm>.
40. SNIADACK D, et, al “**Potencial Intervención for the prevention of Childhood pneumonia**”. Geografic an Temporal. En American journal of Clinical .vol 70, Nº 3, 309-320, sep 1999.
41. KLEIN DI. “**Pneumococcal disease and the role of conjugate vaccines**” Microb. Drug resist 1999: 5:147-57.
42. HORTAL Maria, DI FABIO Jose Luis, “**Vigilancia microbiológica de Infecciones por bacterias capsuladas y su inmunoprevención**”. En Revista Médica del Uruguay, vol 17 Nº3, diciembre 2001, pag. 200-205.
43. HORTAL María, CAMOU Tereza, “**Epidemiología molecular de *Streptococcus pneumoniae***”. En revista Chilena. 2001; 18 (supl1) 22-25.
44. LOPEZ Eduardo, ”**Proyecciones de las vacunas anti.neumocócicas conjugadas en Latinoamérica**”. En rev. Chil. Infec. 2001, 18(supl1) : 25-30.
45. LOPEZ GARCIA Rubens “**I Linea de investigación. Estudios moleculares de factores de patogenicidad de *Streptococcus pneumoniae* capsuladas, bacteriófagos y proteínas de unión a colina**”. Madrid 21 de junio de 1999.
46. HORTAL María, RUBINSKY Raul, ROSSI Alicia, DI FABIO José Luis, et. al. “**Impacto de *Streptococcus pneumoniae* en las neumonías del niño latinoamericano**”.Grupo SIREVA- Vigia.

47. CASADO FLORES J, FENOLL A, et, al “**Meningitis neumocócica en niños españoles: Incidencia, serotipos y resistencia antibiótica**”, Estudio prospectivo multicéntrico, Unidad de investigación, Hospital Clínico San Carlos (Madrid), España, 2001.
48. BRUMBERG K, HAMMERSCHALAG MR. “**Rapid diagnosis of pneumonia in children**” Semin Respir Infect. 1997, 2: 159-165.
49. GASE, AM, GAMMARINARO P, HOANY Ton, et, al “**Structural organization of the *Streptococcus pneumoniae* chromosome and reladness of penicillin-sensitive and resistan strains in type 9V**. En Tomasy, A *Streptococcus pneumoniae*. Ed. My and Liebert Inc. New York 2000: 25-32.
50. WILLIAMSON R, HALENBECKY R, TOMASY A, “**The penicillin binding proteins of *Streptococcus pneumoniae* grow under lysis permissive and lysis protective (tolerant) condition**. FEMS Microbiolog Letters. 1999, 7: 127-131.
51. LACKS S, NEUBERGEN M, “**Membrane location of a deoxyribonuclease implicated in the genetic transformation of *Streptococcus pneumoniae***” J Bacteriolog. 1995, 124: 1321-1329.
52. GNEUSEN UBS, BEMEDSON Agger, HENRICSEN J. “**Phosphorycoline determinants in sex pneumococcal capsular polysaccharides deleted by monoclonal antibody**. Infect Immun. 1995, 43: 876-878.
53. VAN DAM, FLEER Jec, SNIPPE A, “**Immunogenecity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* Capsular polysaccheridas**. Antonie Leewnhoech. 1990. 58: 1-47.
54. BRILES DE Arian, GRAY BAS M.J, YOTHER J. “**Strong association between capsular type and virulance for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae***” Infect Immun 1995, 60: 111-116.
55. Sorensen U, Blom B.S. “**Capsular polysaccharide is linked the outer surface of type 6A pneumococcal cell walls**. APM IS 1995, 100:891-893.
56. HOFFMAN S, SORKIN P.C, WHITE R, et, al “**Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from embryonic brain membranes**. J Bio chem. 1996, 257: 7720-7729.
57. SHIVAEV, VN, “**Biosynthesis of bacterial polysaccharide chains composed of repeating units. Adv. Carbohydrate**”. Chem. Brochem 1996, 44: 277-339.

58. MILLS G.T; Smit E.E.B, "**Biosynthesis of capsular polysaccharides in the pneumococcus, Bul**". Soc. Biol, 1993, 46: 1751-1765.
59. LOVE, A.M; LAMBERT, P.A, et, al "**Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen homology whit adhesions from some oral *Streptococci***". Infect Immun. 1995, 63:703-706.
60. JHONSTON Jr. "**Pathogenesis of pneumococcal pneumonia**. Rev. Infect , Dis 13 (supp) : 5509-5517. 1996.
61. CROSS, A.S "**The biological significance of bacterial encapsulation. Curr. Topics**". Microbiol Immun 1996, 150:87-95.
62. TZIANOBOS, A.O; ONDERBONK A.B; Rosner. R.L, et, al. "**Structural features of polysaccharides that induce intra abdominal abscesses**". Science 1996, 262:416-419.
63. BHAKDI S, TRAANUM J, "**Membrane damage by pore forming bacterial cytolisin**" Microb. Pathog. 1998, 1:5-14.
64. DE LOS TOYOS, JR; Mendez J.F. et. al. "**Functioned análisis of pneumolysin by use of monoclonal antibodies**". Infect. Immun 1996 64:480-484.
65. WHITFIEL C; VALVANO M.A "**Byosynthesis and expresión of cell-surface polysaccharides in Gram negative bacteria**. Adv. Microb. Physiol 1995, 35:135-246.
66. FELDMAN C, MITCHELL T.J, et. al. "**The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium in vivo**". Microb. Pathog. 1990, 9: 275-284.
67. CANVIN, J.R, MARVIN A.P, SIVAKUMERAN J.C, et. al "**The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicaemia in mice infected with a type 2 penumococcus**". J. Infect. Dis 1995, 172:119-123.
68. BERREY A. M, JOTHER J; DE BRILES et. al. "**Reduced virulence of a defined pneumolysin negative mutant of *Streptococcus pneumoniae***". Infect Immun. 1999. 57:2037-2042.
69. FREDLAN J.R, PARIS M.M HICHEY S, et, al. "**The limited role of pneumolysin in the pathogenesis of pneumococcal meningitis**". J. Infect Dis. 1995, 172:805-809.

