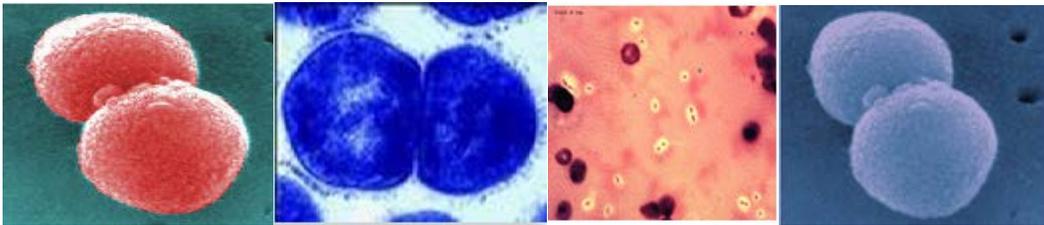


**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURI”**

**Laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas Bacterianas**

**Serotipos y susceptibilidad a los antimicrobianos  
de aislados nasofaríngeos e invasivos de  
*Streptococcus pneumoniae*, Cuba 2015**



Autora: Lic. Daniela Suárez Apaza

**Trabajo de Tesis para optar por el título de Master en  
Bacteriología – Micología**

LA HABANA, CUBA

2016

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURI”**

**Laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas Bacterianas**



**Serotipos y susceptibilidad a los antimicrobianos  
de aislados nasofaríngeos e invasivos de  
*Streptococcus pneumoniae*, Cuba 2015**

Autora: Lic. Daniela Suárez Apaza

Tutora: Lic. Gilda Toraño Peraza, DraC

**Trabajo de Tesis para optar por el título de Master en  
Bacteriología - Micología**

LA HABANA, CUBA

2016

# *Agradecimientos*

Esta tesis no habría sido posible sin la ayuda desinteresada de varias personas que me apoyaron y ayudaron estos dos años, a todos ellos mi más sincero agradecimiento.

A Dios por iluminarme en el nuevo camino que decidí seguir, por estar siempre conmigo y haberme dado la oportunidad de crecer como profesional.

A mi tutora Lic. Gilda Toraño Peraza DraC., por confiar en mí y haberme permitido de trabajar con ella este tiempo, y así poder cumplir mi meta, gracias por brindarme sus sabios consejos en todo momento, gracias por sus enseñanzas, por todo el tiempo que invirtió conmigo y más que todo por toda la paciencia que me tuvo, gracias por ser una guía constante de este trabajo de investigación y sobre todo ser un gran ejemplo de persona y superación profesional.

Al personal del Laboratorio, Miriam Abreu y Brenda Barreto primeramente por brindarme su amistad, por todo el apoyo que me dieron desde el inicio y por todos los días que trabajaron conmigo para poder realizar la tesis.

A todos los profesores de la maestría, por todos los conocimientos impartidos durante estos dos años.

A la Dra. María Rosarys Martínez Romero por la ayuda en el procesamiento estadístico de los resultados.

A todas las personas del segundo piso de Microbiología por su gran ayuda brindada, sus consejos en los momentos precisos y sobre todo por dejarme formar parte de la gran familia que son.

A los dos seres más importantes de mi vida que son mis papitos Martha y Hernán, por haber creído en mi desde el principio, por haberme inculcado valores y ser un ejemplo de superación y entrega porque en gran parte gracias a ustedes, hoy se cumple una más de mis metas, gracias por el apoyo y sobre todo por el amor incondicional que me dieron todo este tiempo a pesar de la distancia. Los amo.

A mis queridos hermanos Mercedes y Javier por el apoyo que me brindaron desde el principio.

A mis siete ángeles (mis sobrinos), que con solo escuchar un “te quiero y te extraño”, me impulsaron a seguir hasta el final.

A Kleiner, la persona que siempre quiso lo mejor para mí, el principal motor para poder cumplir esta meta, mi compañero de vida, estudio y aventura; gracias por todo el amor, comprensión y apoyo que me diste.

