

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA EN BACTERIOLOGÍA CLINICA
SERVICIO DE LABORATORIOS DE DIAGNOSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD



**DETECCION FENOTIPICA DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A
MACROLIDOS EN CEPAS DE *Streptococcus pneumoniae* EN BOLIVIA EN
NIÑOS MENORES DE 5 AÑOS DURANTE EL PERIODO
DE JULIO DE 2000 A DICIEMBRE DE 2005**

ELABORADO POR:

LIC. ROXANA JANNETTE RODRIGUEZ GUTIERREZ

TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE ESPECIALIDAD

LA PAZ – BOLIVIA

2007

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA EN BACTERIOLOGÍA CLÍNICA
SERVICIO DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD



**DETECCION FENOTIPICA DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A
MACROLIDOS EN CEPAS DE *Streptococcus pneumoniae* EN BOLIVIA EN
NIÑOS MENORES DE 5 AÑOS DURANTE EL PERIODO DE
JULIO DE 2000 A DICIEMBRE DE 2005**

ELABORADO POR:

LIC. ROXANA JANNETTE RODRIGUEZ GUTIERREZ

**ASESORES: DRA .PATRICIA ROSALES
DRA. RAQUEL CALDERON
DR. CHRISTIAN TRIGOSO**

TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE ESPECIALIDAD

**LA PAZ – BOLIVIA
2007**

DEDICATORIA

A Dios:

*Porque por su gracia soy lo que soy, por ser
el fundamento y soporte espiritual de mi vida*

A mi Madre:

*Porque es el ser mas bello que Dios me ha
regalado, por su confianza, esfuerzo y
constante apoyo*

A mis Sobrinos:

*Estrellita y Samir por ser la alegría de la
Familia.*

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio Nacional de Referencia en Bacteriología Clínica (INLASA) donde me brindaron todo su apoyo e infraestructura desde el inicio hasta la culminación de este trabajo.

Al Instituto de Salud y Diagnóstico de Laboratorio (SELADIS) que me acogió durante la especialidad, especialmente al Laboratorio de Bacteriología Clínica quien me apoyo durante la realización del trabajo.

A mis Asesores:

Dra. Patricia Rosales por ser una profesional muy capacitada porque no solo fue mi asesora sino una amiga quien me apoyo en los momentos difíciles del trabajo ya que nunca escatimo esfuerzo, tiempo para corregirlo y mejorarlo.

Dra. Raquel Calderón quien me brindo su orientación para la realización del presente trabajo.

Dr. Cristian Trigoso por compartir su experiencia profesional y su confianza.

A mis Amigos:

- *Reconozco la sincera colaboración, enseñanza de Patricia Rosales y Sonia Jiménez*
- *Gladis T. y Jenny Z. por ser amigas incondicionales*
- *Lesli C. y Ruth C. por su ayuda desinteresada*

“El secreto de la felicidad no reside en hacer lo que a uno le gusta sino; en que a uno le guste lo que hace.”

TABLA DE CONTENIDO

	Página
I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- DISEÑO TEORICO	3
A. MARCO REFERENCIAL	3
1. Modelo Teórico.....	3
B. MARCO TEORICO	4
1. Historia.....	4
2. Morfología e identificación.....	4
2.1. Descripción del agente.....	4
2.1.1. Morfología.....	4
2.1.2. Condiciones de Cultivo.....	6
2.1.3. Condiciones atmosféricas.....	6
2.2. Componentes de superficie y Antigenicidad.....	6
a) Polisacárido capsular.....	7
b) Polisacárido de la pared celular.....	8
c) Antígeno de Forssman.....	9
d) Proteína A.....	10
e) Proteína M.....	10
2.3. Factores de Virulencia.....	11
2.3.1. Determinantes de Patogenicidad.....	12
a) Cápsula polisacárida.....	12
b) Pared Celular.....	13
c) Neumolisina.....	13
d) Neuraminidasa.....	14
2.3.2. Enzimas autolíticas.....	15
a) Autolisina.....	15
b) Proteasa de la Ig A.....	16
c) Hialorunidasa.....	17
d) Peróxido de Hidrógeno.....	17
2.3.3. Mecanismos de Patogenicidad.....	17
2.4. Defensas del Hospedero.....	18
2.5. Tratamiento.....	19
3. Resistencia Bacteriana.....	20
3.1. Resistencia Natural.....	21
3.2. Resistencia Adquirida.....	21

4. Mecanismo de Resistencia en <i>Streptococcus pneumoniae</i>	22
4.1. Resistencia a β -lactámicos.....	22
4.2. Resistencia a Macrólidos.....	22
4.3. Resistencia a Fluoroquinolonas.....	22
5 .Blanco de Ataque de los antimicrobianos.....	23
5.1. Antimicrobianos que afectan la biosíntesis de la pared.....	23
5.2. Antimicrobianos que afectan la biosíntesis de Ac nucleicos.....	23
5.3. Antimicrobianos que afectan la biosíntesis de las proteínas.....	23
5.3.1. Inhibición de la transcripción.....	23
5.3.2. Inhibición de la traducción.....	24
6. Clasificación de los macrólidos, lincosaminas y estreptograminas.....	24
6.1. Macrólidos.....	24
6.1.1. Propiedades Generales.....	24
6.1.2. Clasificación de los macrólidos.....	25
6.1.3. Estructura química.....	25
6.1.4. Mecanismo de Acción.....	26
6.1.5. Farmacocinética.....	28
6.1.6. Espectro de actividad antimicrobiana.....	28
6.1.7. Resistencia.....	29
a) Resistencia Intrínseca.....	29
b) Resistencia Adquirida.....	29
b1) Aparición de cambios estructurales del lugar de unión del macrólido al ribosoma.....	29
b2) Existencia de bombas de expulsión (Eflujo).....	34
b3) Mutaciones en los genes ribosómicos de ARN.....	35
6.2. Lincosaminas.....	35
6.2.1. Propiedades generales.....	35
6.2.2. Estructura química.....	36
6.2.3. Mecanismo de acción.....	36
6.2.4. Espectro de actividad antimicrobiana.....	37
6.2.5. Resistencia.....	37
6.3. Estreptograminas.....	37
6.3.1. Propiedades generales.....	37
6.3.2. Estructura química.....	38
6.3.3. Mecanismo de acción.....	38
6.3.4. Actividad antimicrobiana.....	38
6.3.5. Resistencia.....	39
7. Epidemiología.....	40

III. ANTECEDENTES	41
IV. JUSTIFICACIÓN	46
V. OBJETIVOS	47
A. OBJETIVO GENERAL	47
B. OBJETIVOS ESPECIFICOS	47
VI. DISEÑO METODOLOGICO	48
A. DETERMINACIÓN DE LA POBLACIÓN	48
B. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS	48
C. DISEÑO DE ESTUDIO	48
D. TAMAÑO DE LA MUESTRA	48
E. MATERIAL	49
F. METODOS Y PROCEDIMIENTOS	50
1. Población y Lugar.....	50
1.1.Población(Aislados Bacterianos).....	50
1.1.1. Instituciones Participantes.....	50
1.2. Lugar (Laboratorio de Referencia en Bacteriología).....	51
1.2.1. Descripción del ámbito de estudio.....	51
1.2.2. Periodo del levantamiento de la información.....	51
a) Tinción Gram.....	52
b)Prueba de la Catalasa.....	52
c)Prueba de la Optoquina.....	52
d) Prueba de la Solubilidad en bilis.....	53
e) Tamizaje de Oxacilina y Serotipificación.....	54
2. Almacenamiento.....	54
3.Recuperación de los aislados bacterianos.....	55
4.Pruebas de Susceptibilidad y resistencia.....	55
4.1. Control de Calidad.....	55
4.1.1. Control de Calidad del medio Mueller Hinton.....	55
4.1.2. Control de calidad de discos.....	56
4.2.Pruebas de difusión en Agar Bauer Kirby.....	56
4.2.1.Prueba del doble disco.....	58
4.2.2. Interpretación.....	59

VII. RESULTADOS	60
VIII. DISCUSION	68
IX. CONCLUSIONES	71
X. RECOMENDACIONES	73
XI. BIBLIOGRAFIA	74

ANEXOS

FOTOGRAFIAS

RESUMEN

El problema actualmente sobre la resistencia antibiótica en *Streptococcus pneumoniae*, la importancia en nuestro ámbito geográfico y las consecuencias sobre el tratamiento antibiótico de las infecciones neumocócicas fue el motivo del estudio.

Se han estudiado 100 cepas de *Streptococcus pneumoniae* cuyos aislamientos fueron recolectados de niños menores de 5 años que fueron enviados a la Unidad de patógenos Respiratorios del Laboratorio Nacional de Referencia en Bacteriología Clínica (INLASA) provenientes de la Red de Laboratorios de Bacteriología Clínica de Bolivia así como de algunos Laboratorios privados durante el periodo de Julio 2000 a Diciembre 2005. El estudio fue de tipo descriptivo de Corte Transversal.

La búsqueda de los fenotipos de resistencia a macrólidos fue detectado por la prueba del Doble Disco de Susceptibilidad y Resistencia, donde se observó que el 83% de las cepas no presentaban ningún fenotipo de resistencia, sin embargo el 17% si presentaban alguno de los fenotipos.

El predominio de *Streptococcus pneumoniae* macrolido resistentes fue del 17%(17) de los cuales 65% (11) eran resistentes a Eritromicina y sensibles a Clindamicina asignados como fenotipo M (Mecanismos de Resistencia por Eflujo) y 35%(6) eran resistentes a Eritromicina y Clindamicina asignados como fenotipo MLSB de Tipo Constitutivo (Mecanismo de Resistencia por Metilasas) en ninguno de los casos se observo el fenotipo MLSB de tipo inducido

Los resultados revelan que del total de los aislamientos que presentan los mecanismos de resistencia a macrólidos 41%(7) proceden de Hemocultivos y 35% (6) de Líquido Cefalorraquídeo y 24%(4) de otras fuentes de aislamiento. El 53%(9) tienen como diagnóstico Neumonía, 35%(6) Meningitis y 12%(2) otros diagnósticos. La mayoría de los aislamientos con la Resistencia procedían de niños menores de 1 año con un 53%(9).

Por otro lado se observa que no existe dependencia entre el tamizaje de oxacilina y mecanismos de resistencia a macrólidos ya que los resultados muestran un mayor porcentaje para SP 65%(11). En cuanto a la Serotipificación cabe señalar que los serotipos que predominan en el estudio fueron el 14 con 29.4%(5) y 19F con un 23.4%(4) esto coincide con los datos de orden de frecuencia de los Serotipos de Bolivia.

El nivel de resistencia encontrado en el estudio es de bajo nivel ubicando así a nuestro país entre aquellos con baja resistencia a macrólidos comparado con otros países a nivel mundial.

SUMMARY

Actually the problem of the antibiotic resistance at the moment in *Streptococcus pneumoniae*, the importance thing in our geographic scope and of the consequences on the antibiotic treatment of the pneumococcal infections was the purpose about this present study.

Have been studied 100 *Streptococcus pneumoniae* 's strain, it was collected children 's under five years old, it was sent at Respiratory pathogens Area of the National Laboratory of Reference in Bacteriology Clinical (INLASA); it 's originating of the Network of Laboratories of Clinical Bacteriology of Bolivia as well as of some Private Laboratories among the period of Julio 2000 to December 2005. The study was of descriptive type of Cross sectional.

The search of the resistance 's macrólidos phenotypes was detect by the of Susceptibility and Resistance 's Double Disc test. The result was 83% of the strains didn't have resistance 's phenotype; other 17% expressed some phenotype of resistance.

Streptococcus pneumoniae 's macrólidos resistant predominance was 17%(17) of which 65% (11) was Erythromycin resistant and Clindamicyn sensible assigned as phenotype M (mechanisms of Resistance by Eflujo) and 35%(6) was Erythromycin and Clindamicyn resistant to assigned phenotype MLS-B of Constitutive Type (Mechanism of Resistance by Metiladas) didn't observe phenotype MLSB of induced type.

About the results was observed that of the total of the strains with macrólidos mechanisms of resistance, 41 % (7) come from Hemocultivos, 35% (6) come from Cefalorraquídeo Fluid and 24 % (4) other source of isolation. 53% (9) had Neumonía 's diagnosis, 35 % (6) Meningitis and 12 % (2) other diagnoses. Most of the strains with 53 % (9) came from younger children under five years old.

Was observed that it doesn't exist dependency between Oxacilina Test and Macrólido 's resistance 's mechanisms because the results showed a greater percentage for SP 65% (11).About predominate serotype, 14 with 29.4%(5) and 19F with 23.4%(4) the most important, agree with database of frequency of Bolivia 's Serotypes .

The level of resistance found in the study is of low level thus locating to our country between those with low resistance to macrólidos at compared world -wide level with other countries.

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones de las vías respiratorias son una causa habitual de consulta médica, siendo bien conocido que alrededor del 60% están producidas por virus. Sin embargo en una proporción considerable de casos, dichas infecciones obedecen a una etiología bacteriana, especialmente por *Streptococcus pneumoniae* y en menor medida por *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* u otros patógenos. *Streptococcus pneumoniae* es un comensal común en el tracto respiratorio superior humano aislándose en un 5 -70% de la población adulta sana. El estado de portador sano varía con la edad, ambiente y época del año, la tasa de portadores es inferior en adultos que viven sin niños en el hogar. Este porcentaje es mucho mas alto durante los meses de invierno, en los niños (30 -40%) que en los adultos (10-20%) y en comunidades cerradas (50-60%) que en la población general humana (27%).¹

Streptococcus pneumoniae se ubica dentro de las principales prioridades como problema de salud pública tanto los países industrializados como aquellos menos desarrollados. Es responsable de elevada morbilidad y letalidad ya que es uno de los principales agentes causales de una gran variedad de cuadros clínicos, infecciones benignas que afectan al tracto respiratorio superior como la otitis media y sinusitis agudas, e infecciones severas como septicemia, meningitis debido a la entrada directa de los microorganismos a través de una fístula que comunique la nasofaringe con el espacio meníngeo y por otro lado la neumonía. La neumonía, como síndrome es responsable de la muerte de aproximadamente 4 millones de niños bajo 5 años de edad y de un número similar de adultos sobre 60 años en el mundo, la mayoría de estas muertes son atribuibles a *S. pneumoniae* como agente único o asociado a virus respiratorios. Según datos aportados por el BID, en Latinoamérica se producen cada año 9.000 casos de meningitis bacteriana aguda (MBA), con un 10% de letalidad promedio y 30% de secuelas. Actualmente, *S. pneumoniae* es la segunda causa de MBA en Chile, responsable del 15,2% de los casos, después de *Neisseria meningitidis* que se asocia al 48,6%. *Haemophilus influenzae* tipo b ha disminuido en forma importante su incidencia (inferior al 5% en 1999) como consecuencia de la incorporación de la vacuna conjugada anti *Hib* en el PAI en julio de 1996. (Díaz JM et al).¹

¹ Camponovo Rossana C. Problemas de resistencia en *Streptococcus pneumoniae*

Con el paso del tiempo el impacto de las infecciones por *S. pneumoniae* se ha acentuado. En las últimas dos décadas se ha producido un cambio en la epidemiología de las infecciones por este agente, con un aumento real de la incidencia, especialmente de infecciones sistémicas como meningitis, en países menos privilegiados. Otro aspecto nuevo que destacar es la aparición de brotes de infecciones invasoras por *S. pneumoniae* en algunas comunidades cerradas como guarderías y jardines infantiles.²

Ahora bien la Penicilina durante mucho tiempo constituía el tratamiento de elección a infecciones causadas por *S. pneumoniae* ya que hasta hace poco más de 10 años atrás permaneció susceptible, cuando comenzó a observarse con fuerza creciente el incremento en su resistencia por lo que los Macrólidos llegaron a constituir una alternativa en el tratamiento de neumococos por lo tanto, para su uso se debe tener conocimiento de la existencia o no de resistencia frente a este grupo de antimicrobianos y su fenotipos asociados.

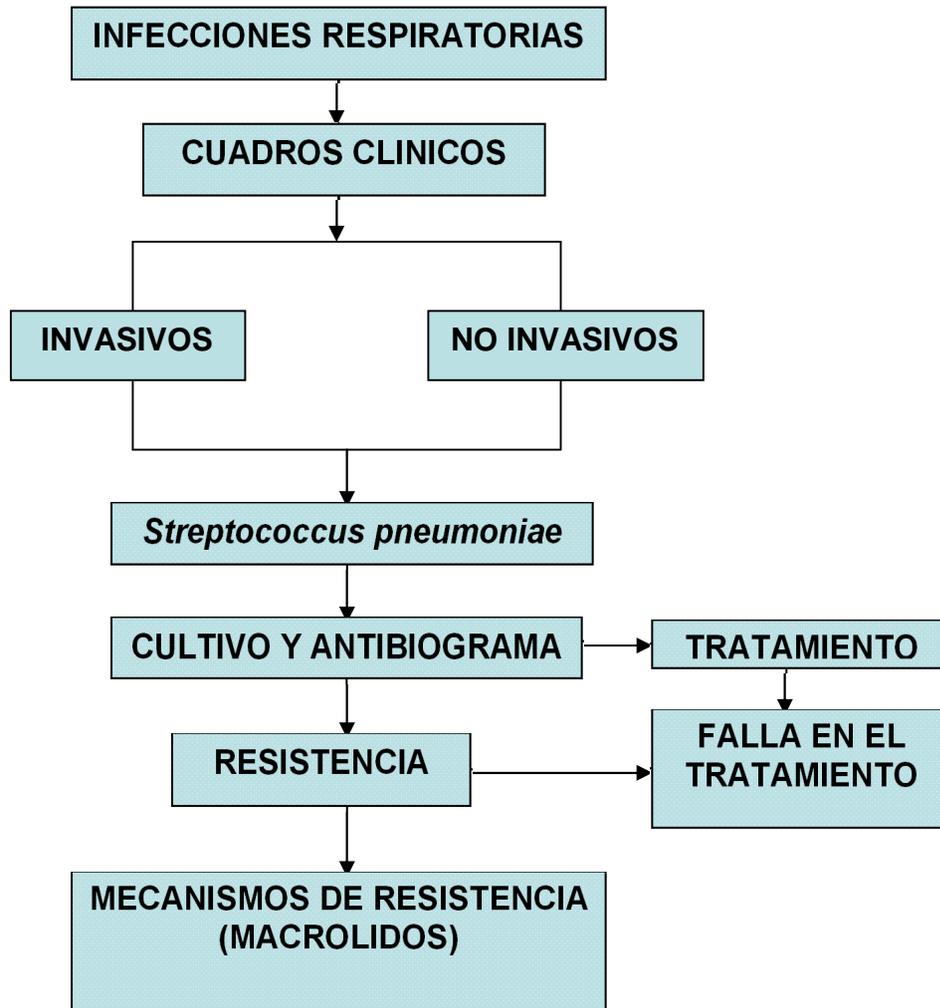
Por lo tanto es importante realizar este trabajo ya que se debe tener en consideración la resistencia y los patrones de resistencia en las diferentes áreas geográficas de Bolivia ya que el desarrollo de la resistencia antibiótica de *Streptococcus pneumoniae* es un hecho en todo el mundo y se debe tener consideraciones cuando se elija un tratamiento antibiótico en un paciente determinado, a su vez el incremento de dicha resistencia se ha correlacionado con un uso excesivo de antimicrobianos.

² Seral Cristina Seral. Distribution of resistance genes *tet(M)*, *aph3* -III, *catpC194* and the integrase gene of Tn 1545 in clinical *Streptococcus pneumoniae* harbouring *erm(B)* and *mef(A)* genes in Spain.

II. DISEÑO TEORICO

MARCO REFERENCIAL

Modelo Teórico



Streptococcus pneumoniae es capaz de producir diferentes cuadros clínicos que afectan al tracto respiratorio superior, como la otitis media, mastoiditis y sinusitis ó el tracto respiratorio inferior como la neumonía. Entre los cuadros clínicos extrarespiratorios destaca la meningitis que puede ser debida a la entrada directa de los microorganismos a través de una fístula que comunique la nasofaringe con el espacio meníngeo ó bien puede ser una complicación de la neumonía bacteriana, sinusitis o endocarditis.

En los ultimo años se han producido cambios importantes en la epidemiología de la infección neumocócica, por lo tanto para realizar el tratamiento antimicrobiano y evitar la falla en el tratamiento se debe tener en consideración diferentes factores tales como la resistencia y los patrones de resistencia del área geográfica, así como otros factores tales como la alergia a los medicamentos.

MARCO TEORICO

1. Historia

Inicialmente *S. pneumoniae* fue denominado "microbio septicémico de la saliva" por Pasteur y *Micrococcus pasteurii* por Sternberg en 1881, año en el cual ambos investigadores lo aislaron por primera vez. En 1886, este microorganismo fue denominado neumococo por Fraenkel debido a que causaba enfermedad pulmonar. Posteriormente, según sugerencia de Weichselbaum (1886), en 1920, fue denominado *Diplococcus pneumoniae* debido a su morfología, En 1974, en la octava edición del Manual de Bacteriología de Bergey, el neumococo fue denominado *Streptococcus pneumoniae* (Chester 1901), denominación aún vigente.³

2. Morfología e Identificación

2.1. Descripción del agente

Streptococcus pneumoniae pertenece al género *Streptococcus* de la familia *Streptococcaceae*. El género *Streptococcus* está conformado por cocos Gram positivos, anaerobios facultativos, catalasa negativa y citocromo -oxidasa negativa. Los estreptococos clínicamente relevantes son homofermentadores y el producto final de la fermentación de la glucosa es el ácido láctico.³

2.1.1. Morfología macroscópica y microscópica. Condiciones de cultivo

Streptococcus pneumoniae es una de las especies del género *Streptococcus* perteneciente a la familia *Streptococcaceae*. Es el agente etiológico más común de las neumonías bacterianas y la segunda causa de meningitis en los Estados Unidos.

S. pneumoniae es un diplococo Gram positivo, encapsulado, lanceolado, que frecuentemente se presenta en cadenas rectas y cortas.

³ Organización Panamericana de la Salud. Programa Especial para vacunas e Inmunización (Sireva). Manual de *Streptococcus pneumoniae*.2002

Presenta un crecimiento difuso en los caldos, y en agar tiene el aspecto de colonias pequeñas, grisáceas y mucoides (acuosas), rodeadas de una zona verde de - hemólisis parcial (hemólisis) en el agar sangre ovina al 5% (ver preparación en el anexo 1).

Una lupa o un microscopio (30X-50X) es útil para diferenciar morfológicamente a las colonias de neumococos de las de *Streptococcus viridans*, que también producen una zona verde de hemólisis en el agar sangre ovina a 5%. El cultivo en agar sangre ovina, presenta colonias lisas, pequeñas, brillantes, circundadas por un halo verde de hemólisis. Son anaerobios facultativos y algunos aislamientos clínicos son exigentes en CO₂. El neumococo pierde su viabilidad a 60° C por 30 minutos, se lisa fácilmente, es soluble en bilis desoxicolato 10%, sensible a la optoquina (clorhidrato de etilhidrocupreina) y muchos serotipos son virulentos para el ratón. Puede perder su característica de Gram-positivo después de la fase logarítmica.³

Las colonias de *S. pneumoniae* en medio de cultivo sólido, exhiben una zona de depresión central causada por una autólisis parcial. Con el envejecimiento del cultivo, ocurre una pérdida de la viabilidad de estas bacterias cuando crecen en ausencia de catalasa y peroxidasa, debido a la acumulación de peróxido de hidrógeno.³

Las colonias jóvenes de neumococos son abultadas, como las de *S. viridans*, pero después de 24 a 48 horas de cultivo, las colonias se achatan y puede formarse una depresión en el centro de cada una de ellas (apariencia umbilicada), esto no ocurre con *S. viridans*. El aspecto mucoso de *S. pneumoniae* dependerá de cuán fresco sea el medio y de la atmósfera de incubación. Cuanto más fresco sea el medio, más mucoides parecerán los cultivos. Algunos serotipos como el 3 tienen un aspecto muy mucoso.