70. MITCHELL T.J ; ANDREW P.W ; et. al, “**Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region homologous to a human acute phase protein**”. Mol. Microbiol. 1995, 5: 1883-1888.
71. CAMARA M, MITCHELL T.J, ANDREW P.W, et, al.“***Streptococcus pneumoniae* produces at least two distinct enzymes with neuraminidase activity: cloning and expression of a second neuraminidase gene in *Escherichia coli***”. Infect. Immune 1996, 59: 2856-2858.
72. PATON, J.C; ANDREW P.W; BOULNOIS G.J, et, al. “ **Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: The role of pneumococcal proteins annu**”. Rev. Microbiol 1999, 47: 89-115.
73. COURTNEY, H. “**Degradation of connective tissue proteina by serin proteases from *Streptococcus pneumoniae***”. Biochem. Biophys. Res. common 1996. 175: 1023-1028.
74. ANGEL, C.S; RUZEK M. HOSTETTER M.K. “**Degradación of C3 by *Streptococcus pneumoniae***”. Infect Dis. 1995, 170:600-608.
75. DUANE, P.G; RUBINS J.B, WEISEL H.R et, al “**Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells**”. Infect Immun 1996, 61: 4392-4397
76. CANTON E, MONTANER M, PEREZ BELLEZ, ROMAN J, MORENO R, et. al. ”**Serotipos y sensibilidad antibiótica de *Streptococcus pneumoniae* en niños del área de Valencia y Castellón**”. estudio prospectivo multicéntrico. En Rev. Esp. Quimioterap. Dic 2003. vol16, N° 14: 412-420.
77. ASTRIAN P. “**Neumococal polisacharide vacines**”, en rev. Infect Dis 1999, supl. 5: 598-602.
78. RUVINSKY Raul; GENTILE Angela; REQUEIRA Mabel; CORSO Alejandra, et, al “**Infecciones invasivas por *Streptococcus pneumoniae*: Estudio epidemiológico e importancia del desarrollo de un sistema de vigilancia**” En Rev. Chilena de pediatría. Vol 75 N°1. Santiago. ene. 2004.
79. GARRIDO et, al “**Six menly reognizide types of *Streptococcus pneumoniae***”. J Clin Microbiol, 1995; 33: 2759-2762.
80. SNIADACK D.H; SCHAWARTZ B; LIPMAN H. et, al “**Potential interventions for the prevention of childhood serotype and serogroup distribution of sterile site pneumococcal isolates from children implications for vaccine strategies**”. Pedriat. infect Dis. J 1995; 148: 503-510.

ANEXO 1
MINISTERIO DE SALUD Y DEPORTES
INSTITUTO NACIONAL DE LABORATORIOS EN SALUD
LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA EN BACTERIOLOGÍA CLÍNICA

PROGRAMA NEU – HIB

FICHA EPIDEMIOLOGICA

Laboratorio: Departamento:
 Responsable:
 Fecha de toma de muestra: Fecha de envío de cepa:

DATOS GENERALES DEL PACIENTE

Nombre: Edad: Sexo: Masculino
 Femenino
 Procedencia: Urbana Rural Periurbana
 Pentavalente: 1ª dosis
 2ª dosis
 3ª dosis
 Dx. presuntivo: Tipo de muestra:
 Rx en Neumonía: Normal Patológico
 Tratamiento previo: Si
 No
 Cuáles?.....

BIOQUIMIOTIPIFICACION

Tinción Gram: Diplococos Gram positivos
 Cocobacilos Gram negativos
 Hemólisis: Alfa
 Beta
 Gamma
 Catalasa: Positivo Negativo
 Optoquina: mm Oxacilina: mm
 Oxidasa Positivo Negativo
 β - lactamasa: Positivo Negativo
 Factor XV Factor V

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO:

(No llene la sección debajo de esta línea)

Código de Lab.: Fecha de recepción de cepa:
 Tinción Gram: Diplococos Gram positivos
 Cocobacilos Gram negativos
 Hemólisis: Alfa
 Beta
 Gamma
 Catalasa: Positivo Negativo
 Optoquina: mm Oxacilina: mm
 Solubilidad en bilis Positivo Negativo
 Serotipo
 Oxidasa Positivo Negativo
 β - lactamasa: Positivo Negativo
 Factor XV Factor V

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

OBSERVACIONES

ANEXO 2

FUNDAMENTO Y PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

➤ AGAR SANGRE CON 5% DE SANGRE DE CORDERO

Composición Química

Triptona	14 g
Peptona	4,5g
Extracto de levadura	4,5g
Cloruro de sodio	5g
Agar	12,5g
Agua destilada	1000 mL
pH final	7.3 ± 0,2

Preparación

- Pesar 40g y disolver en un litro de agua destilada, llevar a ebullición hasta que den tres hervores.
- Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos
- Enfriar a 50°C (Baño María)
- En forma aséptica adicionar 5% de sangre de cordero estéril (desfibrinada)
- Distribuir en cajas petri

Control de calidad

a. Control de Crecimiento

El objetivo de este control de calidad es asegurar que el medio preparado tenga las condiciones necesarias para mantener el crecimiento de microorganismos no fastidiosos, además de demostrar la alfa y beta hemólisis.

Preparación de los inóculos

- Se prepara una suspensión bacteriana igual a 0,5 de Mc. Farland en solución fisiológica estéril a partir de un cultivo fresco de las cepas ATCC.
- Realizar una dilución 1/100 de la suspensión 0,5 de Mc. Farland en solución fisiológica estéril.
- De esta suspensión añadir 10 uL al medio preparado.
- Incubar a 35°C en atmósfera de CO₂ por 18 a 24 horas
- Después de la incubación examinar las colonias con morfología y hemólisis característica
- Registrar los resultados en formularios de trabajo

Cepas Control

- *S. pyogenes* ATCC 19615 A las 24 horas de incubación
observar colonias con hemólisis
beta
- *S. pneumoniae* ATCC 49619 A las 24 horas de incubación
observar colonias con hemólisis alfa

b. Control de esterilidad

- Incubar una caja de agar sangre (por lote de un litro), durante 24, 48, y 72 horas a 35°C, observar después de la incubación ausencia de crecimiento.
- Registrar los resultados en formularios de trabajo

➤ CALDO PARA HEMOCULTIVO PEDIÁTRICO

Los caldos para hemocultivo, son tan enriquecidos que facilitan la recuperación de microorganismos aeróbicos y anaeróbicos presente en la sangre en caso de bacteriemias, septicemias, infecciones intravasculares, etc.

Las principales fallas en la recuperación de los agentes etiológicos de las bacteriemias son las propiedades bactericidas del suero del enfermo y la coagulación de la sangre, ya que en el coágulo pueden quedar atrapadas las bacterias.

Dicha acción bactericida se supera aumentando la relación de dilución del medio de cultivo (1/10), la coagulación se previene con la dilución y con el empleo de anticoagulantes apropiados como el polianetol sulfonato de sodio (SPS) que actúa además como inhibidor del poder bactericida del complemento y de la actividad fagocitaria de los leucocitos.

Los hemocultivos vienen en diferentes presentaciones, se recomienda para pacientes pediátricos frascos de 20 mL o de volúmenes menores, lo cual permitirá, la extracción de sangre en el niño máximo de 2 mL.

Composición Química

Los frascos de hemocultivo multipropósito utilizados fueron de la casa comercial BRITANIA cuya composición es el siguiente:

- Infusiones nativas de cerebro y corazón bovino
- Extracto de levadura
- Cisteína
- Hematina

- Mezcla de vitaminas
- Mezcla de minerales

Control de Calidad del medio

a) Control de Esterilidad

Los medios en los frascos deben estar transparentes, algunos medios a los cuales se ha añadido CO₂ y SPS pueden ser ligeramente opalescentes o contener un rastro de precipitado.

Incubar un porcentaje de los frascos a 35°C durante 48hrs , después comprobar esterilidad realizando una siembra del caldo en agar sangre.

b) Control de crecimiento

- Preparar un suspensión se *S. pneumoniae* ATCC 49619 igual al patrón de turbidez 0,5 Mac Farland (1x10⁸ UFC/mL) a partir de un cultivo fresco, de esta suspensión realizar diluciones de manera que la última dilución tenga una concentración igual a 10³ UFC/mL.
- De esta concentración inocular 0,1ml en cada una de las botellas de hemocultivo a probar.
- Incubar a 35°C durante 7 días, realizando una resiembra cada día en agar sangre.