# *Dedicatoria*

A mis papás

A mis hermanos

A mis sobrinos

A mi novio Kleiner

## RESUMEN

**INTRODUCCION** - El inicio de la vacunación para la prevención de la enfermedad neumocócica invasiva (ENI) en Cuba está planeada para el 2017 empleando un candidato vacunal autóctono (CVC7-T). Desde el 2014, para la evaluación del impacto de la vacunación se realiza la vigilancia centinela de la ENI en  $\leq 5$  años.

**MATERIALES Y METODOS** - Durante el 2015 se condujo una investigación descriptiva en el Instituto Pedro Kourí (IPK) para la determinación del serotipo de aislados de *Streptococcus pneumoniae*, empleando la reacción de Quellung (Pneumotest), y para el ensayo de la susceptibilidad a los antimicrobianos (método de microdilución en caldo).

**RESULTADOS** - Quedaron incluidos 131 aislados invasivos remitidos al IPK para la referencia nacional y 52 aislados nasofaríngeos, estos últimos recuperados de niños  $\leq 5$  años con diagnóstico de infección respiratoria aguda grave, en el marco de la vigilancia centinela. Entre los aislados invasivos los serotipos más frecuentes fueron: 14, 19A, 19F, 23F, 6A, 3 y 6B y entre los nasofaríngeos: 19A, 19F, 14, 6B y 6A. En ambos grupos la resistencia a los antimicrobianos fue más frecuente para la penicilina, eritromicina y trimetropin/sulfametoxazol, y entre los serotipos 19A, 14 y 23F.

**CONCLUSIONES** - En los  $\leq 5$  años la mayor y menor prevención de la ENI se habría logrado con la vacuna conjugada neumocócica 13 valente (92,6%) y el CVC7-T (54,4%), respectivamente. La similitud de los perfiles de susceptibilidad de ambos grupos de aislados ratifica que la prevalencia de portadores nasofaríngeos de *S. pneumoniae* resistentes a antimicrobianos puede ser utilizada como indicador subrogado de la resistencia entre aislados invasivos.

## ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection; siglas en inglés

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

CLSI: Clinical Laboratory Standard Institute; siglas en inglés

CMHAC-SLC: Caldo Muller Hilton con cationes ajustados y suplementado con lisado de sangre de caballo

CVC7-T: Candidato vacunal heptavalente cubano

EDO: Enfermedad de Declaración Obligatoria

ENF: Exudado Nasofaríngeo

ENI: Enfermedad Neumocócica Invasiva

IPK: Instituto Pedro Kouri

IRAG: Infección Respiratoria Aguda Grave

LNRN/IPK: Laboratorio Nacional de Referencia para Neumococo /Instituto Pedro Kouri

MLSB: Fenotipo de resistencia a Macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B

MDR Multidrogoresistencia

Minsap: Ministerio de Salud Pública

NAC: Neumonía Adquirida en la Comunidad

NT: No Tipificable

OMA: Otitis media aguda

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBP: Penicilin binding proteins; siglas en inglés