³ Organización Panamericana de la Salud. Programa Especial para vacunas e Inmunización (Sireva). Manual de *Streptococcus pneumoniae*.2002

2.1.2. Condiciones de cultivo

S. pneumoniae es un microorganismo difícil de cultivar (fastidioso), por lo que requiere medios enriquecidos para su aislamiento primario; tales como agar tripticasa soya o agar infusión cerebro corazón, enriquecidos con 5% de sangre ovina desfibrinada, sangre de caballo o sangre de conejo. Para obtener una recuperación adecuada de *S. pneumoniae* se requiere que los medios utilizados para tal fin contengan aminoácidos, péptidos, purinas, pirimidinas y vitaminas, suplementos que generalmente se encuentran en las bases comerciales que contienen extracto de carne.

Para un óptimo crecimiento de *S. pneumoniae* en medios líquidos, es importante que los medios utilizados sean caldos suplementados con carbohidratos fermentables.

Existen numerosas bases comerciales que pueden ser usadas para preparar los medios enriquecidos con sangre, las más conocidas son: Columbia, tripticasa soya y Todd Hewitt. Paralelamente existen caldos de cultivo que favorecen la buena recuperación de *S. pneumoniae*, como el caldo Todd Hewitt, la infusión cerebro corazón y el caldo enriquecido de tioglicolato.³

2.1.3. Condiciones atmosféricas

S. pneumoniae es anaerobio facultativo; La mayoría de los aislamientos presentan un crecimiento relativamente bueno, pero ocasionalmente se observan colonias pequeñas. Algunos aislamientos son dependientes de CO₂ (5-7 %), atmósfera que favorece el crecimiento. Cuando se cultiva en forma aeróbica *S. pneumoniae* acumula gran cantidad de H₂O₂. El rango de temperatura a la cual se debe incubar *S. pneumoniae* es de 30 -36° C.

2.2. Componentes de la superficie de *S. pneumoniae* y antigenicidad.

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

³ Organización Panamericana de la Salud. Programa Especial para vacunas e Inmunización (Sireva). Manual de *Streptococcus pneumoniae*. 2002

La pared celular consiste de un esqueleto de péptido -glucano, típico de las bacterias Gram positivas. En este esqueleto se anclan el polisacárido capsular, el polisacárido C de la pared celular y las proteínas.

a) Polisacárido capsular

Los neumococos presentan Antígenos capsulares donde la cápsula neumocócica esta constituida por polisacáridos complejos que forman geles hidrófilos sobre la superficie de los microorganismos. Estos polisacáridos son antigénicos y representan la base para la separación de los neumococos en diferentes serotipos.⁴

El polisacárido capsular es un determinante esencial para la antigenicidad del neumococo y todo el sistema de la clasificación en serotipos se basa en su diversidad antigénica, es el responsable de la diferenciación de ésta única especie en 90 serotipos.

El PS fue descrito como el primer antígeno, no proteico, inductor de anticuerpos en humanos. La cápsula se sintetiza rápida y extensivamente durante la fase logarítmica del crecimiento bacteriano y el antígeno PS puede ser detectado en el suero y orina de pacientes con enfermedad neumocócica.

Los estudios de la estructura química de éste antígeno revelan que la mayoría de los tipos poseen una cápsula cargada negativamente (excepto 7, 14 que son neutros) y poseen componentes ácidos como el ácido glucurónico (en los tipos 1, 2, 3, 5, 8, 9A Y 9V) o fosfato en enlaces fosfodiéster (en los tipos 6A, 6B, 11A, 15F, 19F, 19A Y 23F). Los estudios inmunológicos demuestran que el antígeno PS, es independiente y puede interactuar directamente con las células T para la producción de anticuerpos.

La cápsula consiste en polímeros de alto peso molecular conformados por unidades repetitivas de oligosacáridos, ligados por enlaces covalentes a la pared celular. El polisacárido se denomina sustancia soluble específica (soluble specific substance, SSS). La cápsula es considerada el principal factor de virulencia de esta bacteria, debido a su resistencia a la fagocitosis.

⁴ Joklik K. Wolfgang; Willette P. Hilda. Microbiología de Zinsser.

b) Polisacárido de la pared celular.

El polisacárido C es el carbohidrato específico de especie, que es componente estructural principal de la pared celular de todos los neumococos, está distribuido de manera uniforme por fuera y por dentro de la pared. Es un polímero de ácido teicoico que contiene fosfocolina como principal determinante antigénico. La fosfocolina es responsable de la aglutinación de los neumococos o por ciertas proteínas de mieloma y por la interacción de polisacárido C con una beta-globulina sérica en presencia de calcio. Esta beta globulina sérica, conocida como proteína C reactiva (PCR) no es un anticuerpo sino una proteína que se encuentra presente en bajas concentraciones en la sangre normal pero que esta elevada en los pacientes con enfermedades inflamatorias agudas. Además de la fosfocolina el polisacárido C contiene galactosamina, glucosa, fosfato, ribitol y una tridesoxidiaminohexosa. La estructura completa de la unidad que se repite ha sido elucidada y se ha demostrado que es idéntica en el polisacárido C derivado de varios tipos de neumococos.⁴

El polisacárido de la pared bacteriana, denominado también polisacárido C (C-PS) es un complejo de ribitol de ácido teicoico sustituido con colina llamada sustancia C, principal componente de la pared celular del neumococo. Está ligado covalentemente al péptido-glucano a través de residuos de ácido murámico. , esta es mejor conocida por su capacidad para combinarse con una globulina beta inespecífica que aparece en el suero durante ciertas infecciones. La cantidad de éste antígeno varía de cepa a cepa, pero es igual en casi todos los tipos del neumococo (antígeno común).

⁴ Joklik K. Wolfgang; Willete P. Hilda. Microbiología de Zinsser.

El C-PS puede activar el sistema del complemento por la vía alterna. Estudios de protección realizados en ratones, con anticuerpos policlonales y monoclonales anti-C-PS, han demostrado que los anticuerpos son protectores contra dosis letales, para determinados serotipos. Pero, los anticuerpos anti-C-PS presentes naturalmente no son 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.

c) Antígeno de Forssman.

Está formado de ácido lipoteicoico y ácido teicoico, similar al polisacárido C de la pared celular y está ligado covalentemente a lípidos. El antígeno de Forssman se encuentra uniformemente distribuido en la membrana plasmática y también está localizado en las moléculas de C-PS expuestas en la superficie. Las partes lipídicas de este antígeno están ancladas en la doble capa de lípidos de la membrana plasmática del neumococo.

La presencia de este antígeno inhibe fuertemente la autolisina neumocócica y también regula la actividad de la enzima mureína hidrolasa, que tiene actividad en la lisis bacteriana. Todos los neumococos son susceptibles a la lisis, durante la fase estacionaria del crecimiento y es durante esta fase que el antígeno Forssman es excretado. La pérdida de éste antígeno regulador resulta en la degradación de la pared celular bacteriana. Los estudios de inmunización de ratones con este antígeno no han demostrado protección contra la infección neumocócica.

Empero a diferencia del antígeno C esta distribuido de manera uniforme en la superficie externa de la membrana celular. El antígeno F es un potente inhibidor de la N-acetilmuramyl-L alanina amidasa, lo que sugiere un papel fisiológico específico, para los ácidos lipoteicoicos en la regulación in vivo de la actividad de peptidoglucano hidrolasa en el microorganismos.⁴

⁴Joklik K. Wolfgang; Willete P. Hilda. Microbiología de Zinsser.

d) 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 ser 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, la inmunización 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

e) Proteína M

Es una proteína tipo específico que inmunológicamente es independiente de los polisacáridos capsulares.

No se ha demostrado ninguna correlación entre la presencia de un tipo específico de proteína M y el tipo de microorganismo sobre la base del polisacárido capsular. Los anticuerpos contra la proteína M no son protectores.⁴

⁴Joklik K. Wolfgang; Willete P. Hilda. Microbiología de Zinsser.

2.3. Factores de virulencia

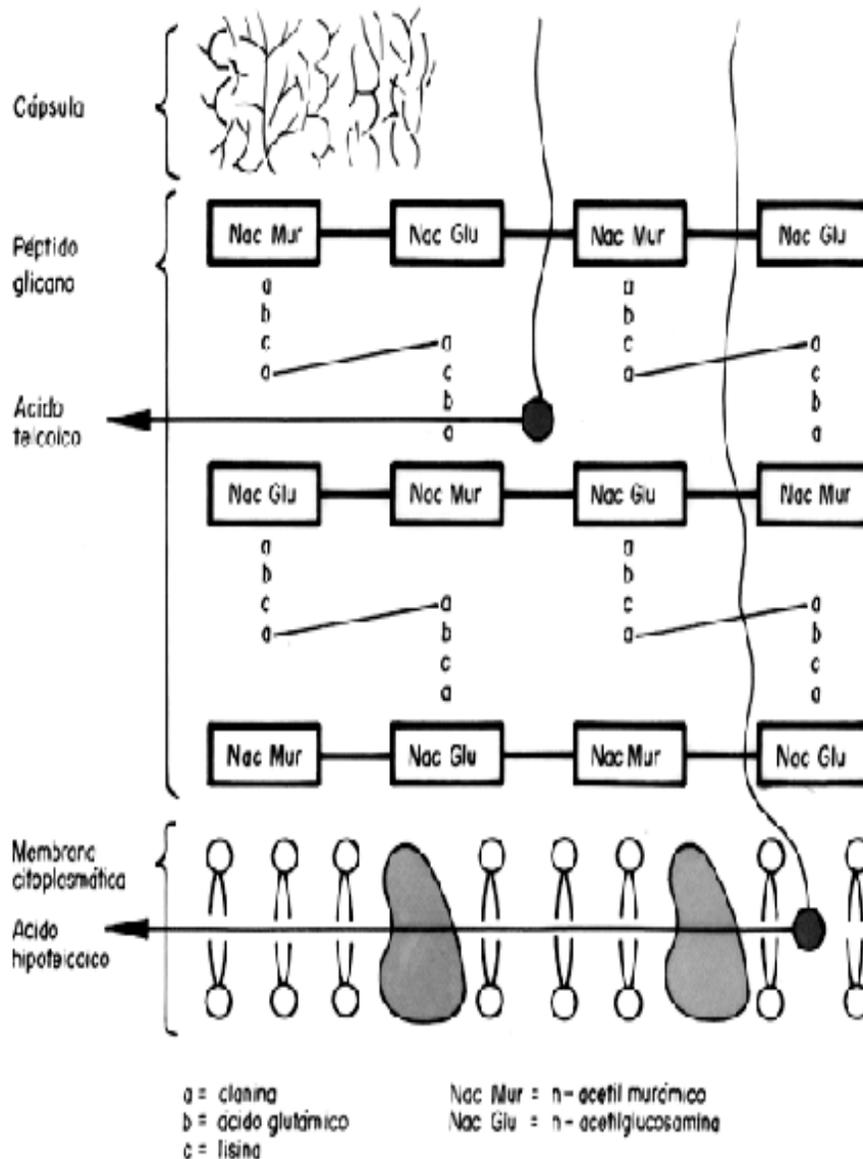


Figura 1. Estructura de la pared celular de *S. pneumoniae*.

Factores de virulencia
www.scielo.cl/fbpe/img/rci/v18s1/fig01.gif

La virulencia del neumococo ha sido atribuida a sus diferentes estructuras, principalmente a las de la superficie. Algunos de los factores de virulencia tales como la cápsula y las proteínas de superficie determinan la resistencia a la fagocitosis por los polimorfonucleares, lo que permite un mecanismo de escape eficiente de las defensas del hospedero. Otros factores de virulencia como la pared celular y la neumolisina están involucrados en la inflamación causada por la infección.

El proceso inflamatorio del hospedero es el responsable de la mayoría de los síntomas de la enfermedad neumocócica, por lo tanto, los factores inflamatorios bacterianos son los directos responsables por la mortalidad causada por el neumococo invasor.

2.3.1. Determinantes de patogenicidad

a) Cápsula polisacáridica.

La virulencia y la invasividad del neumococo varían de acuerdo con los serotipos y depende de la composición química y de la cantidad de polisacárido capsular producido. Estas diferencias determinan la supervivencia de la bacteria en la circulación y las posibilidades de ocasionar enfermedad invasora, relacionada con la activación del complemento y su depósito en la cápsula, resistencia a la fagocitosis y capacidad para inducir anticuerpos. Como 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 un polímero de glucosa y ácido glucurónico, es considerado como uno de los serotipos más virulentos y con alta capacidad invasora. El serotipo 37, a pesar de poseer una cápsula compuesta de homopolímeros de glucosa, se asocia rara vez con enfermedad. Otros experimentos de desafío en animales, con el empleo de cepas capsulares mutantes del mismo serotipo, han exhibido una virulencia proporcional a la cantidad de material capsular producido.

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 PS purificado 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.

b) Pared celular

Los ácidos teicoicos y los fragmentos de peptidoglucano de la pared celular son los que causan la inflamación. 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 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

Un aspecto fundamental en el proceso inflamatorio es la lisis bacteriana debida a los antibióticos beta lactámicos los que liberan grandes cantidades de fragmentos de pared celular, produciendo un daño irreversible en el paciente y en ocasiones la muerte.

c) Neumolisina.

Pneumolisina (o neumolisina). Desde el punto de vista fisiológico puede considerarse una toxina, ya que destruye la membrana de los glóbulos rojos y es la responsable de la hemólisis que se observa cuando se cultiva *S. pneumoniae* en medios con sangre y en ambiente de anaerobiosis. La pneumolisina se relaciona inmunológicamente con la estreptolisina O producida por los estreptococos β -hemolíticos del grupo A. En infecciones experimentales en conejos produce anemia hemolítica y necrosis alveolar, pero no está bien definido su rol patogénico en las infecciones humanas.

Es una hemolisina sensible a la temperatura y el O_2 relacionado desde el punto de vista inmunológico con la estreptolisina O. Se considera a la neumolisina responsable de la hemólisis observada cuando se encuentra a *Streptococcus pneumoniae* en anaerobiosis.

Es una citotoxina de gran importancia para la virulencia del neumococo. Es una proteína intracelular, la cual no se secreta y solamente se libera cuando ocurre lisis bacteriana. Su peso es de 52,8 kDa y la secuencia de aminoácidos es homóloga a las hemolisinas producidas por *S. pyogenes* y *Listeria monocytogenes*.

Esta proteína está involucrada en el mecanismo de escape de la bacteria contra la respuesta inmune del hospedero. Esta toxina se une al colesterol de la membrana de la célula eucariótica a la que destruye a través de la formación de poros.

Estudios en ratones han demostrado que cepas mutantes deficientes en la producción de neumolisina, tienen menor virulencia. En humanos, el título de anticuerpos contra la neumolisina aumenta en pacientes con neumonía, lo que indica que esta proteína es producida por la bacteria cuando se multiplica en el hospedero. Otros estudios en el mismo tipo de animal, han demostrado que la neumolisina, en forma inactiva, produce anticuerpos protectores. Por lo tanto, esta proteína, en forma conjugada con el polisacárido capsular, podría incrementar la eficacia de una vacuna.

d) Neuraminidasa.

Neuraminidasa. Es una enzima capaz de hidrolizar las glucoproteínas y los glucolípidos celulares y por lo tanto tendría un papel importante para ayudar a la diseminación y multiplicación de *S. pneumoniae* en los tejidos infectados. Disminuye la viscosidad del mucus que reviste el epitelio respiratorio y altera la estructura de los oligosacáridos, exponiendo los receptores y facilitando la colonización.¹

Es una proteína de 107 Kda y está asociada con la pared celular, causa daño en el hospedero separando el ácido siálico terminal de las glicoproteínas, glicolípidos y oligosacáridos presentes en la superficie de las células y en fluidos corporales. Esta separación facilitaría la adhesión de la bacteria a las células epiteliales del hospedero.

Los modelos de inmunización activa con la neuraminidasa purificada han demostrado un aumento en la supervivencia de los ratones después de la infección con el neumococo, lo cual sugiere una contribución de ésta proteína con la patogenicidad del neumococo.

¹ Camponovo Rossana C. Problemas de resistencia en *Streptococcus pneumoniae*. Rev. Chil. Infectol. 2002

Facilita el acceso neumocócico a los pulmones mediante el adelgazamiento de las secreciones mucinosas. Activa contra glucoproteína y glucopeptidos celulares y puede desempeñar un papel de diseminación del neumococo por los tejidos infectados.⁵

2.3.2. Enzimas autolíticas.

Estas enzimas están relacionadas con el proceso de división bacteriana (separación de las células hijas) y de la transformación genética; parecen estar relacionadas con funciones biológicas básicas del neumococo. Están localizadas en la membrana celular. En la forma inactiva se unen al ácido lipoteicoico y a través de éste a la membrana de la bacteria.

La principal enzima autolítica es la N-acetil-murámico-alanina amidasa (autolisina), la cual rompe la unión entre el ácido murámico y la alanina del mucopéptido de la pared celular, durante la fase estacionaria del crecimiento de la bacteria. La lisis del neumococo por sales biliares ocurre a través de la activación de ésta enzima.

En modelos animales, las mutantes autolisina negativas han demostrado ser menos virulentas que las cepas silvestres y la inmunización activa de ratones con esta proteína ha conferido protección contra la infección.

Recientemente, se ha demostrado que la autolisina es activada por la lisozima humana, factor de defensa del hospedero, que es liberada durante la infección y la inflamación, e induce así la lisis del neumococo, lo que aumenta el proceso inflamatorio

Proteínas de superficie pspA y psaA. Estas proteínas podrían participar en la adherencia inicial a la célula blanco.

a) Autolisina. Denominada también amidasa, es una enzima que hidroliza la capa de peptidoglicano en un sitio específico: entre el ácido N-acetil murámico y el residuo alanina del puente peptídico. La actividad de la amidasa depende de la presencia de fosfato de colina en el ácido teicoico de la pared celular. La actividad de la amidasa en presencia de

⁵ Stuart Walker. Microbiología. 1ªed. México: Mc Graw. Hill Interamericana S.A

colina permite la división celular; si bien esta es una función básica de la bacteria, no está claro el papel de la autolisina en la virulencia bacteriana. ¹

Las amidasas ó autolisinas neumocócicas hidrolizan la capa de péptido glicano a nivel del ácido N-acetil murámico y el residuo de alanina del puente peptídico.

La actividad de la amidasa neumocócica se observa en cultivos más antiguos cuando el crecimiento prolongado sobre el Agar da lugar a la lisis de las bacterias en el centro de la colonia. Esto confiere la apariencia de donas a las colonias mas antiguas.

La solubilidad en bilis se debe a la activación de una amidasa en bilis que rompe el enlace entre la alanina y el ácido murámico en el peptidoglucano neumocócico. ⁵

b) Proteasa de la Inmunoglobulina A.

Proteasa para IgA. Las cepas de *S. pneumoniae* producen una proteasa que hidroliza e inactiva la inmunoglobulina A1 presente en las mucosas, lo que facilitaría su adherencia y colonización inicial. Es interesante considerar que estas IgA proteasas son producidas también por otras bacterias capaces de producir infecciones invasoras severas como *H. influenzae* tipo b y *N. meningitidis*. ⁵

Las proteasas de la Ig A son enzimas extracelulares presentes en bacterias, como *S. pneumoniae*, que causan infección en las mucosas de humanos. Estas proteínas son excretadas en el medio de cultivo, principalmente al inicio de la fase logarítmica de crecimiento.

La IgA proteasa rompe la unión prolil-treonil de la molécula de IgA, en los fragmentos Fab y Fc así impide el bloqueo de la adherencia por la IgA secretora. La función de ésta proteasa en la patogénesis de las infecciones neumocócicas no está todavía bien determinada.

¹ Camponovo Rossana C. Problemas de resistencia en *Streptococcus pneumoniae*. Rev. Chil. Infectol.2002

⁵ Stuart Walker. Microbiología .1ªed.México: Mc Graw. Hill Interamericana S.A

c) Hialorunidasa

Aproximadamente 99% de los aislamientos clínicos producen esta enzima, que cliva el ácido hialurónico, componente del tejido conectivo o del hospedero. Es secretado activamente en el medio de cultivo durante la fase logarítmica del crecimiento bacteriano.

d) Peróxido de hidrógeno

Estudios recientes, en animales, han sugerido la acción tóxica oxidante del peróxido de hidrógeno producido por el neumococo, en las células epiteliales del hospedero.

2.3.3. Mecanismos de Patogenicidad

La infección neumocócica en el hombre se manifiesta de varias maneras. Puede variar desde el estado de portador, sin infección del tracto respiratorio, a un cuadro invasivo de neumonía, meningitis, endocarditis, bacteriemia o a infecciones purulentas como otitis media y conjuntivitis entre otras. La bacteriemia puede ocurrir en asociación con una faringitis hasta una septicemia fulminante con púrpura y hemorragia de las adrenales (síndrome de Waterhouse-Friderichsen). La meningitis neumocócica es la complicación más común de una sinusitis, mastoiditis, otitis o neumonía.

S. pneumoniae es un habitante normal de la nasofaringe humana; su número es limitado por la competencia con otros microorganismos de la nasofaringe e igualmente por los mecanismos de defensa específicos del hospedero. La enfermedad generalmente se asocia con la adquisición de una nueva cepa, seguida por la alteración de la microbiota y no depende de un estado de portador prolongado. Por lo tanto, el estado inmune del hospedero en el momento de la colonización, así como la virulencia de la nueva cepa adquirida determinarán si el neumococo lo invadirá o no. El daño de la mucosa de la nasofaringe debido a una infección viral, bronquitis asmática o al humo, alcohol u otras drogas, predispone a la infección neumocócica y aumenta la colonización bacteriana debido a una mayor exposición de receptores del hospedero a la adherencia del neumococo.

El mecanismo por el cual el neumococo migra de la nasofaringe a los pulmones o a la circulación es poco conocido. Se sabe que después de la colonización, el microorganismo debe superar los mecanismos de defensa específicos para poder invadir. El efecto tóxico de la neuraminidasa y del peróxido de hidrógeno y la acción de la IgA proteasa puede tener importancia en esta fase de la infección, y puede aumentar la probabilidad de que la bacteria alcance directamente el torrente circulatorio o la trompa de Eustaquio.

En 15 a 30% de los pacientes con una infección neumocócica la bacteria alcanza el torrente circulatorio; donde sobrevive protegido por la cápsula que impide la fagocitosis. En el caso en que la bacteria alcance el pulmón, por esa otra vía encuentra una nueva línea de defensa que son los macrófagos alveolares. Nuevamente la cápsula le permite sobrevivir. Es la respuesta inflamatoria la que causa daño en los tejidos pulmonares y puede resultar en una alteración de los mecanismos de intercambio de gases, lo que puede llevar a cuadros de insuficiencia respiratoria.

La meningitis ocurre cuando la bacteria infecta las meninges, produciendo una inflamación local que altera la barrera hemato-encefálica. Cuadros sobreagudos pueden llevar a la muerte en pocas horas o evolucionar favorablemente pero con secuelas (sordera, ceguera, parálisis, etc.).

2.4. Defensas del hospedero.

La inmunidad humoral tiene importancia en la resistencia adquirida contra el neumococo. La cápsula polisacáridica es inmunogénica, e induce anticuerpos protectores tipo específico T-independientes.

Los anticuerpos anti-PS promueven la opsonización de la bacteria. Los microorganismos también pueden ser opsonizados por la activación de la vía clásica o de la vía alternativa del complemento. Las bacterias opsonizadas son rápidamente ingeridas por los fagocitos y eliminadas. Los polisacáridos son reconocidos por mecanismos independientes de las células T, por lo tanto, ellos no estimulan anticuerpos de alto nivel de afinidad, particularmente en niños menores de 2 años.