➤ MEDIO DE CONSERVACION SKIM MILK

La leche descremada al 20 % se usa como medio completo o como ingrediente de otro medio especial, para la propagación de microorganismos en productos lácteos. El polvo de la leche descremada es un polvo desecado a partir de grandes volúmenes de leche descremada, es soluble y fácil de preparar.

Este medio se usa como crioprotector para conservar microorganismos aeróbicos y anaeróbicos a -70°C, así como para el proceso de liofilización de la mayoría de microorganismos incluyendo levaduras y hongos.

Composición Química

Bacto Skim Milk (Disco 0032-17-3) es un producto estandarizado por la casa comercial, cuando se reconstituye equivale a leche desnatada fresca.

Preparación

- Disolver 20g del medio en 100ml de agua destilada
- Esterilizar a 116°C por 10 min.
- Distribuir en crioviales en volúmenes de 1,5 a 2mL

Tener cuidado de evitar sobrecalentamiento o que la leche tome un color caramelo, en estas condiciones no conservará la viabilidad de los microorganismos. El pH del medio debe mantenerse en $6,1 \pm 0,2$

Control de calidad

Control de Esterilidad

Debe realizarse control de esterilidad incubando el medio durante 48 horas un % de los viales, luego comprobar esterilidad realizando una siembra en agar sangre.

➤ MEDIO DE AMIES CON CARBÓN ACTIVADO

Este medio está diseñado para usarse como medio de transporte de muestras o cepas que contengan bacterias, hongos o parásitos, posee la capacidad de mantener viables a estos microorganismos durante su transporte.

Composición Química

- | | |
|-----------------------------|--------|
| • Cloruro de sodio | 3 g |
| • Cloruro de potasio | 0,2 g |
| • Cloruro de calcio | 0,1 g |
| • Cloruro de magnesio | 0,1 g |
| • Cloruro de potasio | 0,2 g |
| • Fosfato básico de potasio | 1.15 g |
| • Tioglicolato de sodio | 1,0 g |
| • Carbón | 10 g |
| • Bacto Agar | 4 g |

pH final de $7,3 \pm 0,2$ a 25°C

Preparación

- Disolver 20g en 1L de agua destilada
- Calentar hasta ebullición para disolver completamente el polvo
- Dispensar el medio en viales con tapa de rosca más o menos de 6 a 8 mL de medio.

- Esterilizar en autoclave durante 15min. a 121°C
- Invertir los viales justo antes de que el medio se solidifique para distribuir el carbón uniformemente.
- Dejar que enfrié los viales para su manejo.

Control de calidad

a) Control de esterilidad

Tomar al azar 2 a 4 viales preparados, realice una siembra del medio a las 24, 48 y 72 horas, no debe haber crecimiento alguno.

b) Control de Crecimiento

Utilizar cepas control : *Haemophilus influenzae* ATCC 10211

Neisseria gonorrhoeae ATCC 43069

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

- Preparar suspensiones de estos microorganismos igual a 0,5 de Mac Farland (1×10^8 UFC/mL)
- A partir de esta suspensión realizar un dilución 1:10 en solución salina estéril (10^7 UFC/mL)
- Inocular con un escobillón esta suspensión en el medio
- Dejar por 24 horas a temperatura ambiente
- Subcultivar en agar sangre o chocolate cada uno de los tubos con Amies durante 24 y 48 horas
- Comprobar que haya buen crecimiento.

ANEXO 3

FUNDAMENTO DE PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO

➤ TINCIÓN GRAM

En las bacterias Gram positivas (ácidos teicoicos y magnesio) el cristal violeta se fija a la pared celular y con la adición de lugol (mordiente) se produce el complejo cristal violeta-yodo, el cual es resistente a la decoloración con alcohol acetona.

En las bacterias Gram negativas el decolorante actúa como un solvente de los lípidos presentes en los poros de la pared que aumentan de tamaño liberando el complejo cristal violeta-yodo tomando la bacteria el colorante de contraste (fucsina básica)

Material

Batería de tinción Gram

- Cristal violeta
- Lugol
- Alcohol acetona
- Fucsina básica

Control de calidad de la Tinción

Previa a la utilización de la tinción Gram, se realiza control de calidad de los reactivos con las siguientes cepas de referencia:

- Gram positivo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Gram negativo : *Escherichia coli* ATCC 25922

Procedimiento

- Suspender la colonia en una gota de solución fisiológica, sobre un porta objetos
- Dejar secar a medio ambiente, fijar a la llama del mechero (pasar tres veces por la llama soportando la temperatura en el dorso de la palma de la mano)
- Cubrir el extendido con cristal violeta por 1 min.
- Lavar con agua de la pila
- Cubrir el extendido con lugol por 1 min.
- Lavar con agua de la pila
- Cubrir con alcohol acetona por 1 min.

- Lavar con agua de la pila
- Cubrir con fucsina básica
- Lavar con agua de la pila
- Dejar secar

Lectura

Realizar la lectura en microscopio con aceite de inmersión y el objetivo de 100X

Interpretación

Gram positivo : Bacterias teñidas de color violeta
 Gram negativo: Bacterias teñidas de color rosado

➤ **PRUEBA DE LA CATALASA**

Comprueba la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias que contienen citocromo, la excepción principal es la familia de *Streptococcus*

Material

- Porta objetos
- Anza Bacteriológica

Reactivos

- Agar sangre con desarrollo bacteriano
- Peroxido de Hidrógeno 3%

Procedimiento

- Con un anza bacteriológica recoger la parte superior de una colonia bien aislada y fresca (18 a 24hrs. Incubación).
- Colocar la colonia sobre un portaobjetos
- Agregar una gota de peroxido de hidrógeno al 30 % sobre la colonia

Lectura

Observar inmediatamente la presencia o ausencia de burbujas.

Interpretación

Positivo: Formación de burbujas por liberación de oxígeno
Negativo: Ausencia de burbujas

Control de calidad

- Positivo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Negativo: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

➤ PRUEBA DE LA OPTOQUINA

La optoquina es un compuesto químico: Clorhidrato de etilhidrocupreina impregnado en discos de papel filtro a una concentración de 5ug que inhiben el crecimiento de *Streptococcus pneumoniae* debido a cambios de tensión superficial, produciendo una zona de inhibición alrededor del disco.

Material y Equipo

- Anza bacteriológica
- Estufa de 35°C

Reactivos

- Agar Sangre con cultivo bacteriano
- Discos de optoquina de 5ug

Procedimiento

- Sembrar con una anza una o dos colonias bien aisladas de cultivo fresco sobre agar sangre.
- Colocar el disco de optoquina sobre la siembra.
- Incubar 35°C + 5% de CO₂ durante 18 a 24 horas.