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

SS: Sin serotipar

STGG: Triptona Soya con Glicerol y Glucosa

TMT/ SMX: Trimetoprim/sulfametoxazol

VCN: Vacuna neumocócica conjugada

VNC7: Vacuna neumocócica conjugada 7-valente

VNC10: Vacuna neumocócica conjugada 10-valente

VNC13: Vacuna neumocócica conjugada 13-valente

VNC15: Vacuna neumocócica conjugada 15-valente

# INDICE

	Pág.
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1. OBJETIVOS	5
<b>II. REVISION BIBLIOGRÁFICA</b>	6
2.1 <i>S. pneumoniae</i> . Generalidades microbiológicas	7
2.2 Interacción de <i>S. pneumoniae</i> con otros patógenos	9
2.3 Epidemiología y carga de la enfermedad neumocócica	10
2.4 Identificación y serotipaje de aislados de <i>S. pneumoniae</i>	12
2.5 Resistencia a antimicrobianos en <i>S. pneumoniae</i>	14
2.5.1 <i>S. pneumoniae</i> multidrogoresistentes	16
2.6 Reemplazo de serotipos y la resistencia a los antibióticos	16
2.7 Vacunas antineumocócicas	17
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	22
3.1 Diseño general de la investigación	23
3.2 Confirmación de los aislados invasivos de <i>S. pneumoniae</i> recibidos en el LNRN-IPK (Estudio 1)	25
3.3 Procesamiento de los exudados nasofaríngeos remitidos al LNRN- IPK en el marco de la vigilancia centinela de la ENI en niños ≤ 5 años de edad (Estudio 2)	27
3.4 Determinación del serotipo capsular de los aislados invasivos y nasofaríngeos de <i>S. pneumoniae</i>	28
3.5 Estudio de la susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislados invasivos y nasofaríngeos de <i>S. pneumoniae</i>	30
3.5.1 Preparación de las placas para la determinación de la CMI	31
3.5.2 Preparación del inóculo y siembra de las placas de microdilución	33
3.6 Análisis de los resultados	34
<b>IV. RESULTADOS</b>	37
4.1 Estudio de aislados de <i>S. pneumoniae</i> responsables de enfermedad	38
4.1.1 Descripción del universo del estudio	38
4.1.2 Frecuencia de serotipos capsulares entre los aislados invasivos de <i>S. pneumoniae</i>	39

4.1.3 Susceptibilidad antimicrobiana de los aislados invasivos de <i>S. pneumoniae</i>	43
4.2 Estudio de aislados nasofaríngeos de <i>S. pneumoniae</i>	47
4.2.1 Serotipos capsulares de <i>S. pneumoniae</i> demostrados entre portadores nasofaríngeos $\leq 5$ años de edad con diagnóstico de IRAG	49
4.2.2 Susceptibilidad antimicrobiana de los aislados nasofaríngeos de <i>S. pneumoniae</i>	51
4.3 Resultados de la comparación de los perfiles de susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislados nasofaríngeos de <i>S. pneumoniae</i> y de los responsables de enfermedad entre niños $\leq 5$ años	53
<b>V. DISCUSIÓN</b>	56
5.1 Estudio de aislados de <i>S. pneumoniae</i> responsables de enfermedad	57
5.2 Estudio de aislados nasofaríngeos de <i>S. pneumoniae</i>	67
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	72
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	74
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	76
<b>ANEXOS</b>	

## *I. Introducción*

### I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad neumocócica comprende un amplio rango de infecciones que van desde las menos graves, en las que se incluyen la otitis media aguda (OMA) y la sinusitis, hasta las formas más severas, como la meningitis, bacteriemia y neumonía. A estas últimas se les designa como enfermedad neumocócica invasiva (ENI) que es aquella en la que se aísla la bacteria o se demuestran sus antígenos en una muestra clínica de un sitio normalmente estéril, y comprende además a la endocarditis, peritonitis, artritis y osteomielitis (CDC, 2015; Iroh Tam *et al.*, 2015).

Los niños < 5 años de edad y los ancianos > 65 años constituyen los grupos de mayor riesgo para padecer una ENI (Drijkoningen y Rohde, 2014). A nivel mundial, tomando como base los datos del año 2010, se informan 11.9 millones de neumonías severas, de las cuales 3 millones se producen precisamente en niños < 5 años de edad y el 18.3% de estas son debidas a *Streptococcus pneumoniae* (Walker *et al.*, 2013; Nair *et al.*, 2013). Así mismo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) informa que entre los fallecimientos notificados en el 2008 para este mismo grupo de edad, 541 000 se debieron a la ENI; y para los neonatos estima una incidencia de 370 x 100 000 en los países en vías de desarrollo (WHO, 2012; Billings *et al.*, 2016).

La infección neumocócica se disemina por vía respiratoria a través del contacto directo de un individuo sano con un enfermo o con un portador nasofaríngeo de *S. pneumoniae*. La colonización nasofaríngea se considera un requisito indispensable para que se produzca la ENI pero también se concibe como la etapa en la que el individuo gana inmunidad contra los diferentes serotipos capsulares a los que se expone. Esto se expresa en la marcada disminución de la ENI por encima de los 5 años de edad (Goldblatt *et al.*, 2005).