Tampoco inducen células de memoria necesarias para una respuesta anamnésica. Si la funcionalidad de las células B está disminuida, como ocurre en los niños pequeños o en los inmunocomprometidos como los pacientes con SIDA, el riesgo de las neumocócicas sistémicas aumentan.

2.5. Tratamiento

En el pasado los neumococos eran sensibles de manera uniforme a la penicilina G de modo que todas las enfermedades neumocócicas se trataban con penicilina. En la actualidad con frecuencia una resistencia relativa a la penicilina.

Las formas alternativas con eficiencia demostrada incluyen cefalosporinas, eritromicina y la clindamicina. Como la actividad de las tetraciclinas frente a *Streptococcus pneumoniae* resulta menos predecible, no se deben emplear en los pacientes graves.

La elección de un plan de tratamiento antibiótico empírico es una tarea compleja, para la que debe tenerse la suficiente información en relación a: los gérmenes más frecuentemente responsables de esa infección, su patrón de sensibilidad en el medio, el estado de gravedad del enfermo y otras características del huésped. Estos planes tienen que ser renovados permanentemente, porque como consecuencia de su uso se van seleccionando cepas resistentes y porque constantemente se está trabajando en la elaboración de nuevos antibióticos con el fin de lograr mayor eficacia, menor toxicidad, menos efectos secundarios y/o mayor facilidad de administración. Teniendo en cuenta las innumerables variables de cada situación clínica, no es posible establecer normas rígidas de tratamiento. Lo que se pretende es proporcionar los conocimientos básicos para que los planes terapéuticos sean el resultado de un razonamiento lógico.

Las recomendaciones de tratamiento para neuropatía aguda comunitaria son un esfuerzo para ayudar a racionalizar el uso de los antibióticos.

- Neumonía por *Streptococcus pneumoniae*: continúa siendo el agente causal más frecuente. Los betalactámicos son los agentes de elección, y dentro de ellos la penicilina G.

La introducción en el mercado de nuevos macrólidos y azálides como la azitromicina y la claritromicina, con la posibilidad de administrar dosis únicas, por cortos períodos con una mayor vida media plasmática y el alcanzar mayores concentraciones intracelulares, ha revolucionado el tratamiento de la sepsis respiratoria de forma ambulatoria.⁶

Las dosis son variables, los esquemas terapéuticos más aceptados son los siguientes:

- Azitromicina: 500 mg vía oral el primer día y 250 mg vía oral diarios los 4 días siguientes.
- Claritromicina: 500 mg vía oral diarios de 3 a 5 días.

Otras opciones terapéuticas la constituyen el uso de las tetraciclinas (doxiciclina), clindamicina y sulfaprim. La combinación de una penicilina con inhibidores de betalactamasas (amoxicilina + ácido clavulánico) constituye una alternativa eficaz, con estudios que reportan hasta el 93 % de tasa de erradicación de la sepsis por neumococo del tracto respiratorio inferior.⁷

En los últimos años aparecen cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina, lo que ha provocado grandes problemas a escala mundial. Esta resistencia se transmite a otros betalactámicos, los glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina) son los antibióticos a utilizar en estos casos.⁸

3. RESISTENCIA BACTERIANA

Los antimicrobianos han reducido la mortalidad de las enfermedades infecciosas pero no han disminuido la prevalencia de las mismas. El uso de agentes antimicrobianos ha provocado la evolución de las poblaciones bacterianas hacia formas cada vez más sofisticadas que les permite eludir la intervención del hombre, en su aspiración por controlar los procesos infecciosos.

⁶ Davis Bernard. Tratado de Microbiología. 3ªed. México: Editores Salvat; 1984

⁷ Depardieu Florence and Courvalin Patrice Mutation in 23S rRNA Responsible for Resistance to 16-Membered Macrolides and Streptogramins in *Streptococcus pneumoniae*. American Society for Microbiology: Jan. 2001

⁸ Gundfán J; Gassiot Nuño C, Piño AP, Gómez Ramos M, Hernández Lima L. Tratamiento de la Neumonía Extrahospitalaria

Las bacterias naturalmente resisten frente a determinadas drogas desconocidas desde la producción misma del fármaco, pero es motivo de interpretación distinta; la resistencia adquirida en el curso de los años ó aun en poco tiempo por ciertas bacterias, por esto es conveniente separar para su estudio la resistencia natural y la resistencia adquirida y de esta los distintos medios de obtenerla.⁹

3.1. Resistencia Natural, Intrínseca ó Constitutivo

Es la resistencia denominada como primaria y definida como una insensibilidad de todas las bacterias aisladas de una especie.

La resistencia natural es la ofrecida por las bacterias de una misma especie ó cepa frente a determinado antibiótico, se destaca que esta capacidad de resistencia al fármaco es común en todos los integrantes de la especie. Citamos como ejemplo práctico a *Pseudomonas aeruginosa*, naturalmente resistente a la penicilina.^{10, 11, 12}

3.2. Resistencia Adquirida

La resistencia de la bacteria a uno o varios antibióticos puede lograrse en el transcurso por dos mecanismos básicos: por mutación de las características de su cromosoma ó por la adquisición de material genético por ubicación extracromosómico. La resistencia adquirida se diferencia de la natural ó primaria porque se alcanza de un modo parcial por pocos ó muchos integrantes de una misma especie ó cepa pero no por la totalidad.^{10, 11, 12}

- a) Resistencia cromosómica: La resistencia cromosómica se origina por una mutación espontánea cuya frecuencia ha sido estimada en 10^{-6} a la 10^{-2} potencia. Este número potencial adquiere significado a causa de acelerado crecimiento de las especies bacterianas. Se ha calculado que en ocho horas se suceden 36 generaciones de bacterias. La velocidad de multiplicación explica la presencia de un mutante

⁹ Moreno Jaime; Phadanouvong Vienviley; Castañeda Elizabeth. Vigilancia Molecular de aislamientos invasores de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la penicilina en niños Colombianos menores de 5 años. 2004.

¹⁰ Bergolio Remo M. ANTIBIOTICOS.5.ed.. Bogotá: Ed. Médica Panamericana

¹¹ Cercenado Mansilla Emilia. Resistencia a los antimicrobianos. Madrid. España: Hospital General Universitario" Gregorio Marañón"tm

¹² Pacheco Chirinos Julio. Los mecanismos de resistencia microbiana.

resistente y si la especie esta sometida a una droga, se van deteriorando las bacterias y solo sobreviven aquellas con resistencia cromosómica propia.

Este modo de adquirir resistencia se califica como espontánea y discontinuo con una frecuencia notoriamente menor que la resistencia de origen extracromosómico, ya que no hay propagación a especies diferentes.

Prácticamente todos los bacilos gramnegativos producen algunas betalactamasas de origen cromosómico.

b) Resistencia Extracromosómica: La resistencia adquirida extracromosómico se obtuvo por incorporación de material genético que se sitúa por fuera del cromosoma, denomina también resistencia transferida ó resistencia mediada por plásmidos.

Se producen en mayor cantidad que los de origen cromosómico que pudiera tener la bacteria huésped. Dentro de este grupo se encuentran las betalactamasas de espectro extendido.

4. MECANISMOS DE RESISTENCIA EN *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* :

Los mecanismos de resistencia más extendidos, referidos a las diferentes familias de antibióticos en el caso de esta bacteria son los siguientes:

4.1. Resistencia a betalactámicos:

Alteración de las proteínas de unión a la penicilina (PBP), con baja afinidad por el fármaco.

4.2. Resistencia a macrólidos:

Modificación de la metilasa ribosómica (gen erm AM) y expulsión activa (gen mef E)

4.3. Resistencia a fluoroquinolonas:

Mutación de la topoisomerasa IV. La mutación en parC confiere resistencia de bajo nivel, y una segunda mutación en parC ó la mutación simultanea de parC y gyrA, confieren resistencia de alto grado.^{13, 14, 15}

¹³Jáuregui Peredo L.E. Antimicrobianos: Uso Terapéutico en Infectología Clínica. 1°ed..Bolivia: Plural;2002

¹⁴Gundían Gonzáles J, Barreto Penie J, Rodríguez Rodríguez MA, Pino Alfonso P, Alonso Lim N. MACROLIDOS.

¹⁵Giovanetti Eleonora. Presence of the tet (O) Gene in Erythromycin- and Tetracycline-Resistant Strains of *Streptococcus pyogenes* and Linkage with either the mef(A) or the erm(A) Gene. Antimicrobial agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology: 2003.

5. BLANCO DE ATAQUE DE LOS ANTIMICROBIANOS

5.1. Antimicrobianos que afectan la biosíntesis de la pared bacteriana

La pared bacteriana es una estructura que protege a la célula de los cambios osmóticos del medio externo además de conferirle rigidez.

El peptidoglicano está formado por largas cadenas de polisacáridos en las cuales se alternan en forma lineal N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (NAM) estas cadenas están unidas en forma cruzada por puentes peptídicos mediante enlaces amida con los grupos de D-alanina del ácido N-acetilmurámico. La síntesis del peptidoglicano se ha dividido en tres etapas, siendo la primera intracitoplasmática, la siguiente etapa es intramembranosa y el último paso es extramembranoso.

Los antibióticos que actúan sobre la pared bacteriana impiden los sucesivos pasos de la síntesis de la pared bacteriana, como consecuencia de esta interferencia, la célula bacteriana sin pared no resiste los cambios osmóticos, se hincha y estalla, entre estos antibióticos podemos mencionar a:

5.2. Antimicrobianos que afectan la biosíntesis de ácidos nucleicos

La biosíntesis de DNA bacteriano es inhibida por dos mecanismos:

- a) mediante la inhibición de una topoisomerasa.
- b) mediante la formación de compuestos tóxicos

5.3. Antimicrobianos que afectan la biosíntesis proteica

5.3.1 Inhibición de la transcripción.

Consiste en la inhibición de la subunidad B de la enzima RNA polimerasa DNA dependiente, que lleva a la inhibición de la síntesis de RNA mensajero; este transmite la información del DNA que es necesaria para la información proteica normal.

5.3.2. Inhibición de la traducción.

La inhibición de la proteosíntesis bacteriana se logra mediante la unión de la molécula de antimicrobiano a la subunidad 30 S ó 50 S del ribosoma bacteriano.

Dentro de este grupo se encuentran aminoglucósidos, tetracilinas, macrólidos, lincosaminas y estreptograminas

6. CLASIFICACION DE LOS MACROLIDOS, LINCOSAMINAS Y ESTREPTOGRAMINAS

6.1. MACROLIDOS

6.1.1. Propiedades Generales

Con el descubrimiento en el año 1952 de la eritromicina se incorpora al arsenal de los antimicrobianos una nueva familia: la de los macrólidos. Este compuesto fue aislado por Mc Guire y colaboradores en los productos metabólicos de una cepa de *Streptomyces eruthraeus* obtenida en una muestra de suelo recogida en archipiélago filipo. Mas de 3 décadas después y a pesar de no tener un efecto tan amplio como los betalactámicos y las quinolonas o los aminoglucocidos, la incorporación de nuevos compuestos a la familia, hace que se consideren de elección contra 9 microorganismos y como primera opción frente a otros.

Son antibióticos naturales y semisintéticos de medio espectro. Son primariamente bacteriostáticos.

El termino macrocílido una serie de antibióticos que se caracterizan químicamente por poseer en su estructura y un anillo lactónico u olido sumamente grande, macrocílico. Comprende varios antibióticos el principal es la eritromicina y el menos importante es la espiramicina, como todos los antibióticos de amplio espectro, son predominantemente bacteriostáticos.

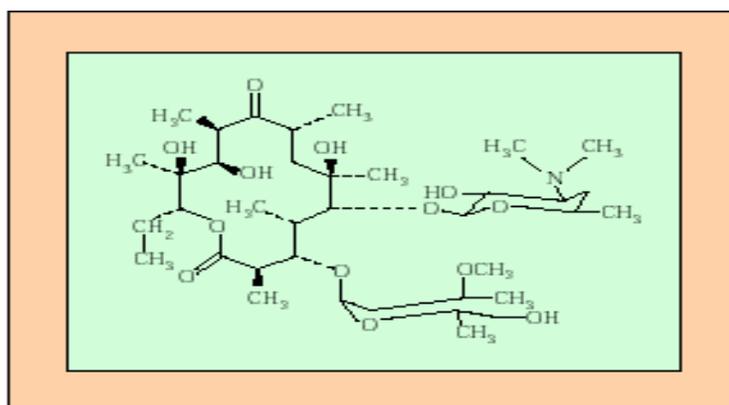
6.1.2. Clasificación de los macrólidos

Macrólidos de 14 átomos	Macrólidos de 15 átomos	Macrólidos de 16 átomos
Eritromicina Roxitromicina Claritromicina Oleandomicina Diritromicina	Azitromicina	Josamicina Midecamicina Mioacamicina Roxitamicina Espiramicina

6.1.3 Estructura química

Todos estos compuestos poseen un anillo macrocíclico lactónico en cuya cadenas lateral se efectúan sustituciones con varios azúcares complejos. Los macrólidos de mayor uso terapéutico tienen anillo de 14 (claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina), 15 (azitromicina) y 16 (diacetilmidecamicina, espiramicina y josamicina) átomos. Los compuestos de 14 átomos tienen uno o dos azúcares ligados a un anillo por uniones glicosídicas a y b. En los compuestos de 16 átomos un amino azúcar une al anillo lactónico con los dos azúcares que se encuentran unidos uno al otro.

Los compuestos de 15 átomos han sido producidos por la inserción de un nitrógeno en el anillo de la eritromicina A. Este grupo realmente no pertenece a los macrólidos sino a los azólidos pero la actividad de la azitromicina es tan similar a la de los macrólidos, pero la actividad de la azitromicina es tan similar a la de los macrólidos que por simplificación se la incluye en este grupo.¹³



Estructura química de la Eritromicina

<http://www.sepeap.es/libros/MEDICINE98/Artikulu/m7204.pdf>

¹³ Jáuregui Peredo L.E. Antimicrobianos: Uso Terapéutico en Infectología Clínica. 1ª ed. Bolivia: Plural; 2002

6.1.4. Mecanismo de acción

Todos los macrólidos inhiben la síntesis de proteínas actuando sobre la función de los ribosomas, bloqueando la reacción de translocación del aminoacil -RNA de transferencia y por ende la síntesis de polipéptidos bacterianos.

- a. Inhibición de la síntesis de la proteína 50 s
- b. Acción bacteriostática bacteriana dependiendo de la concentración (pH =alcalino aumenta la capacidad de difundir en las bacterias)

a. Inhibición de la síntesis de la proteína a 50 s

Los macrólidos se unen de forma reversible a varias proteínas (L22 y L 27) de la subunidad 50s del ribosoma en el sitio blanco específico que es la molécula 23s del RNA ribosómico, promueven la disociación de tRNA -peptídico del ribosoma durante la fase de elongación. Bloquean las reacciones de translocación (macrólidos de 14 y 15 átomos) en la cual la cadena de péptido en crecimiento se desplaza del sitio aceptor al donador por esta particularidad se proscriben su combinación con otras drogas que compiten con el sitio similar de fijación en el ribosoma como la clindamicina y el cloranfenicol, ó de transpeptidación, que actúan en la fase previa a la que es bloqueada por lo de 14 átomos (macrólidos de 16 átomos), que intervienen en la síntesis proteica.

b. Acción bacteriostática bacteriana dependiendo de la concentración (pH=alcalino aumenta la capacidad de difundir en las bacterias)

Al igual que otros antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas son bacteriostáticos, sin embargo pueden ser bactericidas dependiendo de su concentración, inóculo, densidad de la población y su fase de crecimiento en la que se encuentre.⁸

⁸ Gundían J; Gassiot Nuño C, Piño AP, Gómez Ramos M, Hernández Lima L. Tratamiento de la Neumonía Extrahospitalaria

Posee un efecto postantibiótico y mayor actividad a un pH alcalino, se concentran dentro de los macrófagos y polimorfonucleares lo que resulta favorable para el tratamiento de infecciones producidas por patógenos intracelulares.¹⁴

Los macrólidos desarrollan una actividad antibacteriana lenta, predominantemente tiempo dependiendo y con efecto postantibiótico (EPA). La actividad se considera bacteriostática frente a la mayoría de los microorganismos. Sin embargo a concentraciones elevadas, en medio alcalino y/o frente a determinados microorganismos como *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*, especialmente cuando se hallan en fase de crecimiento logarítmico, pueden comportarse como bactericidas. Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) son sensiblemente inferiores a pH alcalino (8) porque la forma no ionizada difunde mejor a través de la membrana citoplasmática. La adición de suero reduce la CIM (aumenta la actividad) de algunos macrólidos particularmente la de azitromicina y espiramicina y en menor grado la de la claritromicina.

Telitromicina es bactericida frente a *S. pneumoniae* y con efecto postantibiótico es más prolongado que el de los macrólidos, probablemente en relación con la tasa de disociación más lenta del complejo estólido-ribosoma producto de su mayor afinidad por el ARNr.

EFEECTO ANTIINFLAMATORIO

Macrólidos y cetólidos tienen efecto antiinflamatorio independientemente de su actividad antimicrobiana.

Se han descrito varios lugares de acción (reducción de la liberación de citocinas proinflamatorias ó de oxidantes, aceleración de la apoptosis de los neutrófilos) que al parecer no interfieren con la actividad antibacteriana de los leucocitos.¹⁵

¹⁴ Gundían Gonzáles J, Barreto Penie J, Rodríguez Rodríguez MA, Pino Alfonso P, Alonso Lim N. MACROLIDOS.

¹⁵ Giovanetti Eleonora. Presence of the tet (O) Gene in Erythromycin- and Tetracycline-Resistant Strains of Streptococcus pyogenes and Linkage with either the mef(A) or the erm(A) Gene. Antimicrobial agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology: 2003.

6.1.5. Farmacocinética

De forma general nos referimos a las características de la eritromicina como compuesto típico del grupo. La Eritromicina se absorbe en la parte superior del intestino delgado, penetra y difunde en casi todos los tejidos excepto en el encéfalo y líquido cefalorraquídeo. Penetra el líquido prostático, atraviesa la barrera placentaria, sin embargo no es teratogena y alcanza bajas concentraciones urinarias.

Se concentra fundamentalmente en el hígado y se excreta por la biliar, esta en relación proporcional al aumento de las concentraciones con las dosis administrativas. Por este motivo en las hepatopatías o enfermedades que cursen con ictericia obstructiva deben ser utilizadas a dosis más bajas que las usuales.

La vida media plasmática es de una y media horas, pero las concentraciones tisulares permanecen por un tiempo mayor. La mayor parte de la droga es inactiva por desmetilación hepática, no es eliminada por diálisis peritoneal ni por hemodiálisis. Por todas las características anteriores no constituyen medicamentos de elección en infecciones del sistema nervioso central, la sepsis urinaria, la endocarditis infecciosa y las infecciones estafilocócicas graves.¹⁶

6.1.6. Espectro de actividad antimicrobiana

Eritromicina: Su espectro incluye:

Gram positivos: *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* (Alrededor de 15% de cepas sensibles a la penicilina son resistentes y un 30% de las cepas resistentes a la eritromicina) estreptococos *viridans*, *S. agalactiae*, *Peptostreptococos*, *C. diphtheria*, *Clostridium spp.* *Listeria monocitogenes*, *B.anthraxis*, *P. acnes*

¹⁶ García Rodríguez JA., García Sánchez E. Resistencia Bacteriana a Antimicrobianos

6.1.7. Resistencia

Existen los siguientes mecanismos de resistencia a los macrólidos

a. Resistencia Intrínseca, Natural ó Constitutiva: Estos grupos de antibióticos por ser hidrófobos atraviesa mal la membrana externa por lo que los bacilos gramnegativos presentan resistencia natural, es el caso de las enterobacterias y pseudomonas en las que el defecto de permeabilidad impide el paso del compuesto a través de la pared celular.

Los antimicrobianos liposolubles pueden difundirse fácilmente a través de las membranas citoplasmáticas de las células eucariotas, permitiendo el tratamiento de infecciones intracelulares, sin embargo las características de la membrana externa asimétrica de las bacterias gramnegativas impide el libre pasaje de las drogas, tanto liposolubles como hidrosolubles

b. Resistencia Adquirida: Mediada por plásmidos o transposones que codifican la enzima metilasa, la cual modifica el RNA del ribosoma causando una disminución en la afinidad por el antibiótico.¹⁹

Se han identificado los siguientes mecanismos de resistencia:

- b.1. Aparición de cambios estructurales del lugar de unión del macrólido al ribosoma
- b.2. Existencia de bombas de expulsión (Eflujo de macrólidos)
- b.3. Mutaciones en los genes ribosómicos de ARN

b.1. Aparición de cambios estructurales del lugar de unión del macrólido al ribosoma

Las modificaciones del lugar de unión al ribosoma pueden consistir en:

- a) metilación de un residuo de adenina y cambios en la secuencia de bases del ARNr de la subunidad 23 S
- b) alteraciones de la proteína ribosómica L4.

¹⁹ Klaasen Corne; Mouton Johan. Molecular Detection of the Macrolide Efflux Gene: To Discriminate or Not To Discriminate between *mef*(A) and *mef*(E). American Society for Microbiology

a) Producción de metilasa ribosómica, la metilación del ARNr 23S

Obedece a la presencia de una enzima (metilasa) codificado por genes denominados *erm* localizados en plásmidos y/o transposones que pueden expresarse de forma constitutiva o inducible. La inducción se ha relacionado con la presencia de cladinosa (azúcar) en los macrólidos de 14 y 15 átomos. Los macrólidos de 16 átomos, clindamicina y telitromicina no inducen la actividad de la metilasa por que carecen de este azúcar. La resistencia adquirida puede ser inducible ó constitutiva. En la resistencia inducible el gen que codifica la enzima metilasa entra solo en actividad cuando el organismo se ve frente al antibiótico. Los macrólidos de 14 y de 15 átomos inducen la desrepresión del gen. La metilasa una vez activada hace que la bacteria se vuelva resistente a todos los macrólidos y a la clindamicina. Los macrólidos de 16 átomos (día cetil -midecamicina, espiramicina, josamicina) no inducen esta desrepresión del gen, ni su resistencia.

La resistencia por metilaciones que impiden la unión de los fármacos al ribosoma 50s esta codificada por plásmidos en transposones, es cruzada y puede ser inducible (en macrólidos de 14 y 15 átomos) y constitutiva (macrólidos de 16 átomos y lincosaminas) y aparece en cocos gram positivos y negativos, también la producción de enzimas transferasas puede determinar resistencia de estafilococos para lincomicina y clindamicina.

En la resistencia constitutiva el gen codificador esta presente en todos los organismos resistentes y producen resistencia cruzada hacia todos los macrólidos, lincosaminas y las estreptograminas. Si la expresión es constitutiva el mRNA del *erm* (B) es activo y su traducción por los ribosomas permite la metilación constitutiva de los ribosomas mientras se sintetizan. Si es inducible el RNA del *erm* (B) se sintetiza pero en una conformación inactiva y llega a ser activo solamente en la presencia de inducir macrólidos. Para el gen *erm* la capacidad de inducción de los macrólidos depende de la estructura antibiótica, el número de átomos en el anillo lactona determina la capacidad e inducción. ¹⁷

¹⁷ Lectercq Roland; Courvalin Patrice. Resistance to Macrólidos and Related Antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrobial agents and Chemotherapy

Se han identificado 21 clases de genes *erm*. En neumococos la resistencia esta mediada por *erm* (B), En *S. pyogenes* por *erm* (B) ó *erm*(A) y en *S. aureus* por *erm*(B) ó *erm*(A).En función del gen que codifica la metilasa esta incorpora uno o dos grupos metilos en el nucleótido. La monometilación origina resistencia cruzada a todos los macrólidos, la clindamicina y la estreptogramina B(quinupristina).El fenotipo de resistencia resultante se conoce como fenotipo MLSB .La dimetilación confiere resistencia además a telitromicina. Telitromicina es activa frente a cepas de neumococos resistentes a los macrólidos por presencia de *erm* (B) y frente a cepas de *Streptococcus pyogenes* con resistencia inducible, pero no lo es frente a *S. pyogenes* con resistencia constitutiva ni frente a *S. aureus* con resistencia inducible o constitutiva .Synergid es activo frente a cepas de *S. aureus* con el fenotipo de resistencia MLSB. Si bien estas cepas son resistentes a quinupristina, la resistencia no es cruzada con dalforpristina y la sinergia de la asociación se mantiene, sin embargo el efecto suele ser bacteriostático.