Lectura

Medir el diámetro en mm de la zona de inhibición alrededor del disco

Interpretación

Positivo: Halo de inhibición ≥ 14 mm en discos de 6 mm
Halo de inhibición ≥ 16 mm en discos de 10 mm

Negativo: Ausencia de halo de inhibición

Control de calidad

- Positivo: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619
- Negativo: *Streptococcus grupo viridans*

➤ PRUEBA DE SOLUBILIDAD EN BILIS

Las sales biliares específicamente el desoxicolato y el taurocolato de sodio tienen la capacidad de lisar al *S. pneumoniae*, cuando en solución se adicionan a una suspensión de microorganismos a partir de un cultivo fresco.

Material

- Tubos de hemólisis
- Hisopos estériles

Reactivos

- Cepas control positivo y negativo
- Escala Mac Farland N° 1
- Desoxicolato de sodio al 10%
- Solución salina estéril
- Cultivo puro y fresco de *S. pneumoniae*

Procedimiento

- A partir de un cultivo puro, preparar una suspensión densa del microorganismo en solución salina estéril, con una turbidez igual a 1 de la escala de Mac Farland
- Para cada microorganismo estudiado se utiliza dos tubos, marcando un tubo como prueba (**P**) y el otro como control (**C**)
- Se coloca en cada tubo 0,5mL de la suspensión bacteriana preparada.
- Al tubo (P) se adiciona 0,5mL de desoxicolato de sodio al 10%
- Al tubo (C) se adiciona 0,5 mL de solución salina estéril
- Mezclar suavemente los tubos e incubar a 35°C en baño María o en Estufa de incubación por un periodo de 3 horas.

Lectura

Observar si en los tubos hay aclaramiento o permanecen turbias las suspensiones

Interpretación

Positivo : Aclaración de la suspensión del tubo (P)

Negativo : Permanece turbio la suspensión del tubo (C)

Control de Calidad

- Control positivo: *S. pneumoniae* ATCC 49619
- Control negativo: *Streptococcus* grupo *viridans*

➤ PRUEBA DE QUELLUNG

Procedimiento confirmatorio para *Streptococcus pneumoniae*, el cual utiliza una mezcla de sueros polivalentes producidos por los conejos (anticuerpos) los cuales reaccionan con el polisacárido capsular (antígeno) haciendo evidente la cápsula al ser observado al microscopio, debido a una alteración de su índice de refracción.

La reacción de Neufeld - Quellung no es una reacción de hinchamiento capsular como comúnmente se asume. Es una reacción de precipitación entre el suero específico y el antígeno capsular del *Streptococcus pneumoniae*.

Material y Equipo

- Porta objetos
- Cubre objetos
- Ansas descartables de 1ul
- Microscopio

Reactivos

- Azul de metileno al 1%
- Antisueros específicos
- Solución de PBS pH 7,2
- Cultivo fresco

Procedimiento

- Colocar 1 uL de PBS sobre una lámina portaobjetos
- Con un anza descartable tomar una colonia bien aislada de *S. pneumoniae* y colocar sobre la gota de PBS (no debe quedar una suspensión densa)
- Adicionar 1uL del pool (antisuero) correspondiente y mezclar
- Sobre un cubreobjetos colocar una gota de azul de metileno y con esta cubrir la preparación anterior
- Colocar sobre el cubreobjetos una gota de aceite de inmersión

Lectura

- Observar al microscopio con el objetivo de 100X

Interpretación

Positivo: Hinchamiento de la cápsula de *S. pneumoniae* con una refringencia azul, y aglutinación de bacterias.

Negativo: No hay hinchamiento de cápsula ni aglutinación de bacterias.

Control de Calidad

- Control positivo: *S. pneumoniae* ATCC 49619 serotipo 19F
- Control negativo: *Streptococcus* grupo *viridans*.

ANEXO 4

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

➤ DESOXICOLATO DE SODIO AL 10%

Esta solución es usada para realizar la prueba de solubilidad en bilis

Reactivos

Desoxicolato de sodio	10g
Agua destilada o deionizada	100ml

Preparación

Pesar y mezclar los reactivos hasta disolver completamente, esterilizar por filtración y almacenar en frascos estériles.

El tiempo de duración del reactivo es más o menos de 6 meses, controlar antes de utilizar la solución, si no presenta turbidez o precipitación, de ser así debe ser descartado.

➤ AZUL DE METILENO AL 1%

Reactivos

Polvo de azul de metileno	1g
Agua destilada o deionizada	100mL

Preparación

- Disolver completamente 1g de polvo de azul de metileno en 100ml de agua destilada
- Esterilizar por filtración
- Conservar en frasco estéril durante 6 meses, al cabo de los cuales debe ser descartado

➤ ESCALA DE MAC FARLAND

Con el objeto de estandarizar la cantidad de bacteria que se emplean en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, debe prepararse un estándar de BaSO₄ equivalente al estándar de Mac Farland.

Material y reactivos

- 10 tubos con tapa de rosca de 16x150mm
- Solución de cloruro de bario al 1%
- Solución de ácido sulfúrico al 1%

Preparación

Mida y sirva en cada tubo los volúmenes que aparecen en la siguiente tabla:

Tubo	BaCl ₂	H ₂ SO ₄	UFC/ml (x10 ⁸)
0,5	0,05 mL	9,95 mL	1,5
1	0,1 mL	9,9 mL	3
2	0,2 mL	9,8 mL	6
3	0,3 mL	9,7 mL	9
4	0,4 mL	9,6 mL	12
5	0,5 mL	9,5 mL	15
6	0,6 mL	9,4 mL	18
7	0,7 mL	9,3 mL	21
8	0,8 mL	9,2 mL	24
9	0,9 mL	9,1 mL	27
10	1,0 mL	9,0 mL	30

Verificar la densidad correcta de los estándares de turbidez con un espectrofotómetro, para determinar la absorbancia de las suspensiones.

La escala 0,5 de Mac Farland a 625nm debe dar una absorbancia de 0,08 a 0,10

Los estándares deben transferirse en alícuotas de 4 a 6 mL a tubos de tapa de rosca del mismo tamaño que los que se emplearan par preparar el inóculo de la bacteria a probar.

Los tubos deben sellarse con papel parafilm y guardarse a temperatura ambiente y en la oscuridad, anotando desde luego la fecha de preparación.

➤ **SOLUCION DE PBS (Phosphate Buffer Solución)**

Reactivos

- | | |
|-------------------------|--------|
| • Cloruro de sodio | 8g |
| • Cloruro de potasio | 0,2g |
| • Fosfato di sódico | 1.44g |
| • Fosfato mono potásico | 0,24g |
| • Agua destilada c.s.p | 1000mL |

Preparación

Pesar todos los constituyentes y disolver en agua destilada, calentar suavemente y tomar el pH 7,2+/- 0,1. Esterilizar a 121°C por 15 minutos, identificar y señalar fecha de elaboración y expiración. Almacenar a 4°C en frascos estériles.

ANEXO 5

TOMA DE MUESTRA Y PROCESAMIENTO

➤ TOMA DE MUESTRA PARA HEMOCULTIVO

Toda muestra debe ser obtenida de acuerdo a las normas de asepsia requeridas, descritas a continuación:

- Lavar cuidadosamente las manos con jabón y secarlas con papel desechable.
- Utilizar guantes estériles para proteger las manos y evitar contaminación
- Trabajar bajo la protección de un mechero.
- Escoger el lugar de punción antes de colocar el torniquete.
- Realizar asepsia rigurosa del lugar de punción seleccionado, utilizando una torunda estéril embebida en alcohol yodado al 2%, realizar la limpieza con movimientos circulares o centrífugos (de adentro hacia fuera).
- Esperar algunos instantes para que evapore la solución yodada.
- Realizar la punción con jeringa y aguja estéril, coleccionar la muestra, evitando la formación de burbujas, aspirando lentamente.
- El volumen de sangre se determinará de acuerdo al volumen del medio de cultivo en una dilución 1:10
- Antes de inocular la sangre en el frasco de hemocultivo, desinfectar el tapón con alcohol yodado, esperar a que seque, luego vaciar la sangre lentamente
- Mezclar suavemente por inversión.

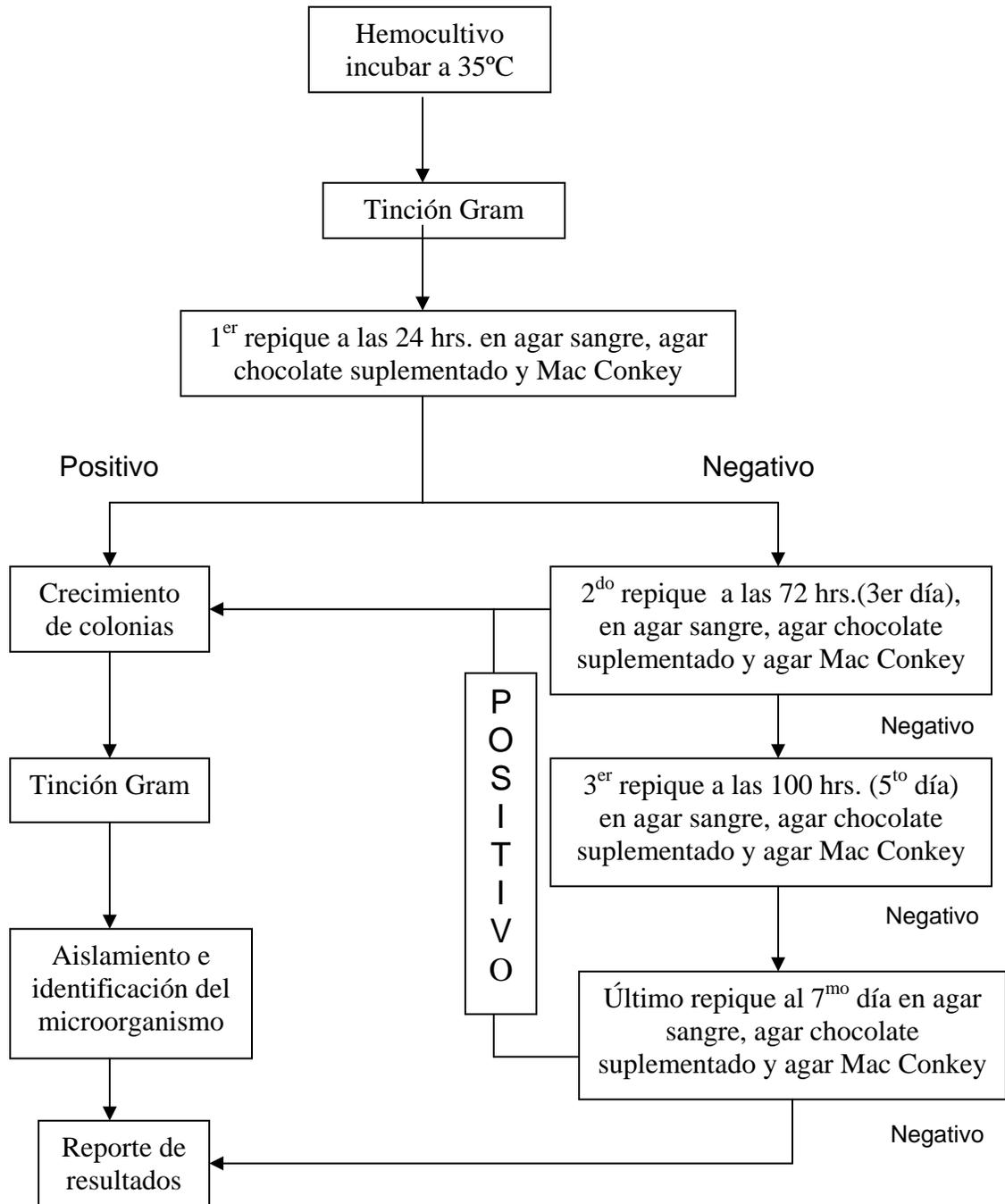
➤ TOMA DE MUESTRA DE LCR (Líquido cefalorraquídeo)

- La obtención de líquido cefalorraquídeo es un procedimiento invasivo que debe ser realizado solo por personal médico con experiencia y en un hospital.
- Lavar cuidadosamente las manos con jabón y secarlas con papel desechable.
- Utilizar guantes estériles para proteger las manos y evitar contaminación.
- Realizar asepsia rigurosa del lugar de punción seleccionado, utilizando una torunda estéril embebida en alcohol yodado al 2%, realizar la limpieza con movimientos circulares o centrífugos (de adentro hacia fuera).
- Esperar algunos instantes para que evapore la solución yodada
- Realizar la punción entre el 3^{er} y 4^{to} espacio intervertebral lumbar.
- La cantidad necesaria es de 2 a 5 mL
- Procesar el LCR dentro de un margen mínimo de tiempo desde la toma de muestra, pues muchos gérmenes se lisan transcurrido cierto lapso de tiempo (mayor a 2 horas), dándonos falsos negativos.