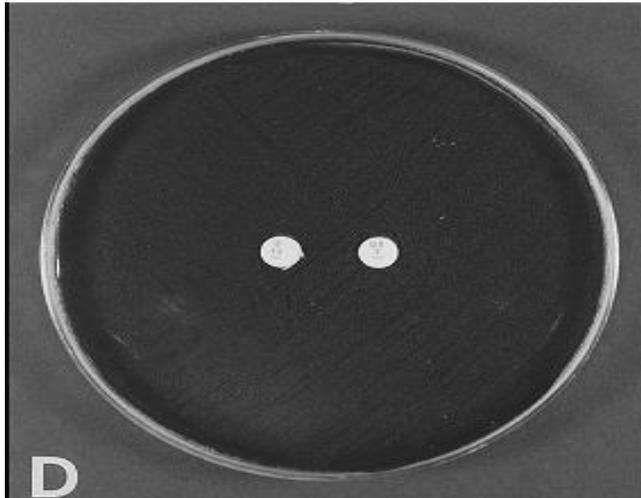
Las mutaciones cromosómicas que generan cambios de la proteína L4 o de la secuencia de bases del ARNr 23S. La mutación de la proteína L4 altera la estructura terciaria del ARNr 23 S en el dominio V e influye indirectamente en la afinidad por el macrólido.

Esta modificación del blanco es secundaria a la adquisición de un gen *erm* que codifica una enzima que desnaturaliza un residuo específico de la adenina (A2058) en el rRNA 23s. Esta alteración induce un cambio conformacional en la subunidad ribosomal 50s que bloquea el atascamiento MLSB.

El *erm* (B) inicialmente llamado (AM) primero fue caracterizado en el plasmido pAM77 en el *Streptococcus sanguis* A1 aislado en la placa dental en 1978. El gen se distribuye no solamente en *S. pneumoniae* sino en una variedad de otras especies de estreptococcus, enterococos y enterobacterias. En neumococos el gen es llevado por los transposones conjugativos, la transposición ocurre de cromosoma a cromosoma de los aislados de *Streptococcus pneumoniae*.

La extensión clónica de las cepas resistentes y la transferencia horizontal explica el alto predominio del gen *erm* (B) en neumococo eritromicina –resistente en ciertos países. Las cepas que pertenecen al linaje 23F o 6B como parte de Tn 3872 ó de una forma modificada de Tn 916 y de elementos de Tn 1545 y se pueden intercambiar en neumococo por la transformación.¹⁷

Fenotipo MLS_B Constitutivo

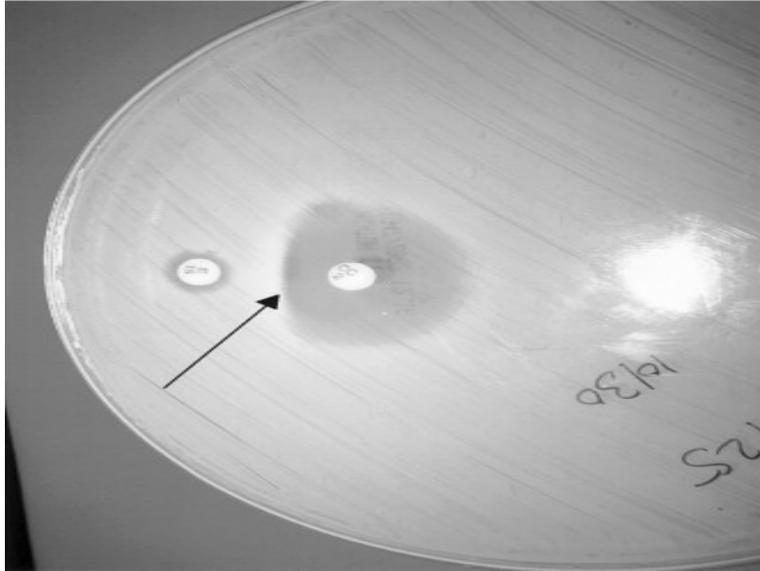


Mecanismo de Resistencia por Metilasas (MLS_B Constitutivo)

<http://jcm.asm.org/cgi/content-nw/full/39/4/1311/F1>

¹⁷ Lectercq Roland; Courvalin Patrice. Resistance to Macrólidos and Related Antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrobial agents and Chemotherapy

Fenotipo MLS_B Inducido



Mecanismo de Resistencia por Metilasas (MLS_B Inducido)

<http://jcm.asm.org/cgi/content-nw/full/39/4/1311/F1>
Clinical Infectious Diseases 2003; 37:1257-1260

b) Alteraciones de la proteína ribosómica L4

Las mutaciones se seleccionan durante el tratamiento y pueden observarse cuando se emplea un macrólido en monoterapia de una infección por *S. aureus* y *H. pylori*. Se han descrito mutaciones de las proteínas L22 y L4 que confieren que confieren resistencia a quinupristina.

Los fenotipos de resistencia MLS_B (mediado por la presencia de metilasa) y M (debido a una bomba de expulsión) son transferibles mediante transposones. En general el fenotipo MLS_B origina un nivel de resistencia a macrólidos mayor > (CIM 16mg/l) que el fenotipo M (CIM 1-16mg/l).²⁸

²⁸ Bean David C. and Klena D. John Prevalence of *erm*(A) and *mef*(B) erythromycin resistance determinants in isolates of *Streptococcus pneumoniae* from New Zealand. 2002

b.2.Existencia de bombas de expulsión (Eflujo de macrólidos)

Estos no modifican el blanco, sino por el contrario bombean de la célula o de la membrana celular guardando las concentraciones intracelulares y ribosomas libres del antibiótico, se trata de la existencia de una bomba de expulsión activa del macrólido codificada por el gen *mef* que bombea fuera a los macrólidos de 14 y 15 átomos.

La presencia del sistema de Eflujo fue descrita y establecida firmemente en 1996 por Stcliffe et.al, este sistema de resistencia fue reconocida y caracterizada a macrólidos de bajo nivel a los que tengan 14 y 15 átomos pero no muestran ninguna resistencia cruzada a los de 16 átomos (lincosaminas y estreptograminas B) ó sus análogos. Este fenotipo fue referido como fenotipo M y esta en contraste con el fenotipo MLSB que es de alto nivel. El mismo año clancy et.al. identifico el gen responsable del sistema de eflujo en el *S pyogenes* y fue denominado *mef* (E). Este gen fue depositado en las bases de datos de DNA y se podría considerar la secuencia de referencia para el gen *mef*(A).Tait -Kamradt et.al identifico mas adelante un gen similar en el *S. pneumoniae* y en ese momento fue señalado *mef* (E).^{21, 24, 25, 29,30}

La resistencia de Eritromicina de las bombas se ha descrito en varios organismos Gram positivos. Sin embargo la resistencia adquirida a los macrólidos detectada recientemente es eflujo activo en *Streptococcus pneumoniae*, el gen responsable de eflujo inicialmente fue llamada *mef* (E) debido a ser cercano al gen *mef*(A) de *Streptococcus pyogenes*, ambos con identidad del 90% en el nivel del DNA y se insertan en sitios diferentes del cromosoma.

²¹Mcgee Lesley. The antibiotics surveillance forum of south Africa Serotype 19F Multiresistant Pneumococcal Clone Harboring Two Erythromycin Resistance Determinants [*erm*(B) and *mef*(A)] in South Africa.2001

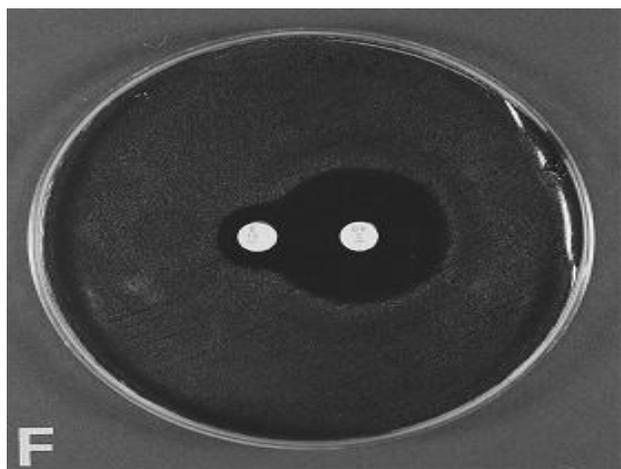
²⁴ Kresken Michael High Prevalence of the *ermB* Gene among Erythromycin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Germany during the Winter of 2000-2001. 2004 Vol. 48, No. 8

²⁵ Morosini María-Isabel. In Vitro Activity of Telithromycin against Spanish *Streptococcus pneumoniae* Isolates with Characterized Macrolide Resistance Mechanisms. 2001. Vol. 45

²⁹Hoon Song Jael. Macrolide resistance and genotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries

³⁰ Soo Ko Kwan and Hoon Song Jae. Evolution of Erythromycin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* from Asian Countries That Contains *erm*(B) and *mef*(A)Genes.2004

La bomba *mef* (A) pertenece a la clase principal, contiene 12 dominios de transmembrana que atraviesa la membrana citoplasmática y el eflujo es conducido por la fuerza motiva del protón. Se ha identificado pocos sustratos y parece ser específica a Eritromicina y a sus derivados incluyendo Azitromicina, porque los macrólidos de 16 átomos (lincosaminas y estreptograminas B) no son sustratos de la bomba .^{18,19}



Mecanismos de Resistencia por EFLUJO

<http://jcm.asm.org/cgi/content-nw/full/39/4/1311/F1>

b.3.Mutaciones en los genes ribosómicos de ARN

El mecanismo de resistencia es raro pero con frecuencia resulta en resistencia a macrólidos y estreptograminas. Se conoce con el fenotipo MS .²⁰

6.2. LINCOSAMINAS

6.2.1. Propiedades Generales

Las lincosaminas forman un grupo pequeño de antibióticos con una estructura diferente de todos los otros antibióticos. Los compuestos que ocurren en forma natural (aislados de *Streptomyces lincolnensis*) son la lincomicina y la celesticetina.

¹⁸ Cresti Stefania; Lattanzi Maria ; Zanchi Alessandra ; Montagnani Francesca; Pollini Simona; Cellesi Carla; Rossolini Gian Maria. Resistance Determinants and Clonal Diversity in Group A Streptococci Collected during a Period of Increasing Macrolide Resistance. American Society for Microbiology .2002

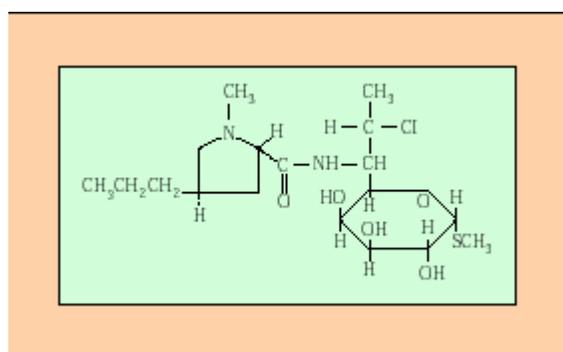
¹⁹ Klaasen Corne; Mouton Johan. Molecular Detection of the Macrolide Efflux Gene: To Discriminate or Not To Discriminate between *mef* (A) and *mef* (E). American Society for Microbiology.2005

²⁰ Manual de pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Sección *Streptococcus pneumoniae*

Una modificación química de la lincomicina ha resultado en la clindamicina, la cual por su mayor actividad antimicrobiana y mejor absorción intestinal ha remplazado a la lincomicina.

6.2.2 Estructura química

La clindamicina es el derivado 7-deoxi 7-cloro de la lincomicina. Es una base débil que es soluble en agua como sal. Sus formulaciones son la sal de hidrocloreto (cápsula oral), el ester de palmitato (suspensión oral) y el ester de fosfato (solución parenteral).



Estructura química de la Clindamicina

<http://www.sepeap.es/libros/MEDICINE98/Artikulu/m7204.pdf>

6.2.3. Mecanismo de acción

Las lincosaminas son inhibidoras de la síntesis de proteínas. Se unen a la subunidad 50S de los ribosomas en un punto de fijación muy similar (si no es idéntico) al de los macrólidos y al del cloranfenicol. Por lo tanto cada uno de estos antibióticos pueden interferir en la acción de otros. Las lincosaminas inhiben la iniciación de la formación de la cadena de péptidos por medio de su acción sobre los ribosomas que aún no han comenzado la formación de péptidos. Interfieren con la peptidil-transferasa lo que inhibe la formación de uniones entre péptidos y no permite la formación de una cadena. Son consideradas bacteriostáticas pero en ciertos casos tienen acción bactericida. Tienen la capacidad de potenciar la opsonización y fagocitosis de las bacterias a concentraciones subinhibitorias por medio de alteraciones en la superficie de la célula bacteriana, lo cual favorece la fijación de complemento y por ende la fagocitosis y lisis intracelular. La clindamicina interfiere con la adherencia de *S. aureus* a la fibronectina lo cual previene la colonización con este microorganismo.

También interfiere con la formación de la biomembrana del glicocalix con la producción de la toxina responsable del síndrome de choque tóxico, ambos producidos por *S. aureus*.

6.2.4. Espectro de actividad antimicrobiana

Su actividad se limita a cocos Gram positivos aerobios, organismos anaerobios y protozoos. Los cocos Gram positivo sensibles incluyen: *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. bovis*, *estreptococos viridans*. Los estafilococos tienen sensibilidad variable para lo cual se necesita confirmación del laboratorio. Los estafilococos resistentes a la eritromicina pueden ser sensibles o resistentes a la clindamicina en el tratamiento de la infección. La clindamicina es bactericida frente a la mayoría de los cocos Gram positivos (estreptococos y estafilococos).

6.2.5. Resistencia

La resistencia puede ocurrir durante el tratamiento. Ocurre por mutaciones cromosómicas ó por transferencia de plásmidos. Las mutaciones cromosómicas producen cambios en la estructura de los puntos de fijación de los ribosomas o por falla de unión entre la clindamicina y la subunidad 50S del ribosoma (causada por la metilación del RNA ribosomal 23S). Los plásmidos producen alteraciones en las metas del antibiótico.

6.3. ESTREPTOGRAMINAS

6.3.1. Propiedades Generales:

Las estreptograminas constituyen una clase única de antibióticos naturales derivados del *Streptomyces pristinaspiralis*. Se incluyen se incluyen en esta familia a las mikacinas, pristinamicinas, ostreomicinas y virginamicinas. El primer fármaco desarrollado en este grupo fue la pristinamicina. La cual a causa de su limitada solubilidad acuosa ha sido utilizada solamente como formulación oral en el tratamiento de infecciones leves causadas por el *S aureus*.

La pristinamicina contienen dos subunidades: la pristinamicina IA y la pristinamicina IIA que son macrolactonas que pertenecen a la familia de las estreptograminas B y A respectivamente. Estos macrolactonas son bacteriostáticos individualmente pero cuando actúan en combinación producen una acción sinérgica que es bactericida. Su insolubilidad en medio acuosa no ha permitido el desarrollo de una formulación intravenosa.

Algunas modificaciones estructurales hechas a las macrolactonas de la pristinamicina ha permitido el desarrollo de derivados sintéticos que son solubles en el agua. Uno de estos derivados son el Synercid el cual combina la quinupristina (una pristinamicina del grupo IA) y la dalfopristina (una pristinamicina del grupo IIA) en una proporción de 30:70 para crear una formulación intravenosa. El Synercid tiene la característica principal de ser activo frente a las cepas de *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina.

6.3.2. Estructura química

Este fármaco conformado por la quinupristina y la dalfopristina que son derivados semisintéticos de la pristinamicina

6.3.3 Mecanismo de acción

Las estreptograminas son compuestos funcionalmente relacionados a los macrólidos (eritromicina) y las lincosaminas (clindamicina) pues tienen la capacidad de ligarse a la subunidad 50S de los ribosomas para inhibir la síntesis de proteínas bacterianas.

6.3.4. Actividad antimicrobiana

Su actividad antimicrobiana más importante es contra las cepas de *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina y multiresistentes a otros antibióticos. Esta actividad es inhibitoria y no es bactericida.

También es activo frente a las cepas de *S. aureus* (sensibles y resistentes a Meticilina), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* (incluyendo cepas resistentes a la penicilina y a los macrólidos) *Corynebacterium jeikeium* y *Streptococcus agalactiae*. Su actividad frente a estos microorganismos es bactericida.

Su actividad bactericida se extiende a los organismos Gram negativos e intracelulares asociados con infecciones respiratorias incluyendo: *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *M. catarrhalis*, *Leginella spp*, *Mycoplasma pneumoniae*.

6.3.5. Resistencia

El método más común contra las estreptograminas ocurre por acción de la familia de genes *erm* (eritromicina resistente a metilasa) y se denomina MLSB (Macrólidos, Lincosaminas y estreptograminas). Estos genes codifican por acción de una enzima que disminuye el grado de fijación de la eritromicina, clindamicina y las estreptograminas del grupo B hacia los organismos.

Los genes de resistencia pueden ser constitutivos o inducibles. Los organismos con genes constitutivos son resistentes a todos los macrólidos, lincosaminas y las estreptograminas. Los organismos con genes de resistencia inducible por lo general se mantienen sensibles a las estreptograminas del tipo B. Afortunadamente la presencia de genes de resistencia hacia las estreptograminas del grupo B no modifican ni la actividad de las estreptograminas del grupo A ni el efecto sinérgico de la combinación de componentes de los grupos A y B. Se han identificado otros mecanismos de resistencia incluyendo las modificaciones enzimáticas simultáneas de las estreptograminas del grupo A y B causadas por *S aureus*.

Estas modificaciones confieren resistencia de Synercid y a otras combinaciones de estreptograminas del grupo A y B mantienen su actividad frente a aquellos organismos que manifiestan resistencia solamente contra uno de los componentes A ó B. En contraste las cepas bacterianas resistentes al Synercid y a las otras combinaciones de estreptograminas A y B muestran modificaciones enzimáticas sean del componente A o de las de los componentes (A y B).¹³

¹³ Jáuregui Peredo L.E. Antimicrobianos: Uso Terapéutico en Infectología Clínica. 1ª ed.. Bolivia: Plural; 2002

7. EPIDEMIOLOGIA

S. pneumoniae es la principal causa de neumonías bacterianas y de otitis media aguda en todo el mundo. También el neumococo es uno de los agentes más frecuentes de meningitis después de *N. meningitidis* y *H. influenzae*. La neumonía neumocócica es considerada como una de las más prevalentes y serias tanto en los países desarrollados como en desarrollo y afecta en primera instancia a los individuos con factores de riesgo. La neumonía neumocócica es responsable de 10 a 25% de todas las neumonías, estimándose una tasa de mortalidad mundial de más de 1 millón de decesos anuales en niños menores de 5 años.

La enfermedad neumocócica es más frecuente los 2 primeros años de vida, disminuyendo luego rápidamente después de los 10-15 años y volviendo a aumentar su incidencia en los mayores de 65 años. *S. pneumoniae* infecta exclusivamente al hombre, no existe otro reservorio en la naturaleza. La tasa de portador nasofaríngeo es del 20 a 40%, la cual depende del período estudiado y de la población.

La vía de transmisión del neumococo es aérea, a través de gotitas de saliva de portadores o de enfermos. Es un organismo sensible al calor, al frío y a la desecación, por lo tanto la transmisión requiere de un contacto estrecho de persona a persona. Todas las edades, razas y sexos son susceptibles a esta enfermedad.

Los estudios, realizados en muchos países, sobre la distribución de los serotipos prevalentes, han demostrado que la frecuencia varía con el tiempo, el cuadro clínico, la edad y la región geográfica.

Los portadores pueden albergar diferentes serotipos al mismo tiempo o en tiempos diferentes, de modo continuo o intermitente. La distribución de los serotipos en pacientes y portadores sanos menores de 2 años, es diferente a la de los adultos. Algunos serotipos son aislados en todas las edades en cuanto otros son aislados más frecuentemente de niños (6A, 6B, 14, 18, 19F, 19A, 23F).

Ha sido demostrado que los serotipos más comunes que causan enfermedad invasora en los países desarrollados difieren de los aislados en los países en desarrollo. Por lo tanto, la serotipificación sistemática del neumococo, es un instrumento epidemiológico fundamental ya que el conocimiento de la distribución de serotipos más frecuentes, en una determinada población, en un período dado, permitirá la formulación de una vacuna adecuada para la población en riesgo.

III. ANTECEDENTES

La resistencia a Eritromicina en el *Streptococcus pneumoniae* se ha observado desde 1967 y el cual fue el primero en divulgar multiresistencia en aislados de *Streptococcus pneumoniae* en Sur África en 1978. La resistencia del macrólido en el neumococo ha aumentado considerablemente durante los 5 años pasados en varios áreas geográficas.²¹

En un estudio realizado en Alemania entre el año 2000 y 2001 que cubría 13 laboratorios clínicos en Microbiología, un total de 307 de *Streptococcus pyogenes* y 333 aislados de *Streptococcus pneumoniae* procedentes de infecciones respiratorias de pacientes no internados menores de 16 años de los cuales 40.5% tenían el genotipo *mef A* (Fenotipo M), 38.1% tenían el genotipo *ermA* y 9.5% tenían el *erm B* (fenotipo MLS)²²

De 4281 cepas de *Streptococcus pneumoniae* aislados a partir de procesos invasivos y del tracto respiratorio de diferentes edades en Alemania, 399 (9.3%) eran resistentes a Eritromicina, 226 (56.6%) tenían el *mef(A)* fenotipo M y 168 (46.6%) tenían el gen *erm (B)* fenotipo MLSB.²³

²¹ Mcgee Lesley; Clubmen Keith . The antibiotics surveillance forum of south Africa Serotype 19F Multir esistant Pneumococcal Clone Harboring Two Erythromycin Resistance Determinants [*erm(B)* and *mef(A)*] in South Africa. American Society for Microbiology. 2001

²² Reinert Ralf Rene. Conferring Resistance to Macrolides in *Streptococcus pneumoniae* Clinical Strains Isolated in Germany. 2003

²³ Reinert Ralf Rene .Antimicrobial Resistance of *Streptococcus pneumoniae* Recovered from Outpatients with Respiratory Tract Infections in Germany . 2001

De 595 aislados de *Streptococcus pneumoniae* pacientes no internados con infecciones respiratorias recogidos a partir de 17 laboratorios de microbiología en Alemania durante 2000-2001, 84 eran eritromicina resistentes y de estos el 84% tenían el gen erm(B) estos procedían de países de Europeos tales como Bélgica, Francia, Italia, España , mientras que el gen mef(A) fue encontrada predominante en EEUU y Canadá.²⁴

Un total de 203 aislados clínicos de *Streptococcus pneumoniae* fueron recogidos de 14 hospitales Españoles que representaban a 14 diversas áreas geográficas obtenidos a partir de procesos invasivos de los cuales en 14 aislados fue detectado el gen erm(B) fenotipo MLS y en 5 aislados se detecto el gen mef(A) fenotipo M.²⁵

En un estudio realizado en Italia se recogieron 65 cepas de *Streptococcus pneumoniae* a partir de vías respiratorias altas (la mayoría de los aislados) y muestras de procesos invasivos, 14 aislados tenían el fenotipo MLSB constitutivo, 44 fueron asignados al fenotipo parcialmente inducible MLSB i y 1 tenía el fenotipo M mediado por el eflujo. Todos los MLS constitutivo e inducible tenían el gen erm (B) de la resistencia a la Eritromicina y todos los aislados del fenotipo M tenían el gen mef(A) ó el mef (E).²⁶

Fueron aislados 468 cepas de *Streptococcus pneumoniae* de varios centros durante el año 2000 y 2001 en Rusia a partir de vías respiratorias y de LCR de pacientes cuyas edades comprendían 1 mes y 85 años, la distribución máxima fue encontrada de 2 a 10 años, siendo el mecanismo mas frecuente de eflujo con 5 cepas, seguido del gen erm (B) MLSB constitutivo que fue encontrado en 4 cepas de *Streptococcus pneumoniae*.¹⁹

²⁴ Kresken Michael. High Prevalence of the ermB Gene among Erythromycin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Germany during the Winter of 2000-2001 and In Vitro Activity of Telithromycin. Antimicrobial agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology. 2004

²⁵ Morosini María-Isabel. In Vitro Activity of Telithromycin against Spanish *Streptococcus pneumoniae* Isolates with Characterized Macrolide Resistance Mechanisms. 2001

²⁶ Montanari Maria P. Phenotypic and Molecular Characterization of Tetracycline - and Erythromycin-Resistant Strains of *Streptococcus pneumoniae*.2003

¹⁹ Klaasen Corne; Mouton Johan. Molecular Detection of the Macrolide Efflux Gene: To Discriminate or Not To Discriminate between mef(A) and mef(E). . Antimicrobial Agents and Chemotherapy: 2005 Vol. 49

Un Total de 85 aislados clínicos de *Streptococcus pneumoniae* eritromicina- resistentes fue recogido de varios laboratorios Italianos de los cuales 65 aislados el gen erm (AM) asignados como macrólidos, lincosaminas y streptograminas (MLSB) de tipo constitutivo y los 20 restantes llevaban el gen mef (E) asignado como fenotipo M, no se encontró a ningún fenotipo MLSB inducible.²⁷

Ciento veinticuatro aislados *Streptococcus pneumoniae* de eritromicina-resistentes fueron recuperados a partir de muestras ojo, oído, esputo, muestras nasales en Nueva Zelandia para determinar la presencia de la resistencia en Macrólidos, el gen erm(B) fenotipo MLS, fue detectado en 118(95.2%) y el gen mef(A) en 83(66.9%) de los aislados.²⁸

En un estudio de la vigilancia de *Streptococcus pneumoniae* de la red Asiática del grupo ANSORP procedentes de 10 países Asiáticos durante 1998 -2001 se realizó la caracterización fenotípica y genotípica y los mecanismos de resistencia siendo 555 aislados de los cuales 216(38.9%) eran susceptibles, 10 (1.8%) eran intermedios y 329(59.3%) eran resistentes a Eritromicina.