➤ TOMA DE MUESTRA DE LÍQUIDO PLEURAL

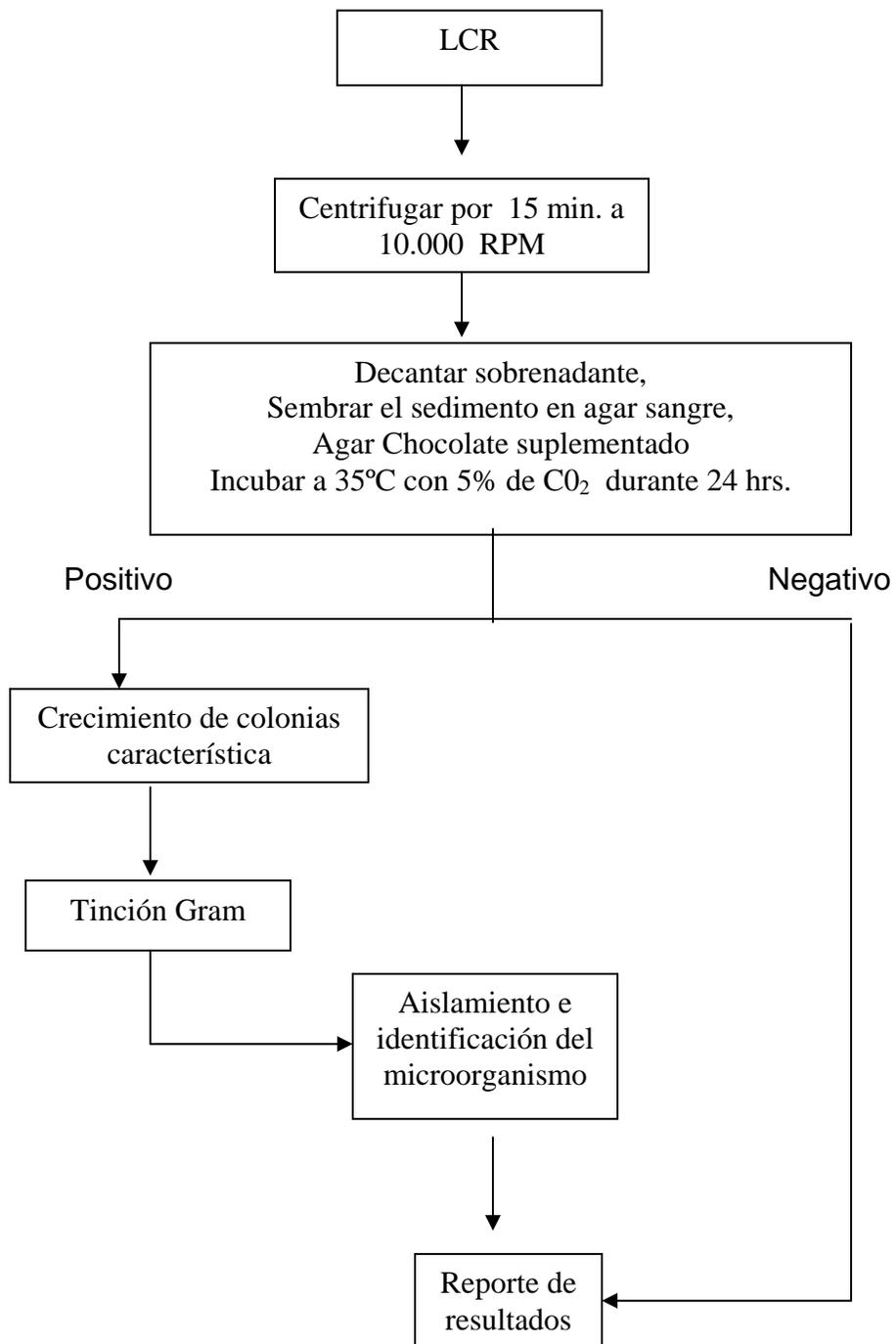
- La obtención de líquido pleural es un procedimiento invasivo que debe ser realizado solo por personal médico con experiencia y en un hospital.
- Lavar cuidadosamente las manos con jabón y secarlas con papel desechable.
- Utilizar guantes estériles para proteger las manos y evitar contaminación.
- Antes de realizar la toracocentesis asegurarse que la sala de procedimientos este equipada con todo el material necesario para el drenaje pleural, Además de tener el equipo de resucitación (laringoscopio, tubo endotraqueal, cánula, etc.)
- Realizar asepsia rigurosa del lugar de punción seleccionado, utilizando una torunda estéril embebida en alcohol yodado al 2%, realizar la limpieza con movimientos circulares o centrífugos (de adentro hacia fuera).
- Esperar algunos instantes para que evapore la solución yodada
- Realizar la punción, colectar la muestra en un tubo estéril con tapa de rosca , al cual se le añade una pequeña cantidad de polianetol sulfonato de sodio (SPS) o heparina estéril para evitar la coagulación del líquido pleural.
- La cantidad necesaria es de 2 a 5 mL
- Procesar el Líquido pleural dentro de un margen minino de tiempo.

➤ PROCESAMIENTO DE HEMOCULTIVO

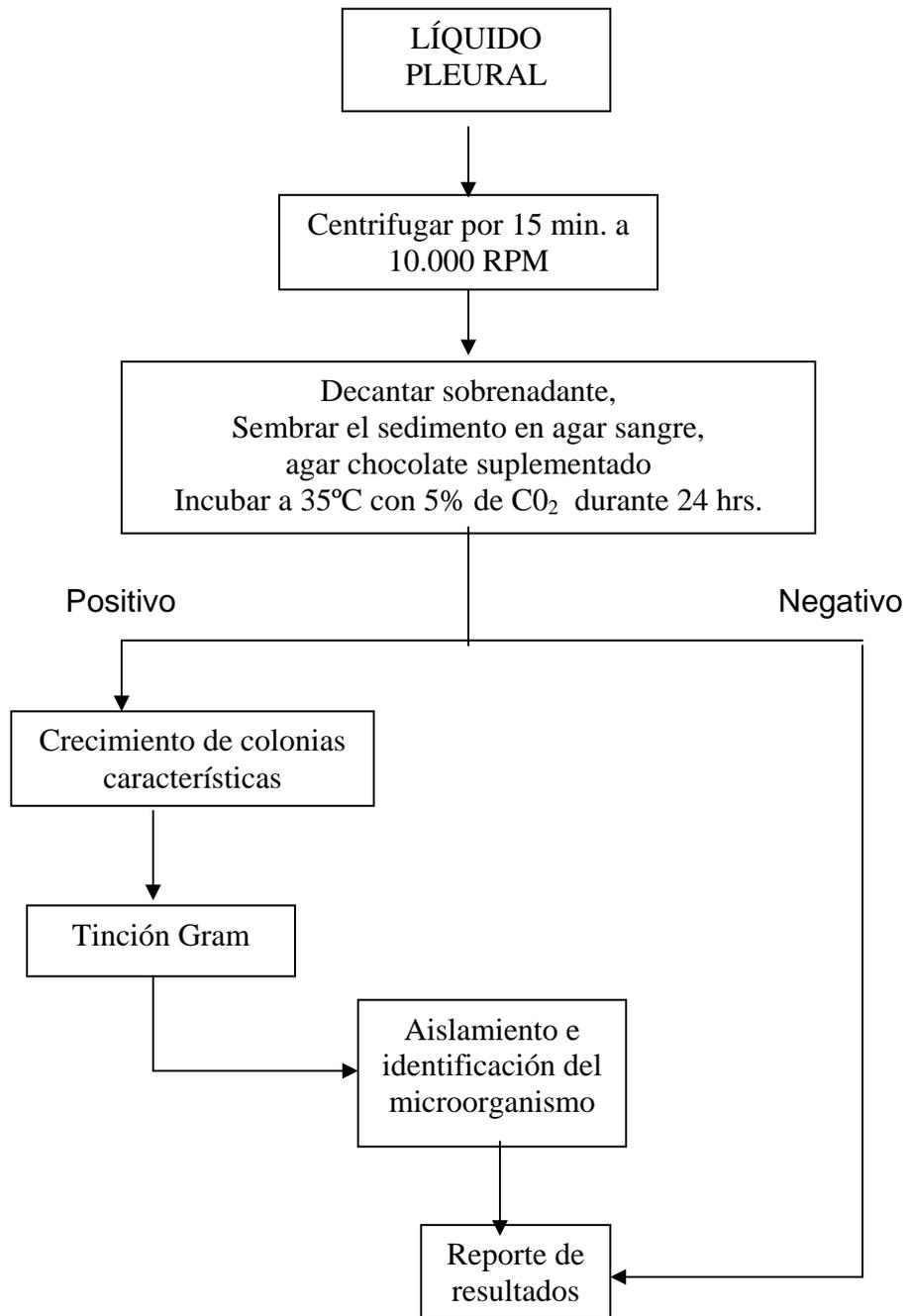


Todas las resiembras se deben incubar en atmósfera de 5 a 7% de CO₂

➤ PROCESAMIENTO DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDEO



➤ PROCESAMIENTO DE LÍQUIDO PLEURAL



Las muestras francamente purulentas deben sembrarse directamente.

ANEXO 6

FOTOGRAFIAS

➤ MATERIAL Y REACTIVOS PARA SEROTIPIFICAR *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*



Antisueros polivalentes de *Streptococcus pneumoniae*



Aceite de inmersión



Azul de metileno



Solución de PBS pH 7,2



Cubre objetos



Porta objetos



Anza descartable de 1 μ L

➤ **MATERIAL PARA TOMA DE MUESTRA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE CEPAS**



Hemocultivos pediátricos



Medio de transporte Amies con carbón activado



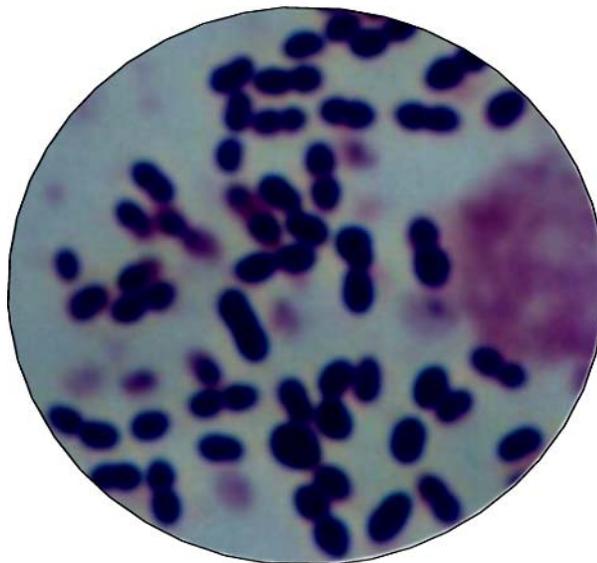
Medio de Skim Milk para conservación de cepas

➤ AISLAMIENTO EN AGAR SANGRE DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*



Colonias mucoides rodeadas de alfa hemólisis

➤ TINCIÓN GRAM DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*



Diplococcos Gram positivos
Streptococcus pneumoniae

➤ PRUEBA DE LA CATALASA



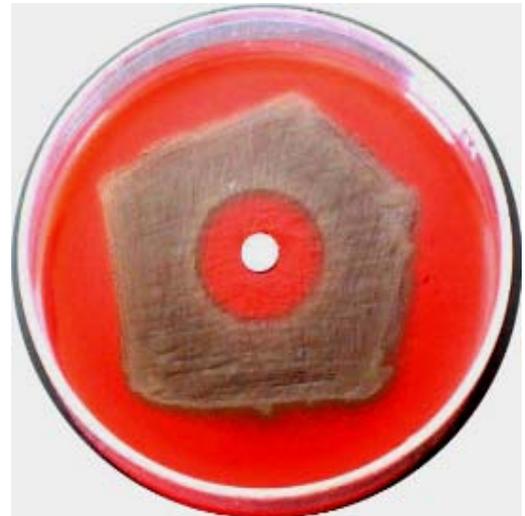
Catalasa positiva
Género *Staphylococcus* spp

Catalasa negativa
Género ***Streptococcus*** spp

➤ PRUEBA DE LA OPTOQUINA



Optoquina negativa
Streptococcus viridans



Optoquina positiva
Streptococcus pneumoniae

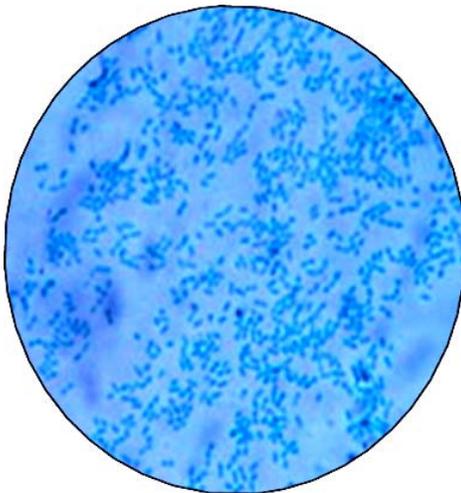
➤ PRUEBA DE SOLUBILIDAD EN BILIS



C : *Streptococcus viridans* insoluble en bilis (turbidez)

P : *Streptococcus pneumoniae* soluble en bilis
(aclaramiento de la suspensión bacteriana)

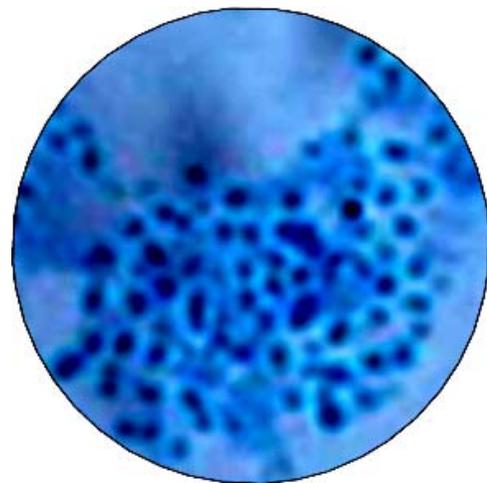
PRUEBA DE QUELLUNG



Quellung negativo

Streptococcus viridans

No se observa cápsula ni aglutinación



Quellung positivo

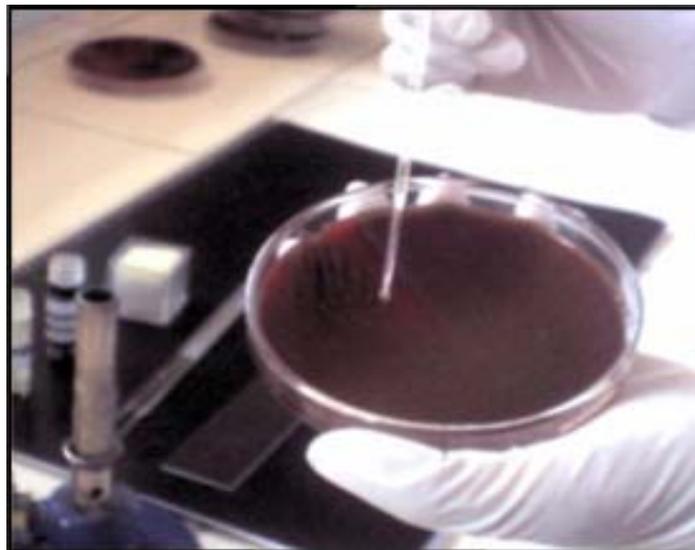
Streptococcus pneumoniae

Se observa refringencia de la cápsula
y aglutinación de los microorganismos

➤ **PROCEDIMIENTO DE LA TÉCNICA DE QUELLUNG**



Cargando 1 μ L de PBS en porta objetos



Tomando 1 colonia de *S. pneumoniae*



Cargando 1 μ L de antisuero



Colocando azul de metileno en cubre objetos



Montando la preparación con aceite de inmersión



Observación microscópica de la preparación con aumento de 100X

ANEXO 7

TABLAS

Tabla 2. Serotipos de *Streptococcus pneumoniae* aisladas de muestras de sangre, LCR y líquido pleural en niños menores a cinco años durante las gestiones 2000-2005