La metilación en el ribosoma codificado por el erm (B) era el mecanismo más común de resistencia. En la mayoría de los países Asiáticos excepto en Singapur, Malasia y Hong - Kong fue encontrado el genotipo mef A en un 50% de las cepas de *Streptococcus pneumoniae*. El nivel de Resistencia de Eritromicina en *Streptococcus pneumoniae* en la mayoría de los países Asiáticos excepto en Tailandia e India fue muy Alta.²⁹

La resistencia a Eritromicina de 110 aislados de *Streptococcus pneumoniae* en países de Asia debido a la extensión clónica de algunos multidrogas resistentes muestra que 45(41%) tenían el gen erm (B) fenotipo MLS, mientras que el 23(21%) contenían el erm (B) y el mef (A), 42(38%) contuvieron solamente el mef(A) fenotipo M.

²⁷ Kozlov Roman S. Antistreptococcal Activity of Telithromycin Compared with Seven Other Drugs in Relation to Macrolide Resistance Mechanisms in Russia. 2003

²⁸ Bean David C. and Klena D. John Prevalence of erm(A) and mef(B) erythromycin resistance determinants in isolates of *Streptococcus pneumoniae* from New Zealand. 2002

²⁹ Hoon Song Jae. Macrolide resistance and genotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: a study of the Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens. 2004

Los aislados que contenían el erm (B) y el mef(A) fueron obtenidos de la China, Hong - Kong, Corea, Malasia y Vietnam.³⁰

En el Hospital General de PLA y de la Universidad Beijing en China se aislaron 192 cepas de *Streptococcus pneumoniae* de estos 149 eran Eritromicina-resistentes, de los cuales la mayoría 89.2% expresaban el fenotipo MLSB constitutivo e inducible, de los 149 aislados, el 79.1% tenían el gen erm (B) fenotipo MLSB, el 10.1% tenían el gen mef(A) y erm (B) simultáneamente y 10.8% llevaban el gen mef(A) fenotipo M.³¹

En la región Asiática el erm (B) ó fenotipo MLSB mediado por la resistencia de alto nivel es un mecanismo predominante de la resistencia en aislados *Streptococcus pneumoniae* invasores de en China, Vietnam, Corea, Taiwán y del Japón mientras que el mef(A) fenotipo M es mas común en aislados de Hong -Kong, Singapur y Tailandia. El índice de los aislados eritromicina –resistentes que contienen erm (B) y el mef(A) es más alto en Vietnam, Corea, Malasia y otras regiones.³⁰

Un total de 2245 aislados de *Streptococcus pneumoniae* fue recogido a partir de 63 laboratorios clínicos de Canadá de los cuales 901(40%) fueron muestras de sangre, 578(24%) de vías respiratorias bajas, 439(20%) de muestras conjuntivales, 217(10%) de oído, 44(2%) de LCR y 66(2%) de otros sitios. De 2203 aislados 768(35%) eran menores de 15 años, 731(33%) eran pacientes comprendidos entre 15 y 64 años y 707(32%) de pacientes ancianos. La resistencia que presentaban era la siguiente: macrólidos 11.1%, clindamicina 5.7%, cloranfenicol 2.2%, levofloxacin 0.9% , gatifloxacin 0.8%, moxifloxacin 0.4% y cotrimoxazol 11.3%.³²

³⁰ Soo Ko Kwan and Hoon Song Jae. Evolution of Erythromycin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* from Asian Countries That Contains *erm*(B) and *mef*(A) Genes. Journal of Clinical Microbiology .2004

³¹ Tiemei Zhao. Resistance Phenotypes and Genotypes of Erythromycin -Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Beijing Shenyang, China. Antimicrobial agents and Chemotherapy. 2004

³² Low Donald E.; Azavedo de Joyce; Karl Weiss, Mazzulli Tony; Kuhn Magdalena; Church Deirdre; et. al. Isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Canada during Antimicrobial Agents and Chemotherapy .Antimicrobial .2002

Se obtuvieron 20 aislados de *Streptococcus pneumoniae* como parte de la vigilancia en Europa Oriental, Canadá y EEUU, en 17 aislados se observó el fenotipo MLSB y 3 presentaron el fenotipo M.³³

El predominio de MLSB y fenotipo M varía geográficamente en los EEUU y Canadá donde esta 20% y el 9% la resistencia del macrólido en *Streptococcus pneumoniae* respectivamente predomina el fenotipo M. En Europa el predominio de la resistencia del macrólido es fenotipo MLSB (30%).³⁴

Durante 2 años de estudio 2000-2002 en el servicio de Navarra se obtuvieron 465 aislados de *Streptococcus pneumoniae* procedentes de aislados invasores 166/465(35.7%) procedían de Hemocultivos y LCR, el 7.2%(12/166) era de LCR. Las muestras respiratorias representaban 61.3%(284/465) y el resto 3%(13/465) correspondía a otros orígenes. Del total 291(63.8%) fueron sensibles a Eritromicina y clindamicina, 141(30.9%) fueron resistentes a Eritromicina y Clindamicina (fenotipo MLSB) y hubo 24(5.3%) aislados resistentes a Eritromicina pero no a clindamicina, fenotipo M.³⁵

Se estudiaron 190 aislados de *Streptococcus pneumoniae* invasores con SPD recuperados de niños menores procedentes de diferentes regiones de Colombia entre Enero de 2000 a Diciembre 2003, 53% procedían de hemocultivos, 35% de LCR, 16% de líquido pleural y 6% de otros líquidos corporales. El 44% de los pacientes tenían como diagnóstico Neumonía, 39% meningitis y 17% otros procesos (sepsis, peritonitis). La mayoría de los aislamientos procedieron de niños (57%) y niños menores de 2 años (67%).⁹

³³ Tait-Kamradt Amelia; Clancy Joanna, Cronan Melissa; Dib -Hajj Fadia; Lillian; Wondrack Wei Yuan. Sutcliffe *mefE* Is Necessary for the Erythromycin-Resistant M Phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. American Society for Microbiology: Antimicrobial agents and Chemotherapy.

³⁴ Hoban Daryl J.; Aleksandra k. Wierzbowski; Kim Nichol; George g. Zhanel Macrolide-Resistant *Streptococcus pneumoniae* in Canada during 1998-1999: Prevalence of *mef(A)* and *erm(B)* and Susceptibilities to Ketolides. American Society for Microbiology. 2001

³⁵ Setas A. Gil; Mozón A.; Torroba L.; Barricarte A.; Irnrc García JJ.; Petil A. et. al. Sensibilidad antibiótica y recomendaciones de tratamiento para *Streptococcus pneumoniae*. 2004

⁹ Moreno Jaime; Phadanouvong Vienviley; Castañeda Elizabeth. Vigilancia Molecular de aislamientos invasores de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la penicilina en niños Colombianos menores de 5 años. 2004. Vol.24:298-301

IV. JUSTIFICACIÓN

Existen estudios realizados en otros países sobre la búsqueda de los fenotipos de resistencia a Macrólidos donde se observa un aumento de un 20 -30% a nivel mundial donde se evidencia una resistencia de bajo nivel y de alto nivel o resistencia cruzada a este grupo de antimicrobianos lo que lleva al fracaso terapéutico y posteriormente la muerte.

En Bolivia no existe ningún estudio sobre la búsqueda de estos fenotipos de resistencia frente a Macrólidos en *Streptococcus pneumoniae* por lo tanto el presente trabajo podrá aportar al conocimiento sobre la presencia de estos fenotipos como mecanismo de resistencia en *Streptococcus pneumoniae* con ayuda de la prueba del doble disco.

Esta información sobre uno de los mecanismos de resistencia presentado por esta bacteria Primero dará a conocer el porcentaje de resistencia a este grupo de antimicrobianos Segundo esta información ayudara al médico clínico a tomar decisiones en cuanto al tratamiento frente a infecciones causadas por *Streptococcus pneumoniae* orientando al uso racional de antibióticos y de esta manera evitar el incremento acelerado de resistencia Tercero el Laboratorio de Microbiología deberá realizar la caracterización fenotipica de dicha bacteria ya que resulta fiable el uso del método de difusión del doble disco para la detección de los mecanismos de resistencia siendo que esta prueba permite diferenciar el fenotipo como mecanismo de resistencia a Macrólidos debido a modificaciones y/o alteraciones en el lugar de acción de estos antimicrobianos que posteriormen te serán evidenciados en el antibiograma.

V. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Detectar los fenotipos de resistencia a macrólidos de *Streptococcus pneumoniae* aislados a partir de procesos infecciosos en niños menores de 5 años en diferentes regiones de Bolivia durante el periodo de Julio 2000 a Diciembre de 2005

B. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Describir la distribución encontrada de la resistencia frente a macrólidos en cepas de *Streptococcus pneumoniae*
- Detectar los fenotipos de resistencia frente a macrólidos en *Streptococcus pneumoniae*
- Describir la distribución de los fenotipos y mecanismos de resistencia encontrados según el grupo étnico.
- Establecer la distribución de los fenotipos y mecanismos de resistencia encontrados de acuerdo con la fuente de aislamiento.
- Describir la distribución de los fenotipos y mecanismos de resistencia encontrados según diagnóstico.
- Establecer la distribución de los fenotipos y mecanismos de resistencia encontrados de acuerdo al Tamisaje a la Oxacilina.
- Describir la distribución de los fenotipos y mecanismos de resistencia encontrados según el Serotipo.
- Establecer la distribución de los fenotipos y mecanismos de resistencia encontrados de acuerdo a la ciudad

VI. DISEÑO METODOLOGICO

A. DETERMINACIÓN DE LA POBLACION

La población en estudio son todas las cepas de *Streptococcus pneumoniae* que llegaron a la Unidad de Patógenos Respiratorios del laboratorio de Referencia en Bacteriología Clínica (LNRBC) de INLASA durante el periodo comprendido entre Julio de 2000 a Diciembre de 2005

B. RECOLECCION DE LAS MUESTRAS

Los aislamientos fueron recolectados de niños menores de 5 años que cursaban con IRAS y Meningitis procedentes de la Red Bacteriana de la Vigilancia Neumo -Hib de Bolivia abarcando además Laboratorios privados.

C. DISEÑO DE ESTUDIO

1. Tipo de Investigación: Observacional Descriptivo
2. Tipo de Estudio: Corte Transversal

D. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Para obtener una muestra representativa es necesario recurrir al muestreo. El tipo de muestreo que se eligió en el presente estudio es de tipo No Probabilístico ya que se trabajaron con todos los aislados durante el periodo de estudio.

E. MATERIAL

Equipos

- Autoclave (Safeti)
- Estufa de Cultivo (WTC Hinder)
- Vitek
- Tarjeta de Biker- Ham

Material de Vidrio

- Matraz Erlenmeyer de 500ml
- Cajas Petri
- Probetas 250 ml y 100ml
- Tubos de Hemólisis
- Hisopos de Algodón
- Asa Bacteriológica
- Portaobjetos

Medios de Cultivo

- Caldo Cerebro Corazón
- Tripteina Soya Agar (Laboratorio Britania s.a.)Lote 425
- Mueller Hinton Agar (Laboratorio Britania s.a.)Lote 263 y Lote 296
- Extracto de Levadura (Laboratorio Britania s.a.)Lote 527
- Leche Desnatada en Polvo (Skim Milk Powder)(OXOID)
- Sangre de Carnero

Reactivos y Discos de Antibiograma

- Discos de Eritromicina(15ug) Becton Dickinson and Company(BBL)
- Discos de Clindamicina(2ug) Becton Dickinson and Company(BBL)
- Discos de Optoquina (Laboratorio Britania s.a.)
- Solución de Desoxicolato 10%
- Cloruro de Sodio (BDH)Lote K2148032 507
- Escala de Mac. Farland 0.5
- Aceite de Inmersión

F. METODOS Y PROCEDIMIENTO

1. POBLACION Y LUGAR

1.1. POBLACION (Aislados Bacterianos)

Se trabajaron con 100 cepas de *Streptococcus pneumoniae* obtenidas a partir de procesos invasivos (Hemocultivos y Líquidos estériles) excepto una muestra que procedía de un proceso no invasivo(muestra conjuntival) en niños menores de 5 años cuyos aislados provienen de diferentes hospitales públicos, instituciones así como de algunos Laboratorios privados que representan a 4 departamentos (La Paz, Santa Cruz, Cochabamba y Sucre) comprendidos durante el periodo de Julio 2000 a Diciembre de 2005 los cuales representan a la Red de Laboratorios de Bacteriología Clínica de Bolivia.

1.1.1. Instituciones participantes

La Paz:

- Hospital Ovidio Aliaga
- Hospital Obrero
- Hospital San Gabriel
- SELADIS
- Lab Clinics

Cochabamba:

- Escuela Técnica de Salud
- German Urquidi

Santa Cruz:

- Hospital del Niño Mario Ortiz Suárez
- Hospital japonés

Sucre:

- Hospital Santa Bárbara

1.2. LUGAR (Laboratorio de Referencia en Bacteriología Clínica -LRBC)

1.2.1. Descripción del ámbito de estudio

El laboratorio de Bacteriología Clínica forma parte del Instituto Nacional de Laboratorios de Salud “Néstor Morales Villazón” es un laboratorio Nacional de Referencia para la red de Laboratorios de Bacteriología Clínica en Bolivia, con un sistema de vigilancia Epidemiológica de los patógenos bacterianos prevalentes a través de procesos de normalización, capacitación, supervisión, controles de calidad externo e interno e investigación bajo la dependencia del Ministerio de Salud.

Actualmente el laboratorio cuenta con 7 áreas donde el equipamiento con el que cuenta y la tecnología con la que trabaja permite realizar trabajos en las diferentes áreas como aquellas encargadas de las enfermedades de transmisión sexual, Investigación, Genética Bacteriana y Patógenos Respiratorios.

El área de patógenos respiratorios se encarga de realizar la vigilancia epidemiológica de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophylus* y otros *estreptococcus* por lo que recibe, confirma y procesa todos los aislados que llegan a la Unidad

INLASA queda ubicado en Miraflores en la calle Rafael Zubieta N° 1889 (Lado del Estado Mayor) Casilla M-10019 Teléfonos 2226048-2226670 Fax 591-2-228254 E-MAIL: inlasa@unete.com. La Paz-Bolivia.

Ref. Laboratorio de Referencia en Bacteriología Clínica (LNRBC)

1.2.2. Periodo de levantamiento de información

Las cepas de *Streptococcus pneumoniae* con los que se trabajo representan al periodo comprendido entre Julio 2000 a Diciembre 2005

Los aislados bacterianos eran recogidos en el medio de transporte Amies con Carbón y luego enviados al LNRBC excepto aquellas muestras que procedían del Hospital del Niño Ovidio Aliaga (La Paz) que eran procesadas en el mismo laboratorio.

La identificación de los aislados fueron confirmadas en el laboratorio por pruebas convencionales y normas establecidas por la Red SIREVA (Sistema regional de Vacunas) y por el Programa especial para vacunas e inmunización (SVI).

a) Tinción Gram

En las bacterias Gram positivas 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.

El decolorante en las bacterias gram negativas actúa como un solvente de los lípidos presente en los poros de la pared que aumentan de tamaño liberando el complejo cristal violeta-yodo, tomando la bacteria el colorante de contraste (safranina -fucsina básica).

b) Prueba de la Catalasa

Procedimiento:

- Con una aguja o asa bacteriológica recoger una colonia de un cultivo puro de 18 a 24 horas de incubación (de la parte central de la colonia evitando arrastar el medio)
- Colocar la colonia en un portaobjetos
- Agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 3% sobre la colonia. (Anexo N° 1)

Interpretación:

La formación de burbujas por la liberación de oxígeno indica una reacción positiva
La ausencia de burbujas indica una reacción negativa

c) Prueba Optoquina

Procedimiento:

- Con la ayuda de un hisopo estéril tomar una ó dos colonias aisladas de un cultivo 18 - 24hrs. y de forma homogénea estriar una sola vez la placa de agar sangre
- Con una pinza, colocar un disco de optoquina sobre la siembra realizada
- Aplicar una suave presión al disco para que se adhiera (teniendo cuidado de no hundir en el medio)

-Incubar a 35° con 5-7% de CO2 durante 18 a 24 hrs.³⁶ (Anexo N° 1)

Interpretación:

Discos de 6mm

Halo de inhibición ≥ 14mm indica sensibilidad. Prueba Positiva

Halo de inhibición 6 a 13 mm sensibilidad dudosa



Fuente: Laboratorio de Bacteriología Clínica – INLASA
Manual de *Streptococcus pneumoniae*

d) Prueba de la Solubilidad en bilis

Procedimiento:

-A partir de un cultivo puro de 18 a 24 hrs. preparar una suspensión del microorganismo en solución fisiológica estéril con una turbidez igual al tubo N°2 de la escala de Mc Farland

-Para cada microorganismo utilizar dos tubos, rotular una prueba (P) y otro control (C)

-Colocar en cada tubo 0.5ml de la suspensión del microorganismo

-Añadir al tubo (P) 0.5 ml de desoxicolato de sodio y al tubo (C) 0.5ml de solución fisiológica estéril

-Mezclar suavemente los tubos

-Incubar a 35°C en baño María ó en la estufa durante 2hrs.³⁶ (Anexo N° 1)

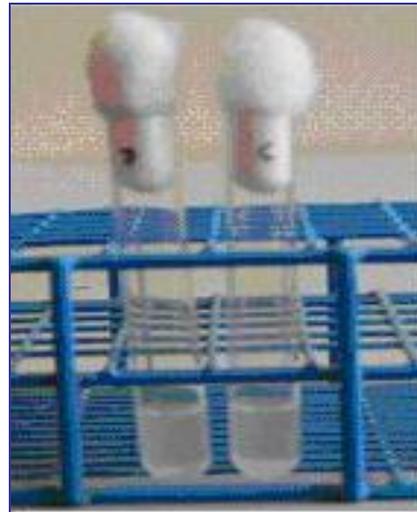
³⁶ Rosales Rojas P, Ruiz Aranda E. Manual de procedimientos Bacteriológicos para *Streptococcus pneumoniae*, *H. influenzae* y *N.meningitidis*. 2005

Interpretación:

Se debe realizar haciendo la comparación de los tubos (P) y (C), a las dos horas de incubación.



Fuente: Laboratorio de Bacteriología – INLASA
Manual de *Streptococcus pneumoniae*
Solubilidad en Bilis (+)



Fuente: Laboratorio de Bacteriología -INLASA
Manual de *Streptococcus pneumoniae*
Solubilidad en Bilis (-)

e) Tamisaje de oxacilina y Serotipificación

Los resultados obtenidos de estas pruebas fueron copiadas de registros de la Unidad de Patógenos Respiratorios del Laboratorio de Bacteriología Clínica - INLASA

2. Almacenamiento

Todos los aislados de *Streptococcus pneumoniae* fueron almacenados a -70° en el medio Skim-Milk 20% (Leche descremada) hasta su uso.

3. Recuperación de los Aislados Bacterianos

Después del descongelamiento (Cepario del Laboratorio Nacional de Referencia en Bacteriología Clínica) fueron sembrados en Agar Soya Trypticosa con sangre de carnero al 5%.

Para la recuperación de los aislados mas antiguos (2000 -2001)se utilizaron caldo soya tripticasa y Agar Soya tripticasa con sangre de carnero desfibrinada al 5% ambos medios enriquecidos con levadura.

Antes de realizar la prueba de difusión Bauer Kirby se realizaron 2 repiques en Agar Sangre al 5%

4. Prueba de Susceptibilidad y Resistencia

4.1. Control de Calidad

Para obtener resultados que garanticen la confiabilidad de la prueba de difusión en Agar Bauer Kirby se realizo un procedimiento previo a este

4.1.1. Control de Calidad del Medio Mueller Hinton con sangre

Donde se tomaron en cuenta dos aspectos el a) frasco y b)el lote

a) Nuevo Frasco: La fecha de vencimiento y la composición de l medio (pH, cationes, timina- timidina) para este procedimiento se deberá utilizar cepas ATCC

b) Nuevo Lote:

- Control de Esterilidad: Del lote preparado separar aproximadamente el 5% para luego incubar a 35°C durante 48hrs. y observar cualquier desarrollo
- Profundidad: Cuyo diámetro será de 4mm, siendo que con este diámetro se han estandarizado para obtener los puntos de corte para la interpretación de los resultados del antibiograma. Las Cajas petri también deberán tener las mismas características.

4.1.2. Control de Calidad de discos

La cepa de referencia *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 deberá incluirse cada 15 días cuando se utilice nuevo lote de alguno de los reactivos empleados en la prueba además es útil para controlar la actividad del antimicrobiano para neumococos donde los diámetros de inhibición de la cepa de referencia para los diversos antimicrobianos se encuentra en la Tabla 3 A del documento de la NCCLS y CLSI (Vol 20 a Vol 25) 2000 a 2005 respectivamente

4.2. Prueba de Difusión en Agar Bauer Kirby

Las pruebas de sensibilidad y resistencia se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del Programa SIREVA (Sistema regional de vacunas) y el SVI (Programa Especial para vacunas e inmunización) de la Organización Panamericana de la salud (OPS)

El principio del método involucra la aplicación de una cantidad determinada de antimicrobiano (disco de papel) sobre la superficie del Agar Mueller-Hinton con 5% de sangre de carnero para cultivar al microorganismo, se formara así por difusión un gradiente de concentración de antimicrobiano y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento alrededor del disco.