Serotipos	Frecuencia	Porcentaje
6	21	18,80%
19	20	17,90%
14	17	15,20%
23	7	6,30%
5	6	5,40%
7	5	4,50%
18	5	4,50%
1	4	3,60%
9	4	3,60%
11	4	3,60%
12	3	2,70%
24	3	2,70%
10	2	1,80%
28	2	1,80%
33	2	1,80%
NST	2	1,80%
4	1	0,90%
8	1	0,90%
15	1	0,90%
17	1	0,90%
34	1	0,90%
Total	112	100,00%

Ref: Elaboración propia

Tabla 3. Porcentaje de aislamiento de *Streptococcus pneumoniae* según lugar de procedencia

Procedencia	Frecuencia	Porcentaje
La Paz	43	38,4%
Cochabamba	43	38,4%
Santa Cruz	26	23,2%
Total	112	100,00%

Ref: Elaboración propia

Tabla 4. Serotipos predominantes de *Streptococcus pneumoniae* según área geográfica

SEROTIPO	COCHABAMBA		LA PAZ		STA. CRUZ	
	n	%	n	%	n	%
1	2	50%	1	25%	1	25%
5	3	50%	1	17%	2	33%
6	10	48%	7	33%	4	19%
7	2	40%	3	60%	0	0 %
9	0	0 %	2	50%	2	50%
11	0	0 %	3	75%	1	25%
12	0	0 %	1	33%	2	67%
14	8	47%	3	18%	6	35%
18	1	20%	4	80%	0	0 %
19	12	60%	6	30%	2	10%
23	1	14%	3	43%	3	43%
24	0	0%	3	100%	0	0 %

Ref: Elaboración propia

Tabla 5. Porcentaje de aislamiento de *Streptococcus pneumoniae* según tipo de muestra

Muestra	Frecuencia	Porcentaje
LCR	59	52,70
Sangre	41	36,60%
Líquido pleural	12	10,70%
Total	112	100,00%

Ref. Elaboración propia

Tabla 6. Serotipos predominantes de *Streptococcus pneumoniae* según tipo de muestra

SEROTIPO	LCR		SANGRE		LIQ. PLEURAL	
	n	%	n	%	n	%
1	1	25%	2	50%	1	25%
5	2	33%	3	50%	1	13%
6	5	24%	14	67%	2	9%
7	3	60%	1	20%	1	20%
9	3	75%	1	25%	0	0 %
11	4	100%	0	0 %	0	0 %
12	3	100%	0	0 %	0	0 %
14	8	47%	5	29%	4	14%
18	4	75%	1	25%	0	0 %
19	8	40%	11	55%	1	5%
23	3	43%	2	28%	2	28%
24	2	67%	1	33%	0	0 %

Ref: Elaboración propia

Tabla 7. Porcentaje de aislamiento de *Streptococcus pneumoniae* según sexo

Sexo	Frecuencia	Porcentaje
Femenino	46	41,1%
Masculino	66	58,9%
Total	112	100,00%

Ref: Elaboración propia

Tabla 8. Serotipos predominantes de *Streptococcus pneumoniae* según sexo

SEROTIPO	FEMENINO		MASCULINO	
	n	%	n	%
1	2	50%	2	50%
5	2	33%	4	76%
6	11	52%	10	48%
7	1	25%	4	75%
9	3	75%	1	25%
11	1	25%	3	75%
12	2	67%	1	33%
14	7	41%	10	59%
18	4	80%	1	20%
19	4	20%	16	80%
23	3	43%	4	57%
24	1	33%	2	67%

Ref: Elaboración propia

Tabla 9. Porcentaje de aislamiento de *Streptococcus pneumoniae* según grupo etáreo

Edad en meses	Frecuencia	Porcentaje
0-24 meses	89	79,5%
25-60 meses	23	20,5%
Total	112	100,00%

Ref: Elaboración propia

Tabla 10. Serotipos predominantes de *Streptococcus pneumoniae* según grupo etáreo

SEROTIPO	0 – 24 meses		25 - 60 meses	
	n	%	n	%
1	2	50%	2	50%
5	6	100%	0	0 %
6	16	76%	5	24%
7	5	100%	0	0 %
9	4	100%	0	0 %
11	3	75%	1	25%
12	3	100%	0	0 %
14	15	88%	2	12%
18	5	100%	0	0 %
19	13	65%	7	35%
23	5	71%	2	29%
24	3	100%	0	0 %

Ref: Elaboración propia

Tabla 11. Porcentaje de aislamiento de *Streptococcus pneumoniae* según diagnóstico clínico

Cuadro clínico	Frecuencia	Porcentaje
Neumonía	46	41,1%
Meningitis	66	58,9%
Total	112	100,00%

Ref: Elaboración propia

Tabla 12. Serotipos predominantes de *Streptococcus pneumoniae* según diagnóstico clínico

SEROTIPO	MENINGITIS		NEUMONÍA	
	n	%	n	%
1	2	50%	2	50%
5	2	33%	4	67%
6	6	29%	15	71%
7	3	60%	2	40%
9	3	75%	1	25%
11	4	100%	0	0 %
12	3	100%	0	0 %
14	9	53%	8	47%
18	4	80%	1	20%
19	12	60%	8	40%
23	3	43%	4	57%
24	2	67%	1	33%

Ref: Elaboración propia

Tabla 13. Porcentaje de aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, según Hospitales Centinela de las ciudades de La Paz, Cochabamba y Santa Cruz

Institución	Frecuencia	Porcentaje
Hosp. Ovidio Aliaga	35	31.30%
Hosp. Albina Patiño	25	22.30%
Hosp. Manuel Ortiz Suárez	24	21.40%
Esc. Técnica de Salud	17	15.20%
Hosp. Obrero N° 1	5	4.50%
Hosp. San Gabriel	3	2.70%
Hosp. Universitario Japonés	2	1.80%
Hosp. Germán Urquidí	1	0.90%
Total	112	100.00%

Ref: Elaboración propia

Tabla 14. Serotipos predominantes de *Streptococcus pneumoniae* según promedio de edad

SEROTIPO	%	EDAD (meses)		Valor Mínimo Valor Máximo	FRECUENCIA
		X	SD		
1	3,6	32	32	(4 y 60)	4
5	5,4	11	8	(1 y 20)	6
6	18,8	19	18	(0,1 y 60)	21
7	4,5	6	6	(2 y 17)	5
9	3,6	11	6	(4 y 17)	4
11	3,6	16	14	(6 y 36)	4
12	2,7	4	3	(1 y 7)	3
14	15,2	18	12	(1 y 52)	17
18	4,5	10	5	(6 y 16)	5
19	17,9	23	20	(2 y 60)	20
23	6,3	23	22	(6 y 60)	7
24	2,7	10	7	(3 y 18)	3

Ref: Elaboración propia