➤ **Preparación del inóculo: (Método de suspensión directa)**

A partir de un cultivo puro de 18 –24 hrs. de incubación tomar varias colonias aisladas colocar directamente un tubo que contenga 3 a 4 ml de solución fisiológica.

El diámetro del tubo donde se prepara la escala a ser comparada deberá tener las mismas condiciones en cuanto a diámetro de la escala de Mac Farland.

➤ **Estandarización del inóculo:**

La suspensión será ajustada por comparación con la escala de turbidez 0.5 de Mac Farland y con ayuda de la tarjeta de Biker Ham que servirá de contraste para la comparación de ambos tubos (patrón e inóculo).

La escala no deberá exponerse a la luz solar, de lo contrario se deteriora y precipita es por esta razón que se debe cubrir con papel estañado.

➤ Inoculación de las placas:

Inmediatamente ajustada la suspensión introducir un escobillon de algodón estéril en el tubo y rotar varias veces, antes de sacarlo presionar firmemente en las paredes del tubo con el objeto de eliminar el exceso de líquido.

Sumergir un hisopo de algodón estéril en la suspensión, rotar varias veces y ejercer una presión sobre las paredes internas del tubo para quitar el exceso de líquido, posteriormente sembrar en Agar Mueller Hinton con 5% de sangre de carnero, estriar en la superficie pasando el hisopo 3 veces y en 3 direcciones en toda la superficie esto para asegurar una distribución pareja y homogénea.

El inóculo debe ser conservado en el medio dentro de los 15min. posteriores a su estandarización ya que tiempos mayores nos dará falsa resistencia.

➤ Aplicación de los discos:

Los antibióticos deberán estar fuera de su conservación 1 hora antes, esto con el fin de atemperarlos.

Colocar los discos con los antimicrobianos a probar en la superficie inoculada con ayuda de una pinza estéril y presionar el disco suavemente sobre la superficie del Agar para asegurar el contacto completo con el.

➤ Incubación de las placas:

Sin dejar pasar mas de 15 minutos colocar las cajas en la incubadora a 35° en una atmósfera de 5 a 7% de CO₂ durante 20 a 24hrs.

➤ Medida de la zona de inhibición :

Después del periodo de incubación medir los diámetros de las zonas de completa inhibición de crecimiento. El punto de corte deberá tomarse al área en el cual no se observa desarrollo de la bacteria.

Observar que exista crecimiento confluyente en toda la placa, medir las zonas de inhibición sosteniendo la placa en forma invertida.

El diámetro del halo alrededor del disco puede ser convertido a las categorías susceptibles, intermedias ó resistentes.

➤ Interpretación:

La interpretación de los resultados así como los agentes antimicrobianos que deben probarse para *Streptococcus pneumoniae* están descritos en la Tabla 2G del documento de la NCCLS (Nacional Comité for Clinical Laboratories Standard) 2000 a 2004 Vol 20 N° a Vol 24 N° y la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) 2005 (Vol 25 N°).³⁷

4.2.1. Determinación de los fenotipos de Resistencia

Prueba del doble disco

Los fenotipos de resistencia a macrólidos de los aislados de *Streptococcus pneumoniae* fueron determinados por la prueba del doble disco con Eritromicina (15ug) y Clindamicina (2ug).

Para detectar los diferentes fenotipos de resistencia a macrólidos se recomienda colocar el disco de Clindamicina a 20mm. de Eritromicina en el medio Mueller Hinton con sangre al 5%. La distancia entre los discos de borde a borde puede oscilar entre 15 a 26 mm para favorecer la inducción de resistencia a clindamicina y visualizar el D-test (Achatamiento del halo de clindamicina) si este mecanismo está presente.

Este método es más sensible y rápido para detectar y caracterizar las cepas resistentes a macrólidos que los métodos de dilución donde clindamicina puede aparecer falsamente sensible a las 24 hrs. de incubación y mostrar su resistencia a las 48 hrs. cuando corresponde al fenotipo MLS_B inducible.

³⁷ Torrico E, Trigoso Agudo C. Manual de procedimientos bauer kirby y su control de calidad. La Paz-Bolivia: OPS / OMS;2003

De esta manera obtendremos un patrón de antibiograma característico para cada fenotipo

4.2.2. Interpretación

Los aislados fueron asignados como fenotipo MLS_B (Constitutivo e Inducible) y fenotipo M mediado por la resistencia del macrólido en base a sus patrones de susceptibilidad a los antibióticos de la NCCLS Y CLSI y la prueba del doble disco (Eritromicina y Clindamicina) como a continuación sigue: ^{38,39}

- ❖ Fenotipo MLS_B Constitutivo: Otorga resistencia a Eritromicina y Clindamicina
- ❖ Fenotipo MLS_B Inducible: Dará un halo de inhibición pequeño de resistencia a Eritromicina y un halo asimétrico a clindamicina con un aplanamiento de su halo hacia el lado de la Eritromicina con lo que se demuestra que la Eritromicina indujo la expresión de la resistencia a clindamicina esto también es llamado D -test (achatamiento de la zona de inhibición de clindamicina)próxima al disco de Eritromicina
- ❖ Fenotipo M: Aquellos aislados resistentes a Eritromicina y susceptibles a Clindamicina sin achatamiento (Halo de inhibición redondo y simétrico)

FENOTIPO	MECANISMO DE RESISTENCIA	INTERPRETACION	INFORME
Ausente	Ninguno	S CLI/LIN/ERY	Sensible a los antibióticos
MLS _B	Metilasa Constitutivo	R CLI/LIN/ERY	Resistente a CLI/LIN/ERY
MLS _B	Metilasa Inducible	R ERY S CLIN c/a*	Resistente a CLI/LIN/ERY
M	Eflujo	R ERY S CLIN s/a**	Resistente ERY Sensible CLIN /LIN

(*) Con Achatamiento del halo de CLI

(**) Con Achatamiento del halo de CLI

³⁸ Duran L, Damián E, Trigoso. Generalidades y procedimientos del antibiograma. Mecanismos de Resistencia en Macrólidos, Lincosaminas y Estreptograminas. La Paz -Bolivia: INLASA;2006

³⁹ Trigoso Agudo C, Torrico E, Riera E, Aguilar S. Manual de procedimientos bacteriológicos en sensibilidad y resistencia en antimicrobianos OPS/OMS;2003

VII. RESULTADOS

Tabla N° 1
Frecuencia de los mecanismos de Resistencia a macrólidos en cepas de *Streptococcus pneumoniae* en niños < 5 años en Bolivia Julio 2000 a Diciembre 2005

Mecanismo de Resistencia	Frecuencia	Porcentaje
Presente	17	17%
Ausente	83	83%
Total	100	100%

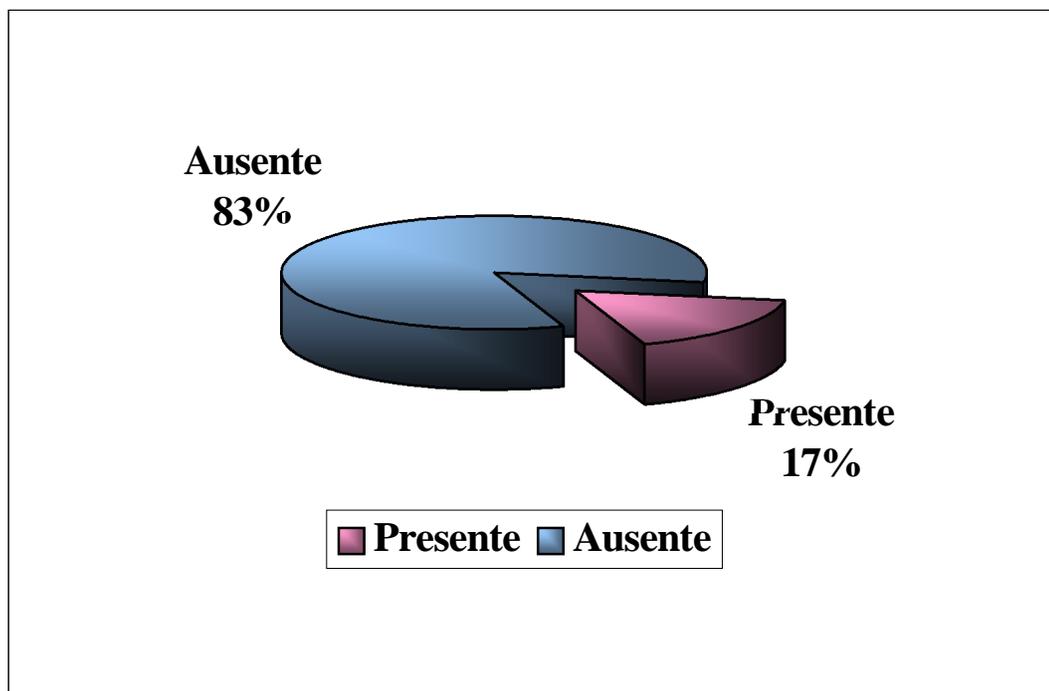


Figura N° 1 De 100 cepas de *Streptococcus pneumoniae* procesadas por la prueba del Doble disco 83% no presentaban la resistencia a Macrólidos, sin embargo el 17% si presentaban dicha resistencia.

Tabla N° 2
Distribución de los Fenotipos de Resistencia a macrólidos en cepas
de *Streptococcus pneumoniae* en niños < 5 años en Bolivia
Julio 2000 a Diciembre 2005

Fenotipos	Frecuencia	Porcentaje
M	11	65%
MLS _B	6	35%
Total	17	100%

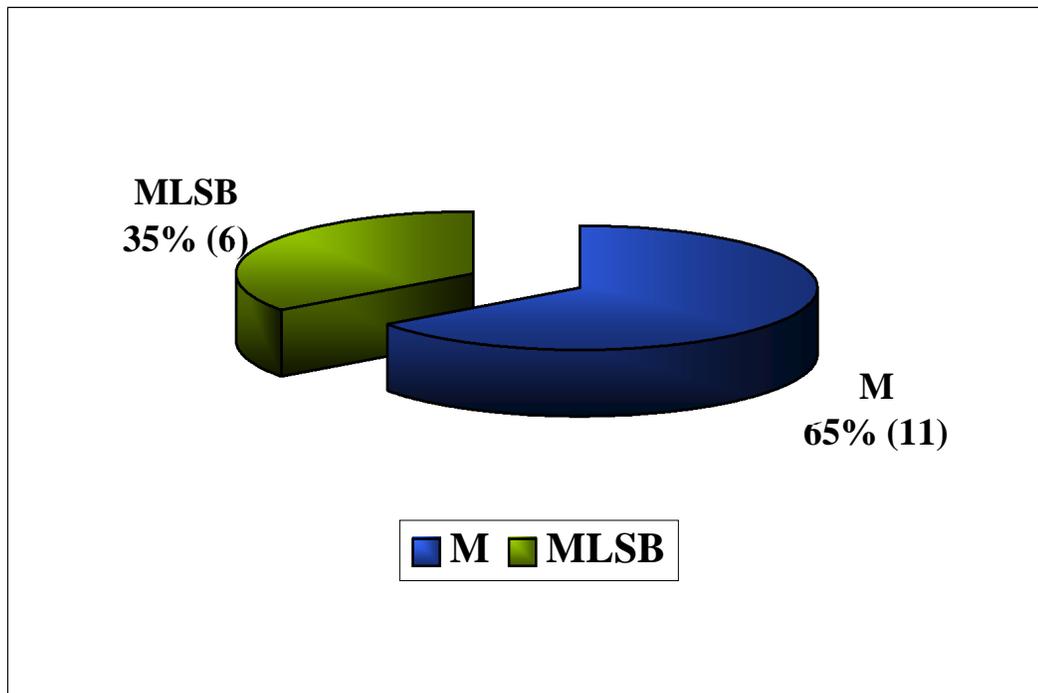


Figura N° 2 Del total de cepas procesadas 17(17%) presentaban resistencia a macrólidos de los cuales 11(65%) eran resistentes a Eritromicina y sensibles a Clindamicina asignados como fenotipo M (Mecanismo de Resistencia por Eflujo) y 6(35%) eran resistentes a Eritromicina y Clindamicina asignados como fenotipo MLSB de tipo constitutivo (Mecanismo de Resistencia por Metilasas), en ninguno de los casos se observo el Fenotipo MLS B de tipo inducible.

Tabla N° 3
Distribución de los mecanismos de Resistencia a Macrólidos en cepas de
***Streptococcus pneumoniae* según grupo etareo en niños < 5 años en Bolivia**
Julio 2000 a Diciembre 2005

Grupo etareo	Mecanismos de Resistencia				Total	
	EFLUJO	%	METILASAS	%		%
0 - 11 m	3	17.5 %	6	35%	9	53 %
12 - 23 m	1	5.9 %	0	0%	1	5.9 %
24 - 35 m	3	17.5 %	0	0%	3	17.5 %
36 - 47 m	1	5.9 %	0	0%	1	5.9 %
48 - 60 m	3	17.5 %	0	0%	3	17.5 %
Total	11	65%	6	35%	17	100%

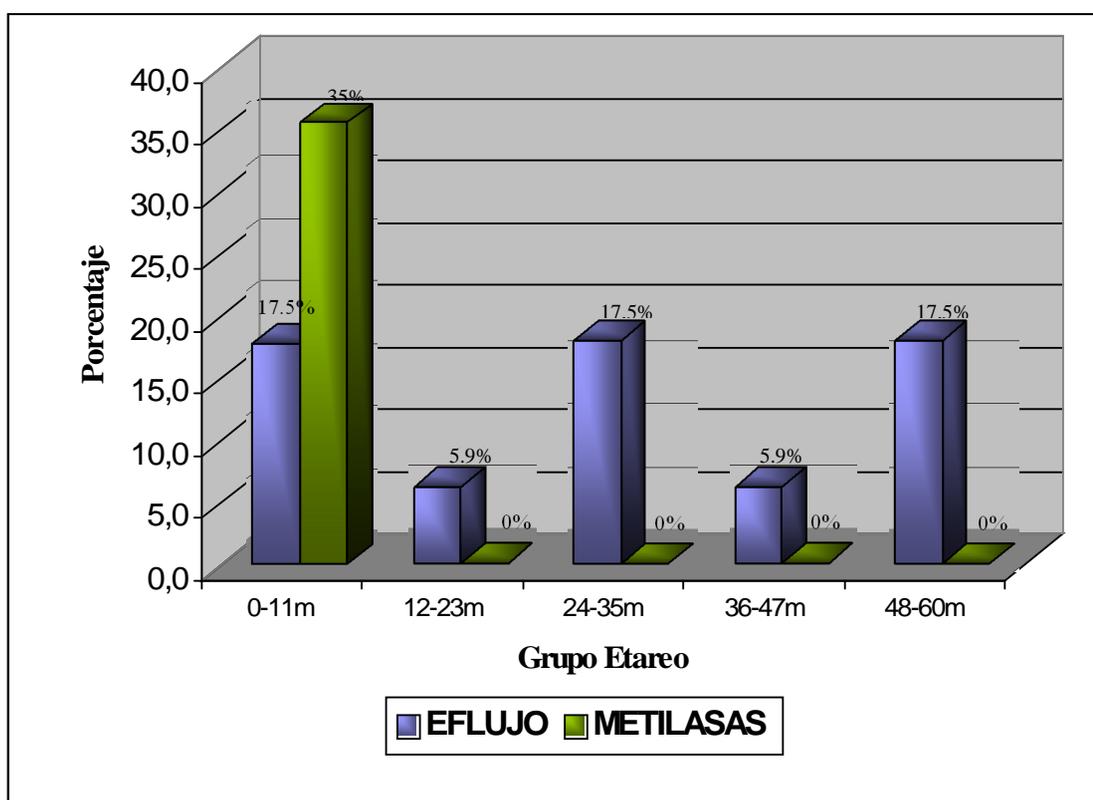


Figura N° 3 Del total de los aislados de *Streptococcus pneumoniae* que presentan la resistencia a macrólidos 17/100 la mayor distribución de cepas resistentes en función al grupo etareo se observa en niños menores de 1 año con un 9(53%), de los cuales el mayor porcentaje de resistencia es debido a Metilasas (Fenotipo MLS_B) con un 6(35%).

Tabla N° 4
Distribución de los mecanismos de Resistencia a Macrólidos en cepas de
Streptococcus pneumoniae **en función a la Fuente de Aislamiento**
en niños < 5 años en Bolivia
Julio 2000 a Diciembre 2005

Fuente de Aislamiento	Mecanismos de Resistencia				Total	
	EFLUJO	%	METILASAS	%		%
Sangre	6	35%	1	5.9 %	7	41 %
LCR	3	17.5%	3	17.5 %	6	35 %
Liquido Pleural	2	12%	0	0%	2	12 %
Ocular	0	0%	2	12%	2	12 %
Total	11	65%	6	35%	17	100%

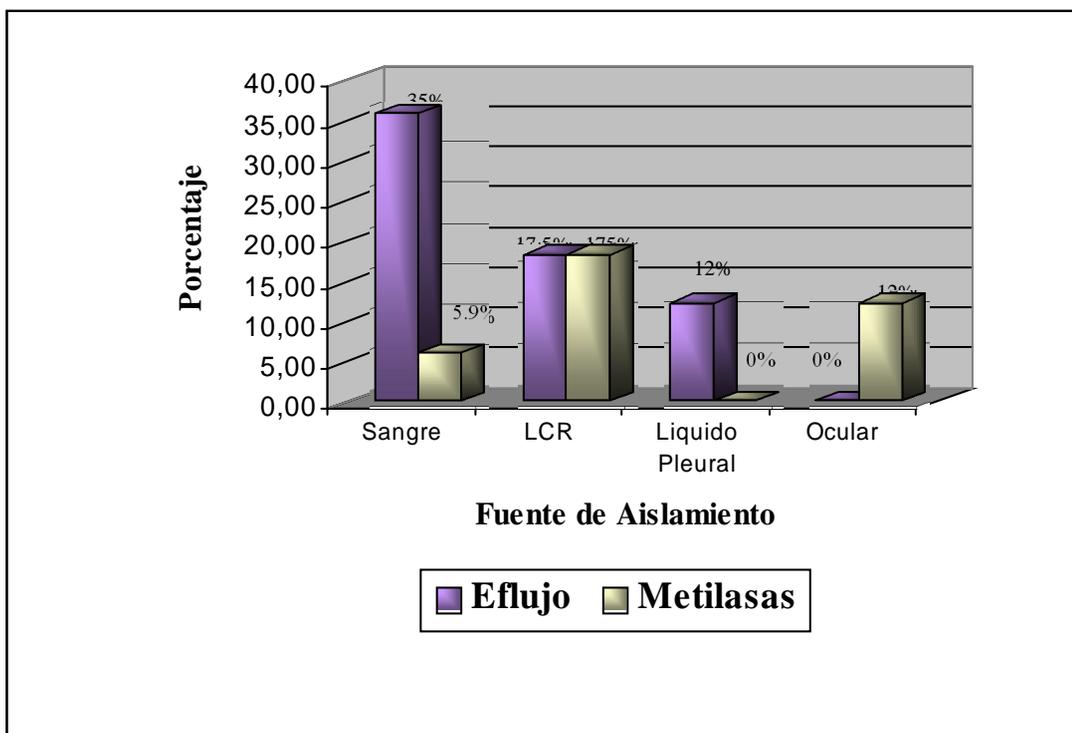


Figura N° 4 Del total de los aislados de *Streptococcus pneumoniae* que presentan la resistencia a macrólidos 17/100 la mayor distribución de cepas resistentes en función a la fuente de aislamiento, se observa en aquellos aislados que proceden de Hemocultivos 7 (41%) de los cuales el mayor porcentaje de la resistencia es debido a Eflujo (Fenotipo M) con un 6 (35%) y LCR con un 6(35. %) mostrando el mismo porcentaje para ambos resistencias Eflujo(Fenotipo M) y Metilisas(Fenotipo MLS_B) con un 3(17.5%).

Tabla N° 5
Distribución de los mecanismos de Resistencia a Macrólidos en cepas de *Streptococcus pneumoniae* en función al Diagnóstico en niños < 5 años en Bolivia
Julio 2000 a Diciembre 2005

Diagnostico	Mecanismos de Resistencia				Total	
	EFLUJO	%	METILASAS	%		%
Neumonía	8	47%	1	5.9 %	9	53%
Meningitis	3	17.5%	3	17.5 %	6	35%
Conjuntivitis	0	0%	2	12%	2	12%
Total	11	65%	6	35%	17	100%

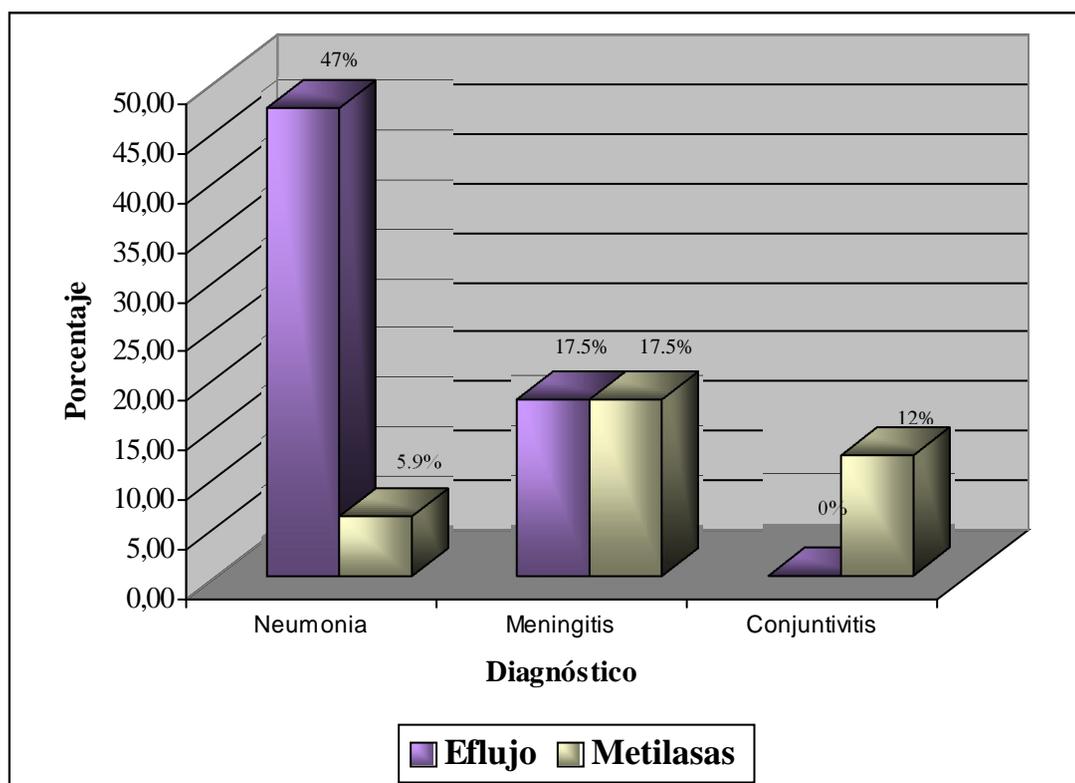


Figura N° 5 Del total de los aislados de *Streptococcus pneumoniae* que presentan resistencia a macrólidos 17/100 la mayor distribución se encontró en aquellos pacientes cuyo diagnóstico fue Neumonía 9(53%) donde el mayor porcentaje de la resistencia es debida a Eflujo (Fenotipo M) 8(47%) y Meningitis con un 6(35%) mostrando el mismo porcentaje para ambas resistencias Eflujo (Fenotipo M) y Metil asas (Fenotipo MLS_B).con 3 (17.5%).

Tabla N° 6
Distribución de los mecanismos de Resistencia a Macrólidos en cepas de
Streptococcus pneumoniae **en función al Tamizaje de Oxacilina**
en niños < 5 años en Bolivia
Julio 2000 a Diciembre 2005

Oxacilina	Mecanismos de Resistencia				Total	
	EFLUJO	%	METILASAS	%		%
*SP	8	47%	3	17.5 %	11	65%
**SDP	3	17.5%	3	17.5 %	6	35%
Total	11	65%	6	35%	17	100%

* SP =Sensibilidad a la Penicilina

** SDP = Sensibilidad disminuida a la penicilina

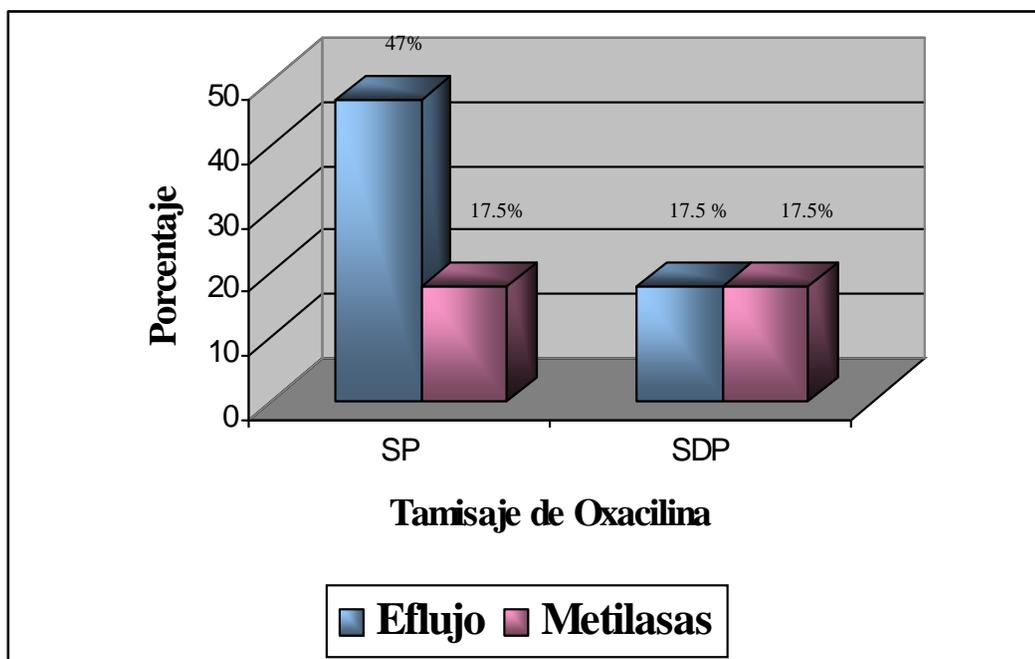


Figura N° 6 Del total de aislados de *Streptococcus pneumoniae* que presenta la resistencia a Macrólidos 17/100 la mayor distribución se observa en aquellos relacionados con sensibilidad a la penicilina (SP) con un 11(65%) de los cuales el mayor porcentaje de la resistencia es debida a Eflujo (Fenotipo M) con 8(47%).

Tabla N° 7
Distribución de los mecanismos de Resistencia a Macrólidos en función al Serotipo en
cepas de *Streptococcus pneumoniae* en niños < 5 años en Bolivia
Julio 2000 a Diciembre 2005

Serotipo	Mecanismos de Resistencia				Total	
	EFLUJO	%	METILASAS	%		%
14	5	29.4 %	0	0	5	29.4 %
19F	1	5.9 %	3	17.5 %	4	23.4 %
6*	1	5.9 %	2	0,12	3	17.5 %
19*	2	0,12	0	0	2	0,12
7*	1	5.9 %	0	0	1	5.9 %
11*	1	5.9 %	0	0	1	5.9 %
5	0	0	1	5.9 %	1	5.9 %
Total	11	0,65	6	0,35	17	1

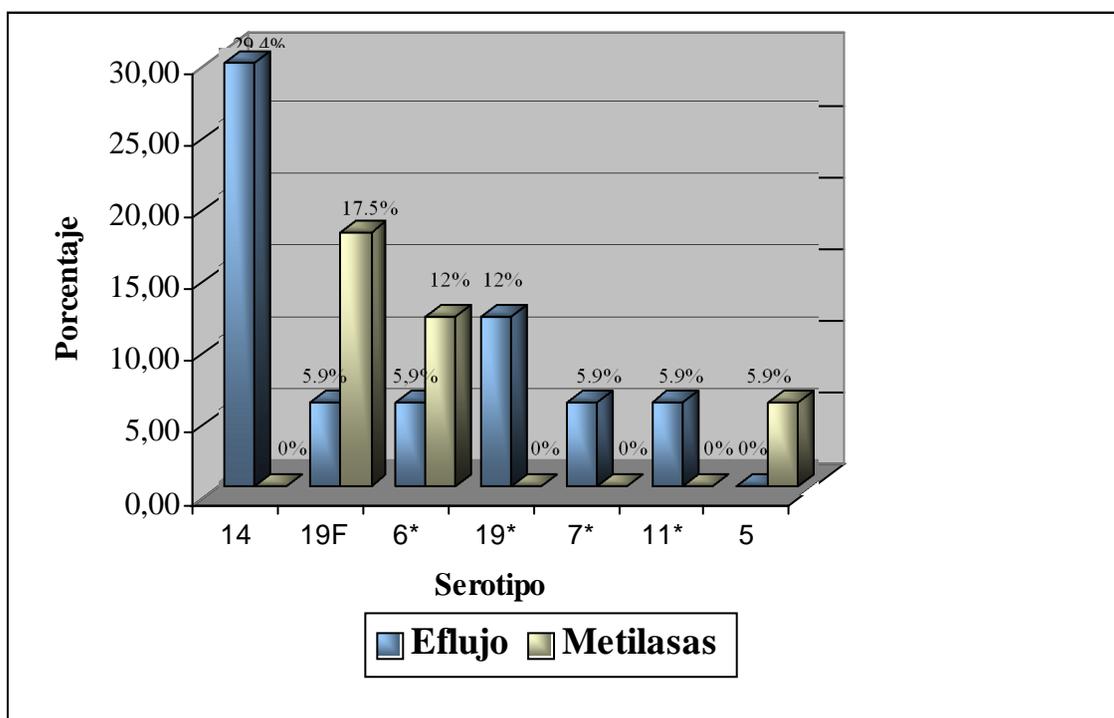


Figura N° 7 Del total de aislados de *Streptococcus pneumoniae* que presentan resistencia a macrólidos 17/100 los serotipos mas frecuentes con mecanismo de resistencia Eflujo (Fenotipo M) fueron el 14 con 5(29.4%) y 19F con 4(23.4%) respectivamente.

Tabla N° 8
Distribución de los mecanismos de Resistencia a Macrólidos en cepas de *Streptococcus pneumoniae* en función a la Ciudad en niños < 5 años en Bolivia
Julio 2000 a Diciembre 2005

Ciudad	Mecanismos de Resistencia				Total	
	EFLUJO	%	METILASAS	%		%
Cochabamba	4	23.4 %	3	17.5%	7	41%
La Paz	3	17.5 %	2	12%	5	29.4%
Santa Cruz	3	17.5 %	1	5.9%	4	23.4%
Sucre	1	5.9 %	0	0%	1	5.9 %
Total	11	65%	6	35%	17	100%

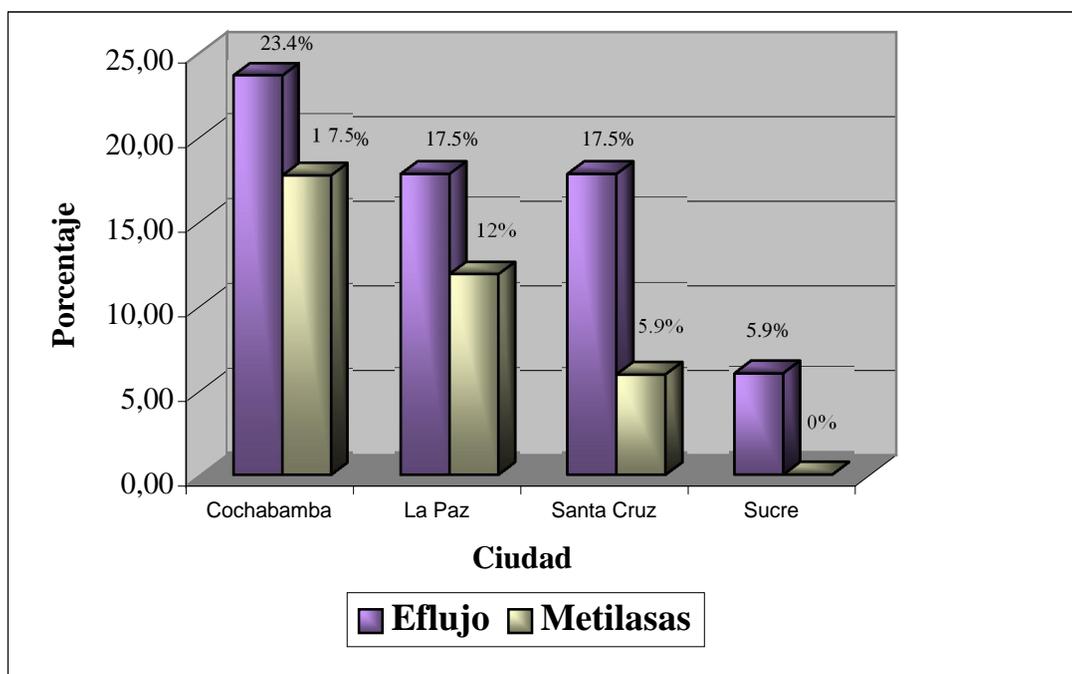


Figura N° 8 Del total de aislados de *Streptococcus pneumoniae* 17/100 la ciudad más frecuente en la que se observa la resistencia frente a macrólidos es Cochabamba 7(41 %) de los cuales el mayor porcentaje de la resistencia es debida a Eflujo con 4(23.4%).

VIII. DISCUSIONES

- ❖ Considerando a los países Europeos y Americanos en los que se han desarrollado estudios similares al presente, este es el primer estudio realizado en Bolivia donde el nivel de resistencia a macrólidos encontrados ubica a nuestro país entre aquellos con baja resistencia a nivel mundial ya que se observa que el 83% son sensibles a macrólidos y solo el 17% tienen resistencia a este grupo de antimicrobianos. (Tabla N° 1 y Figura N° 1). Por lo que se debe ir vigilando la resistencia a este grupo de antimicrobianos en nuestro país.

Se ha observado que la resistencia a macrólidos ha aumentado en el mundo teniendo como datos Asia (92%), Europa (45%), EUA (35%) y Argentina (10%).

- ❖ La resistencia a macrólidos en nuestro país es bajo nivel siendo la modificación del blanco de antimicrobianos el principal mecanismo de resistencia de los neumococos, ya que el estudio muestra un porcentaje mayor para el fenotipo M (Mecanismo de Resistencia por Eflujo) con un 65% (11) (Tabla N° 2 y Figura N° 2) esto está asociado a diferentes factores y una de ellas es que el *Streptococcus pneumoniae* es altamente competente para la transformación genética lo cual lleva al surgimiento de nuevas cepas resistentes en respuesta a la presión selectiva ejercida por los antimicrobianos debido al uso indiscriminado de ellos.

Estos resultados coinciden con la literatura y con otros estudios realizados en diferentes países tales como América donde la resistencia es de bajo nivel es decir que predomina el fenotipo M a diferencia de países Europeos, Asiáticos y Africanos donde la resistencia es de alto nivel donde predominan los fenotipos MLS_B.^{7, 9, 13, 21}

- ❖ Los resultados muestran que el grupo atareo más afectado son menores de 1 año con un 53% (9) (Tabla N° 3 y Figura N° 3), esto es debido a que este grupo representa el grupo de mayor riesgo ya que son aquellos que tienen 3 a 4 veces mayor riesgo de presentar neumonías y otros procesos infecciosos en especial si se asocian a factores tales como sala de cunas guarderías, desnutrición, bajo peso y/o patología asociada.

Además en esta edad es cuando el consumo de antimicrobianos es mayor y se encuentra establecido que existe relación entre consumo de antimicrobianos y la aparición de resistencia.

Los lactantes, niños menores y pacientes inmunocomprometidos son la edad más vulnerable ya que están particularmente expuestos a padecer infecciones en muchas ocasiones con riesgo de vida como sucede con la neumonía severa y la meningitis.

La distribución que se observa en el estudio es mayor para aquellos mecanismos mediado por metilasa con un 35%(6) esto se debe a que en los procesos invasivos el esquema de tratamiento debe ser de amplio espectro y además por lo general se agregan antimicrobianos que cubran las bacterias más frecuentes.

- ❖ La fuente de aislamiento en la que se observó mayor distribución de cepas resistentes fue Hemocultivos con un 7(41%) (Tabla Nº 4 y Figura Nº 4) esto se debe a la alteración de los mecanismos de defensa de las vías respiratorias donde *Streptococcus pneumoniae* produce diseminación hematológica. Además se observó un 6(35%) en LCR esto puede ser debido a la entrada directa de la bacteria al espacio meníngeo, una complicación de la neumonía ó fracaso terapéutico.

Los resultados mencionados anteriormente coinciden con la literatura siendo que en un estudio en el Servicio de Navarra durante 2 años (2000 -2002) se obtuvieron 465 aislados de *Streptococcus pneumoniae* de los cuales 166(35.7%) procedían de Hemocultivos y LCR 12(7.2%).⁴⁴

- ❖ Hacia comienzos del año 2000 se habrían obtenido más de 4000 aislados, de los que más de 1200 fueron apartados por ese país (Grupo SIREVA) obteniéndose datos de interés donde la mayoría de los casos (68%) eran menores de 1 año con neumonía y meningitis fueron las localizaciones más frecuentes.⁴⁵ En nuestro estudio el 53%(9) tenían como diagnóstico Neumonía y el 35%(6) Meningitis. (Tabla Nº 5 y Figura Nº 5).

- ❖ Los mecanismos asociados a Tamizaje de Oxacilina muestran el (Tabla N° 6 y Figura N° 6) un mayor porcentaje relacionado a SP(Sensibilidad a Penicilina) esto es un dato importante debido a que posiblemente entre ambos grupos de antimicrobianos no existe dependencia, ya que el mecanismo de acción es diferente.
- ❖ Cabe señalar que los mecanismos de resistencia a macrólidos asociados a los serotipos en orden de frecuencia son el 14 con un 5(29%) y 19F con un 4(24%) como se observa (Tabla N° 7 y Figura N° 7). La literatura menciona que ciertos Serotipos presentan con mayor frecuencia que otros resistencia a los antimicrobianos.⁶⁸ Los resultados obtenidos coincide con datos que se tienen en el LNRBC (Unidad Patógenos Respiratorios) ya que los serotipos que predomina en nuestro país son 14, 19 y 6B.
- ❖ La vigilancia abarca hospitales con mayor población pediátrica es por esta razón que el departamento de Cochabamba presenta mayor porcentaje de resistencia a macrólidos, siendo que este fue el que envió mayor cantidad de aislados en el periodo de Julio 2000 A Diciembre 2005.

IX. CONCLUSIONES

- ❖ El nivel de resistencia encontrado en las cepas de *Streptococcus pneumoniae* procesados en el Laboratorio Nacional de Referencia en Bacteriología Clínica ubica a nuestro país entre aquellos con baja resistencia a macrólidos a nivel mundial comparado con otros países, sin embargo se debe tener cuidado en la interpretación de estos datos ya que por el número de aislamientos procesados de *Streptococcus pneumoniae* aún no se puede extrapolar a toda Bolivia.
- ❖ De 100 cepas de *Streptococcus pneumoniae* procesados por la prueba del doble disco 83% son sensibles a macrólidos y solo 17% resistentes.
- ❖ La resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a macrólidos es causado por dos fenotipos el M (65%) y MLS_B (35%) de tipo constitutivo, en ninguno de las cepas se observó el fenotipo inducido, siendo el fenotipo M el responsable de la mayoría de las cepas resistentes.
- ❖ La mayor distribución de cepas resistentes a Macrólidos que se encontró fue en niños menores de 1 año. Donde se observó predominio del fenotipo MLS_B (Mecanismo de resistencia por Metilasa)
- ❖ La mayor distribución de cepas resistentes a Macrólidos que se encontró fue en aquellos aislamientos que proceden de Hemocultivos seguido LCR. Donde se observó predominio del fenotipo M (Mecanismo de resistencia por Eflujo)
- ❖ La mayor distribución de cepas resistentes a Macrólidos que se encontró fue en aquellos con diagnóstico de Neumonía seguido de Meningitis. Donde se observó predominio del fenotipo M (Mecanismo de resistencia por Eflujo).

- ❖ La mayor distribución de cepas resistentes a Macrólidos que presentan el fenotipo M (Mecanismo de resistencia por Eflujo) fueron sensible a la penicilina de acuerdo con la prueba de Tamisaje de Oxacilina. Donde se observo predominio del fenotipo M (Mecanismo de resistencia por Eflujo)

- ❖ El Serotipo mas frecuente encontrado en cepas resistentes a Macrólidos con el fenotipo M (Mecanismo de resistencia por Eflujo) fue el 14 y 19F.

- ❖ La mayor distribución de cepas resistentes a Macrólidos se encontró en el departamento de Cochabamba. Donde se observo predominio del fenotipo M (Mecanismo de resistencia por Eflujo)

X. RECOMENDACIONES

- ❖ El laboratorio de Bacteriología Clínica tiene un papel fundamental en la caracterización fenotípica y genotípica de las bacterias por lo tanto se recomienda realizar un seguimiento de los aislados que evidenciaron resistencia a macrólidos haciendo uso de la Biología Molecular para la caracterización de dichas cepas en el estudio genotípico, de esta manera se podrá contribuir en la vigilancia microbiológica.
- ❖ Los principales factores de riesgo para el desarrollo de la resistencia han sido ampliamente estudiados por lo tanto se debe tener conocimiento de la prevalencia y patrones de Resistencia del área geográfica, así como la presencia de factores de riesgo de la infección por cepas resistentes.
- ❖ El comité internacional de Expertos en el tema junto con asesores de la división de Vacunas e Inmunización y el Grupo SIREVA aconsejan desarrollar un sistema de vigilancia para reconocer cambios temporales en los Serotipos prevalentes y su resistencia antimicrobiana y crear un banco de *Streptococcus pneumoniae* que permita en un futuro realizar estudios retrospectivos y evaluar nuevos diagnósticos y terapéuticos.
- ❖ La serotipificación de *Streptococcus pneumoniae* de aislados de niños menores de 5 años con neumonía y meningitis permiten determinar las potenciales coberturas que proporcionan las fórmulas de las vacunas lo que permite disminuir a aquellos portadores nasofaríngeos.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Camponovo Rossana C. Problemas de resistencia en *Streptococcus pyogenes*. Rev. Chil. Infectol.2002;19(2):10-13
2. Seral Cristina Seral; Castillo Javier; Rubio-Calvo Carmen; Fenoll Asunción; García Concepción; Gómez-Luis Rafael. Distribution of resistance genes *tet(M)*, *aph3 -III*, *catpC194* and the integrase gene of Tn *I545* in clinical *Streptococcus pneumoniae* harbouring *erm(B)* and *mef(A)* genes in Spain: DOI: Journal of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology: 2001 .47, 863–866
3. Organización Panamericana de la Salud. Programa Especial para vacunas e Inmunización (Sireva). Manual de *Streptococcus pneumoniae*.2002
4. Joklik K. Wolfganag; Willete P. Hilda. Microbiología de Zinsser. 18.ed.. Bogotá: Ed. Médica Panamericana
5. Stuart Walker. Microbiología .1ªed.México: Mc Graw. Hill Interamericana S.A.;2000.p.129-132
6. Davis Bernard. Tratado de Microbiología. 3ªed.México: Editores Salvat;1984.p.489-497
7. Depardieu Florence and Courvalin Patrice Mutation in 23S rRNA Responsible for Resistance to 16-Membered Macrolides and Streptogramins in *Streptococcus pneumoniae*. American Society for Microbiology: Jan. 2001.Vol. 45, No. 1 p. 319–323 Copyright © 2001

8. Gundfán J; Gassiot Nuño C, Piño AP, Gómez Ramos M, Hernández Lima L. Tratamiento de la Neumonía Extrahospitalaria . Acta Médica.2000;(1-2):101-105
9. Moreno Jaime; Phadanouvong Vienviley; Castañeda Elizabeth. Vigilancia Molecular de aislamientos invasores de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la penicilina en niños Colombianos menores de 5 años . 2004. Vol.24:298-301
10. Bergolio Remo M. ANTIBIOTICOS.5.ed.. Bogotá: Ed. Médica Panamericana S.A.,1993
11. Cercenado Mansilla Emilia. Resistencia a los antimicrobianos. Madrid. España: Hospital General Universitario” Gregorio Marañón”Servicio de Microbiología: Disponible en:http://www.ciencia_hoy.retina.ar/hoy50/bacterias4.htm
12. Pacheco Chirinos Julio. Los mecanismos de resistencia microbiana.- Arequipa. Perú: Facultad de Medicina de la Universidad Católica de Santa María y de San Agustín Disponible en:<http://www.mpsp.org/mpsp/Ponencias/Inducción.pdf>
13. Jáuregui Peredo L.E. Antimicrobianos: Uso Terapéutico en Infectología Clínica.1ªed..Bolivia: Plural;2002.p.201 -212
14. Gundfán Gonzáles J, Barreto Penie J, Rodríguez Rodríguez MA, Pino Alfonso P, Alonso Lim N. MACROLIDOS. Acta Médica.1998;8(1):71-74.
15. Giovanetti Eleonora; Brenciani Andrea; Lupidi Remo; Marilyn C. Roberts; Varaldo Pietro E. Varaldo I. Presence of the *tet* (O) Gene in Erythromycin- and Tetracycline-Resistant Strains of *Streptococcus pyogenes* and Linkage with either the *mef*(A) or the *erm*(A) Gene. Antimicrobial agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology: 2003. Vol. 47, No. 9 p. 2844 –2849 Sept Copyright © 2003

16. García Rodríguez JA., García Sánchez E. Resistencia Bacteriana a Antimicrobianos: Su importancia en la toma de decisiones. Madrid -Barcelona:1997.p.639-650
17. Lectercq Roland; Courvalin Patrice. Resistance to Macrolides and Related Antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrobial agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology: 2002. Vol. 46, No. 9. p. 2727–2734 Septiembre Copyright © 2002
18. Cresti Stefania; Lattanzi Maria ; Zanchi Alessandra ; Montagnani Francesca; Pollini Simona; Cellesi Carla; Rossolini Gian Maria. Resistance Determinants and Clonal Diversity in Group A Streptococci Collected during a Period of Increasing Macrolide Resistance American Society for Microbiology. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2002, Vol. 46, No. 6 p. 1816–1822 Copyright © 2002
19. Klaasen Corne; Mouton Johan. Molecular Detection of the Macrolide Efflux Gene: To Discriminate or Not To Discriminate between *mef* (A) and *mef* (E). American Society for Microbiology. Antimicrobial Agents and Chemotherapy: 2005 Vol. 49, No. 4 p. 1271–1278 Apr. Copyright © 2005, All Rights Reserved.
20. Manual de pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Sección *Streptococcus pneumoniae*
21. Mcgee Lesley; Clubmen Keith p.; Avril Wasa; Thora Capper, Brink Adrian. The antibiotics surveillance forum of south Africa Serotype 19F Multiresistant Pneumococcal Clone Harboring Two Erythromycin Resistance Determinants [*erm*(B) and *mef*(A)] in South Africa. American Society for Microbiology. Antimicrobial Agents and Chemotherapy .2001 Vol. 45, No. 5. p. 1595–1598.May Copyright © 2001

22. Reinert Ralf Rene; Wild Angela; Appelbaum Peter; Lu'tticken Rudolf; Yu'cel Cil Murat; Lahham Adnan. Ribosomal Mutations Conferring Resistance to Macrolides in *Streptococcus pneumoniae* Clinical Strains Isolated in Germany. American Society for Microbiology: Antimicrobial agents and Chemotherapy. 2003 Vol. 47, No. p. 2319–2322
23. Reinert Ralf Rene; Simic Smiljana; Al-lahham Adnan; Reinert Susanne ; Lemperle Maria; Lu'tticken Rudolf .Antimicrobial Resistance of *Streptococcus pneumoniae* Recovered from Outpatients with Respiratory Tract Infections in Germany from 1998 to 1999: Results of a National Surveillance Study. American Society for Microbiology Journal of Clinical Microbiology: 2001. Vol. 39, No. 3, p. 1187–1189 March Copyright © 2001,. All Rights Reserved.
24. Kresken Michael; Henrichfreise Beat; Bagel Simone; Brauers Johannes; Wiedemann Bernd. High Prevalence of the *ermB* Gene among Erythromycin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Germany during the Winter of 2000-2001 and In Vitro Activity of Telithromycin. Antimicrobial agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology: 2004 Vol. 48, No. 8 p. 3193–3195 .Aug. Copyright © 2004, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
25. Morosini María-Isabel; Cantón Rafael; Loza Elena, Negri Maria Cristina, Gala Juan Carlos; Almaraz Felisa; Baquero Fernando. In Vitro Activity of Telithromycin against Spanish *Streptococcus pneumoniae* Isolates with Characterized Macrolide Resistance Mechanisms. American Society for Microbiology: Antimicrobial agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology: Antimicrobial agents and Chemotherapy. 2001. Vol. 45, No. 9 p. 2427–2431 Sept. Copyright © 2001
26. Montanari Maria P.; Cochetti Ileana; Mingoia Marina Mingoia; Varaldo Pietro E. Varaldo. Phenotypic and Molecular Characterization of Tetracycline - and Erythromycin-Resistant Strains of *Streptococcus pneumoniae*. American Society for

Microbiology. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2003, Vol. 47, No. 7 p. 2236–2241 Copyright © 2003

27. Kozlov Roman S.; Bogdanovitch Tatiana M.; Appelbaum Peter C.; Ednie Lois; Stratchounski Leonid S.; Jacobs Michael R.; Bozdogan Bu'lent .Antistreptococcal Activity of Telithromycin Compared with Seven Other Drugs in Relation to Macrolide Resistance Mechanisms in Russia. Antimicrobial agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology: 2002. Vol. 46, No. 9 p. 2963 – 2968 Sept Copyright © 2002
28. Bean David C. and Klena D. John Prevalence of *erm*(A) and *mef*(B) erythromycin resistance determinants in isolates of *Streptococcus pneumoniae* from New Zealand. DOI: Journal of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology: 2002 50, 597–599
29. Hoon Song Jae; Chang Hyun- Ha; Suh Yoeun; Jung Sook-In; Sup Oh Won; Peck Kyong Peck; Yang Yonghong; Chongtha leong; et. al. Macrolide resistance and genotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: a study of the Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens. DOI: Journal of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology: 2004. 53, 457–463 .Advance Access publication 12 February 2004
30. Soo Ko Kwan and Hoon Song Jae. Evolution of Erythromycin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* from Asian Countries That Contains *erm*(B) and *mef*(A)Genes. Journal of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology:2004.190,739-747
31. Tiemei Zhao; Xiangqun Fang; Youning Liu. Resistance Phenotypes and Genotypes of Erythromycin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Beijing Shenyang, China. Antimicrobial agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology: 2004. Vol. 48, No. 10 p. 4040–4041 Oct. Copyright © 2004

32. Low Donald E.; Azavedo de Joyce; Karl Weiss, Mazzulli Tony; Kuhn Magdalena; Church Deirdre; et. al. Isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Canada during Antimicrobial Agents and Chemotherapy .Antimicrobial Resistance among Clinical,2000. Vol. 46, No. 5 p. 1295–1301 Copyright © 200
33. Tait-Kamradt Amelia; Clancy Joanna, Cronan Melissa; Dib -Hajj Fadia; Lillian; Wondrack Wei Yuan. Sutcliffe *mefE* Is Necessary for the Erythromycin-Resistant M Phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. American Society for Microbiology: Antimicrobial agents and Chemotherapy.1997. Vol. 41, No. 10 p. 2251–2255 Oct. Copyright © 1997
34. Hoban Daryl J.; Aleksandra k. Wierzbowski; Kim Nichol; George g. Zhanel Macrolide-Resistant *Streptococcus pneumoniae* in Canada during 1998–1999: Prevalence of *mef(A)* and *erm(B)* and Susceptibilities to Ketolides. American Society for Microbiology. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2001 Vol. 45, No. 7 p. 2147–2150 July Copyright © 2001, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
35. Setas A. Gil; Mozón A.; Torroba L.; Barricarte A.; Irrnc García JJ.; Petil A. et. al. Sensibilidad antibiótica y recomendaciones de tratamiento para *Streptococcus pneumoniae*. 2004 Vol.37
36. Rosales Rojas P, Ruiz Aranda E. Manual de procedimientos Bacteriológicos para *Streptococcus pneumoniae*, *H. influenzae* y *N.meningitidis* .1ªed..La Paz-Bolivia: OPS/ OMS;2005.P7-21
37. Torrico E, Trigo Agudo C. Manual de procedimientos bauer kirby y su control de calidad. La Paz-Bolivia: OPS / OMS;2003

38. Duran L, Damián E, Trigos. Generalidades y procedimientos del antibiograma. Mecanismos de Resistencia en Macrólidos, Lincosaminas y Estreptograminas. La Paz-Bolivia: INLASA;2006.P38
39. Trigos Agudo C, Torrico E, Riera E, Aguilar S. Manual de procedimientos bacteriológicos en sensibilidad y resistencia en antimicrobianos: Antibiograma para *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus spp.* 1ªed. La Paz-Bolivia: OPS/OMS;2003.P25-36
40. Farrel David L; Jenkins G. Stephen. Distribution across the USA of macrolide resistance and macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* isolates collected from patients with respiratory tract infections: PROTEKT US 2001-2002. DOI: Journal of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology: 2004 .54 2003, p. i17-i22
41. Viciano I, Garcia López V, Mariscal A, Sánchez Bernal A, Clavijo E, Martín Et.al. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica: Aspectos Microbiológicos y Clínico Epidemiológicos de los aislados de *Streptococcus pneumoniae* durante 2 años. SEIMC.2004;22(1):13-17
42. Vester Birte and Douthwaite Stephen. Macrolide Resistance Conferred by Base Substitutions in 23S RNA .American Society for Microbiology: Jan. 2001. Vol. 45. No. 1 p. 1–12 Copyright © 2001
43. Waites Ken B.; Jones Kellie E.; Hyo Kim Kyung ; Moser Stephen A.; Crystal N. Johnson; Hollingshead Susan K. et. al. Dissemination of Macrolide-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates Containing Both *erm(B)* and *mef(A)* in South Korea. DOI: Journal of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology: 2003 Vol. 41, No. 12 2003, p. 5787–5791 Dec. Copyright © 2003

44. A.Gil Setas; Mozon L.Torroba; Barracorte J. Garcia;et.al. Sensibilidad antibiótica y recomendaciones de tratamiento para *Streptococcus pneumoniae*. Laboratorio de Microbiología. Navarra. Vol37.2004
45. Castañeda Elizabeth. Vigilancia Molecular de aislamiento invasores de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina en niños Colombianos menores de 5 años. Instituto Nacional de Salud.
46. Tubau Quintano F.; Linares Josefina, Martín Rogelio. Resistencia antibiótica en *Streptococcus pneumoniae*. Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas. Hospital Llobregat. Barcelona

ANEXOS

- ANEXO N° 1** **PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO DE *Streptococcus pneumoniae***
- ANEXO N° 2** **MECANISMOS GENERALES DE RESISTENCIA BACTERIANA**
- ANEXO N° 3** **PROCESO DE LAS MUESTRAS Y AISLADOS BACTERIANO**
- ANEXO N° 4** **TABLAS DE INTERPRETACION**
(Zone Diameter Interpretative Standards Breakpoints for
***Streptococcus pneumoniae* -Tabla 2G)**
- ANEXO N° 5** **FICHAS DE CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO**
- ANEXO N° 6** **FICHAS DE CONTROL: ANTIMICROBIANOS**
- ANEXO N° 7** **FICHA EPIDEMIOLOGICA**
- ANEXO N° 8** **FICHA DE LABORATORIO**

ANEXO N ° 1

PRUEBAS DE DIAGNOSTICO

PRUEBA DE CATALASA

FUNDAMENTO.-

La prueba permite comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo, la excepción principal es *Streptococcus*.

La enzima catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. La liberación de oxígeno se observa por la formación de burbujas.

MATERIAL.-

Portaobjetos

Peróxido de hidrógeno al 3% (10 vol.)

Control positivo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Control negativo: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

PROCEDIMIENTO.-

- Con una aguja o asa bacteriológica recoger una colonia de un cultivo puro de 18 a 24 hrs. de incubación (de la parte central de la colonia evitando arrastrar el medio).
- Colocar la colonia en un portaobjetos.
- Agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 3% sobre la colonia.
- Paralelamente, realizar el mismo procedimiento con los controles.

LECTURA.-

Inmediatamente, observar la formación de burbujas.

INTERPRETACIÓN.-

La formación de burbujas por liberación de oxígeno indica una reacción positiva.

La ausencia de burbujas indica una reacción negativa.

PRUEBA DE LA OPTOQUINA

FUNDAMENTO.-

La optoquina es un compuesto químico, clorhidrato de etilhidrocupreína, impregnado en discos de papel filtro a una concentración de 5 µg que inhibe el crecimiento del *Streptococcus pneumoniae*. Es completamente soluble en agua y se difunde rápidamente en el medio. Las colonias de *S. pneumoniae* alrededor del disco son lisadas debido a cambios de tensión superficial, produciendo una zona de inhibición.

La optoquina (hidrocloruro de etilhidrocupreína), es un compuesto al cual *S. pneumoniae* es susceptible en bajas concentraciones (5 µg o concentraciones menores) y por lo tanto inhibe su crecimiento.

La optoquina puede inhibir el crecimiento de otros *Streptococcus* alfa hemolíticos, pero en concentraciones altas; es soluble en agua y se difunde rápidamente en el medio, por lo tanto discos de papel de filtro impregnados con optoquina pueden ser colocados directamente sobre la superficie del agar para la realización de la prueba.

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

El disco es colocado sobre una placa de agar sangre ovina a 5%, la cual ha sido inoculada a partir de una colonia del aislamiento a investigar. Después de 18 -24 horas de incubación a 35° C en ambiente de CO₂ (5-7%), la caja es examinada para observar la inhibición del crecimiento alrededor del disco.

Zonas de inhibiciones mayores o iguales a 14 mm son interpretadas como susceptibles, lo que permite realizar una identificación presuntiva del aislamiento como *S. pneumoniae*.

Dado que algunos aislamientos de *S. pneumoniae* son CO₂ dependientes, se recomienda la incubación en ambiente del CO₂ al 5-7%. Si la prueba es incubada en aerobiosis, el crecimiento bacteriano puede presentarse ligeramente disminuido y se interpreta como una zona mayor de inhibición (tamaño falso de la zona de inhibición)

Algunos aislamientos presentan zonas de inhibición dudosas o cuestionables (entre 6 y 14 mm), en esos casos se debe realizar como prueba confirmatoria la solubilidad en bilis; de esta manera se descartan las especies alfa hemolíticas que presentan zonas intermedias de inhibición.²⁰

MATERIAL.-

Discos de optoquina (5 µg)

Placa de agar sangre de carnero al 5 %

Control positivo: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

Control negativo: *Streptococcus viridans*

PRUEBA DE SOLUBILIDAD EN BILIS

FUNDAMENTO.-

Las sales biliares utilizadas en las pruebas de solubilidad en bilis son, por lo general, el desoxicolato de sodio y taurocolato de sodio ya que son los compuestos líticos más activos entre los diversos ácidos biliares. Estos se encuentran como aniones cuando están en un pH alcalino.

El desoxicolato de sodio es un ácido monobásico que tiene un pH ligeramente alcalino cuando está en solución acuosa tal como la sal sódica.

Las sales biliares hacen descender la tensión superficial en la interfase medio – membrana y también provoca una descomposición de la membrana celular.

Las sales de bilis específicamente el desoxicolato y el taurocolato de sodio tienen la capacidad de lisar *S. pneumoniae*, cuando en solución se adicionan a una suspensión de microorganismos (suspensión realizada a partir de un cultivo fresco de *S. pneumoniae* de 18-24 horas en agar sangre ovina al 5%).

S. pneumoniae produce enzimas autolíticas que son las responsables de la característica umbilicada de la colonia en cultivos viejos. La adición de la solución de sales de bilis a la suspensión de la bacteria, acelera el proceso de lisis; proceso asociado con la disminución de la tensión superficial entre el medio y la membrana celular bacteriana.

La prueba de solubilidad en bilis se puede realizar a partir de cultivos en caldo o en agar sangre ovina al 5%. Dado que la solución de desoxicolato de sodio puede precipitarse a pH de 6,5 o menor, cuando se realiza la prueba de solubilidad en bilis a partir de cultivos en caldo, el medio debe alcalinizarse para evitar una reacción falsa negativa.³

MATERIAL.-

Desoxicolato de sodio al 10 %

Tubo N° de la escala de Mc Farland

Control positivo: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

Control negativo: *Streptococcus viridans*

PROCEDIMIENTO.-

- A partir de un cultivo puro, preparar una suspensión del microorganismo en solución salina estéril con una turbidez igual al tubo N° 2 de la escala de Mc Farland.
- Para cada microorganismo utilizar dos tubos, rotular uno como prueba (P) y otro como control (C).
- Colocar en cada tubo 0.5 ml de la suspensión salina del microorganismo.
- Añadir al tubo (P) 0.5 ml de desoxicolato de sodio y al tubo (C) 0.5 ml de solución salina estéril.
- Mezclar suavemente los tubos.
- Incubar a 35 ° C en baño María o en la estufa durante 2 hrs.

LECTURA.-

Se debe realizar haciendo la comparación de los tubos (P) y (C), a las dos horas de incubación.

INTERPRETACIÓN.-

La solución clara o aclarándose (solubilidad parcial) indica una prueba positiva.
La solución turbia indica una prueba negativa.

PRUEBA DE LA OXACILINA

FUNDAMENTO.-

Las penicilinas y cefalosporinas actúan uniéndose e inhibiendo la acción de las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular bacteriana llamadas proteínas ligadoras de penicilina (PLP).

La prueba de difusión en agar o método de Bauer Kirby se basa en la formación de un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de un disco de papel filtro impregnado con antimicrobiano a probar (oxacilina 1 ug).

La oxacilina es una penicilina isoxazólica semisintética, ácido estable y de degradación lenta que se emplea para determinar la susceptibilidad a la penicilina.

MATERIAL.-

Hisopos estériles

Pinzas estériles o dispensador

Agar Mueller – Hinton con sangre ovina al 5%

Tubo N° 0.5 de la escala de Mc Farland

Control de disco: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

PROCEDIMIENTO.-

- A partir de un cultivo puro de 18 a 24 hrs. de *Streptococcus pneumoniae*, tomar varias colonias.
- Colocarlas directamente en solución fisiológica estéril.
- Ajustar la suspensión a una turbidez equivalente al tubo N° 0.5 de la escala de Mc Farland.
- Inmediatamente después, humedecer el hisopo estéril en el tubo, rotarlo y presionarlo contra las paredes, para eliminar el exceso de la suspensión.
- Inocular en la superficie seca de las cajas de Agar MH con sangre ovina al 5%, estriando la superficie en tres direcciones.
- Colocar los discos con los antimicrobianos a probar, presionando suavemente, en la superficie inoculada con pinzas o dispensador.
- Incubar en una atmósfera de 5 a 7% de CO₂ a 35 ° C durante 20 a 24 hrs.

LECTURA.-

Medir los diámetros de completa inhibición de crecimiento. **NO** medir la zona de hemólisis.

INTERPRETACIÓN.-

Un halo de inhibición a 20 mm=Susceptible a la penicilina, ampicilina amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, cefalosporinas de 1º, 2º y 3º generación, imipenem y loracarbef.

Un halo de inhibición a 19 mm= indica una resistencia franca o susceptibilidad disminuida a la penicilina, por lo que deberá determinarse la CIM.

Interpretar con la tabla NCCLS (Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests).

SEROTIPIFICACION (REACCION DE QUELLUNG)

FUNDAMENTO.-

Es un procedimiento confirmatorio para *Streptococcus pneumoniae*, el cual utiliza una mezcla de sueros polivalentes producidos por conejos (anticuerpos) los cuales reaccionan con el polisacárido capsular (antígeno) haciendo evidente la cápsula al ser observado al microscopio.

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 de *Streptococcus pneumoniae*.

Hasta el momento hay 90 serotipos reconocidos de *Streptococcus pneumoniae*. Los primeros 80 fueron identificados en 1957 y tres más fueron adicionados durante los siguientes 28 años. En 1985, Austrian describió el tipo 16A y Henrichsen en 1995 describió los tipos 10B, 10C, 12B, 25A Y 330.

Es interesante mencionar la manera como los diferentes serotipos de *S. pneumoniae* han sido denominados o identificados. El primer serotipo fue llamado F, por primero (first), y los siguientes serotipos los identificaron con los sufijos A, B, etc, basados en el orden de identificación del descubrimiento. Una excepción a este sistema de identificación son los microorganismos pertenecientes al serotipo grupo 9.

Si el aislamiento de *S. pneumoniae* es sensible a la optoquina, la identificación puede ser confirmada usando el Omni suero, el cual es una mezcla de sueros polivalentes producido en conejos, este suero es empleado en la reacción capsular o prueba de Neufeld Quellung. El suero contiene 83 antisueros anti -*S. pneumoniae* y es producido por el Statens Seruminstitut de Copenhague, Dinamarca.

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 (anticuerpo), que reacciona con el polisacárido capsular (antígeno), haciendo evidente la cápsula cuando se observa al microscopio. Franz Neufeld publicó en 1902 el descubrimiento de este fenómeno llamado reacción de Quellung (hinchazón).

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. 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 como no serotipificable basado solamente en el resultado de la reacción con el omni -suero.

El omni-suero puede ser usado en exámenes directos a partir de muestras clínicas como esputos, exudado pleural, líquido cefalorraquídeo cuando suficientes bacterias son visibles al microscopio. Este suero suele unirse a látex o a la proteína A del *Staphylococcus aureus*, cepa Cowan (coaglutinación) en reactivos comerciales.

Los aislamientos de *S. 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.

Ocasionalmente, algunos aislamientos de *Streptococcus* alfa ~ hemolíticos, especialmente el *Streptococcus mitis* presentan reacción cruzada con el omni-suero. Este tipo de reacción cruzada parece limitarse a algunos métodos usados para serotipificar las cepas como son la inmunofluorescencia, la inmunolectroforesis, la aglutinación de látex y la coaglutinación. Esa falsa positividad puede ser explicada por el hecho de que el antisuero capsular es preparado a partir de células totales, y por lo tanto puede contener anticuerpos contra el polisacárido C (C-Ps) común a la pared celular de todos los neumococos. Ya que ocasionalmente algunas cepas de *S. grupo viridans* poseen C-Ps, esto produce la reacción cruzada observada. Debido a que el anticuerpo C-Ps es no capsular, la reacción cruzada no debe observarse si se utiliza la prueba de Quellung, como técnica o método de serotipificación.

El omni-suero, 14 pools y 46 antisueros de tipo o grupo se encuentran disponibles comercialmente en el Statens Serum Institut en Copenhagen. El antisuero de ~'tipos" representa una fórmula antigénica simple para cada tipo. El antisuero usado para identificar el "grupo" representa una colección de serotipos cada uno con diferente fórmula antigénica. El antisuero de "grupo" presentará reacción cruzada con todos los tipos dentro del grupo. Para realizar la identificación de factor o sub tipificación de grupo se requiere hacer tipificaciones usando el antisuero que identifica el factor; y el tipo al cual pertenece el aislamiento se determina por el patrón de reacciones que se observe con el conjunto específico de sueros que determinan el factor. En un conjunto completo existen 60 factores. Los antisueros para identificar factores no se encuentran disponibles comercialmente.

En 1993 fue estandarizada, una técnica simplificada para la serotipificación de *S. pneumoniae*. El sistema usa 12 pool es y un tablero de identificación. Con este sistema se pueden identificar 21 de los serotipos o serogrupos más comúnmente distribuidos en el mundo. Todos esos serotipos forman parte de la vacuna polivalente contra *S. pneumoniae* (vacuna con 23 serotipos).

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

MATERIAL.-

Portaobjetos

Cubreobjetos

Asas desechables de 1 μ l

PBS pH 7.38

Azul de metileno al 1% (opcional)

Antisueros polivalentes (12 pools)

PROCEDIMIENTO.-

- Colocar 1 μ l de PBS sobre el portaobjetos.
- Tocar con el asa una colonia de *S. pneumoniae* y suspenderla sobre la gota de PBS (no debe quedar una suspensión densa).
- Añadir 1 μ l del antisuero y mezclar. Se debe tener el cuidado de utilizar una asa diferente para cada antisuero probado.
- Colocar en el cubreobjetos una gota de azul de metileno y cubrir la preparación.
- Colocar una gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos.

LECTURA.-

Observar al microscopio con el objetivo de 100x.

INTERPRETACIÓN.-

La visualización de la cápsula, la observación de un hinchamiento de la bacteria y una aglutinación de las bacterias indica una reacción positiva.

La ausencia de la cápsula indica una reacción negativa.

ANEXO N° 2
MECANISMOS GENERALES DE RESISTENCIA

1) Interferencia en el transporte de la droga a través de la membrana o en su acumulación citoplasmática

MECANISMO	DROGAS AFECTADAS
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cambios en los canales porínicos de la membrana externa. ▪ Alteraciones de la concentración de cationes divalentes, por cambios en los LPS de la membrana externa ▪ Permeasa ▪ Reflujo 	<p style="text-align: center;">-lactámicos Fluoroquinolonas Aminoglucósidos Fluoroquinolonas</p> <p style="text-align: center;">Eritromicina en <i>S. epidermidis</i> Tetraciclinas -lactámicos Cloranfenicol, Macrólidos, Fluoroquinolonas</p>

2) Cambios relacionados con el sitio de acción de la droga

MECANISMO	DROGAS AFECTADAS
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alteración de: <ul style="list-style-type: none"> - las proteínas ligadoras de penicilinas - la proteína S12 ribosomal - la dihidroptero sintetasa - la ARN polimerasa (subunidad) - la dihidrofolato reductasa ▪ Hiperproducción de DHFR normal ▪ Hiperproducción de sustrato (ácido <i>p</i>-aminobenzoico) ▪ Incorporación de un nuevo sistema de ligasas para la síntesis de la pared celular ▪ Incorporación de una nueva PLP (PLP 2a) para la síntesis de la pared celular 	<p style="text-align: center;">-lactámicos</p> <p style="text-align: center;">Estreptomicina Quinolonas Sulfonamidas Rifampicina Trimetoprima</p> <p style="text-align: center;">Trimetoprima Sulfametoxazol</p> <p style="text-align: center;">Vancomicina</p> <p style="text-align: center;">Meticilina y todos los antibióticos -lactámicos</p>

3) Inactivación enzimática del antimicrobiano

MECANISMO	DROGAS AFECTADAS
<ul style="list-style-type: none">▪ Hidrólisis por β-lactamasas▪ Modificación por:<ul style="list-style-type: none">- adeniltransferasas- acetiltransferasas- fosfotransferasas▪ Acetilación por cloranfenicol-acetil-transferasa	<p>-lactámicos</p> <p>Aminoglucósidos</p> <p>Aminoglucósidos</p> <p>Aminoglucósidos</p> <p>Cloranfenicol</p> <p>Tetraciclinas</p> <p>Macrólidos</p>

ANEXO N°3