La bacteria tras unirse a las células epiteliales de la mucosa de la nasofaringe puede permanecer como un mero colonizador sin provocar daños en el hospedero, por días, semanas e incluso meses; o por el contrario, diseminarse localmente a través de las vías respiratorias y producir OMA, sinusitis y neumonías, o por vía hematogena y causar ENI (Henriques-Normark y Tuomanen, 2013; Mehr y Wood, 2012).

El estado de portador nasofaríngeo para *S. pneumoniae* es dependiente de la edad del individuo y del serotipo capsular de la bacteria. Los portadores son más frecuentes entre los niños < 5 años de edad, con un pico en el grupo de 1 a 3 años, donde se informa que el rango de portación varía entre 23 y 85% (Walker, *et al.*, 2013; WHO, 2012). En cambio, menos del 10% de los adultos se reconocen colonizados por neumococo (Henriques-Normark y Tuomanen, 2013). Así mismo, la prevalencia de portadores nasofaríngeos está determinada por la ubicación geográfica y el estatus económico de los países; y se demuestra más alta entre los de más bajo nivel de desarrollo económico, en los que en correspondencia es también superior la prevalencia de la ENI entre los niños < 2 años de edad (Weinberger *et al.*, 2013; Adegbola *et al.*, 2014).

El manejo y prevención de las diferentes formas de infección neumocócica es complejo. A esto contribuye el incremento a nivel mundial del número de aislados resistentes a penicilina y a otros antibióticos, como los macrólidos, debido fundamentalmente al abuso que de ellos se hace en el tratamiento de infecciones respiratorias producidas por otros patógenos (Ginsburg *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2013). Por otro lado, es quimérica la prevención de la ENI a través de una sola vacuna, pues técnicamente es imposible la inclusión en ella de los 97 serotipos de *S. pneumoniae* que actualmente se conocen; con las vacunas comercialmente disponibles solo se logra protección contra los serotipos más frecuentemente asociados a la enfermedad a nivel internacional; sin embargo, el uso de estas ha impactado favorable y significativamente en la epidemiología de la ENI (Caierão *et al.*, 2014; Richter *et al.*, 2014; Geno *et al.*, 2015).

En Cuba aún no se introdujo la vacunación antineumocócica y la única forma de ENI objeto de vigilancia hasta el 2014 es la meningitis, que constituye una enfermedad de declaración obligatoria (EDO). De este modo, entre 1998 y 2012 se demuestra para la meningitis por *S. pneumoniae* una incidencia de  $1.3/10^5$  habitantes, que se hace máxima en los < 1 año ( $10.7/10^5$ ) y en el grupo de 1- 5 años ( $2.2/10^5$ ) (Dickinson *et al.*, 2015).

El laboratorio Nacional de Referencia de Neumococo (LNRN) en el Instituto “Pedro Kourí” (IPK) es la entidad responsable de la caracterización en serotipos de los aislados invasivos de *S. pneumoniae*. Esta vigilancia permite conocer los más frecuentemente asociados a las infecciones meníngeas, pues en correspondencia con su carácter de EDO, el Ministerio de Salud Pública (Minsap) regula su remisión al LNRN-IPK; sin embargo no proporciona información

que correlacione íntegramente con los serotipos comprometidos con otras formas de ENI, específicamente las neumonías (Toraño *et al.*, 2010 y 2014).

La introducción de la vacunación antineumocócica en Cuba está planeada para el 2017, tras el otorgamiento del registro sanitario al candidato vacunal heptavalente cubano (CVC7-T) actualmente en evaluación clínica. Este permitirá la prevención de la enfermedad neumocócica por los serotipos 1, 5, 6B, 14, 18C, 19F y 23F en la población preescolar y los lactantes (Dotres *et al.*, 2014; González *et al.*, 2015).

En el 2014, con el propósito de sentar las bases para la evaluación posterior del impacto de su introducción se propone un protocolo de vigilancia centinela de la ENI en niños  $\leq 5$  años de edad, de base hospitalaria y con énfasis en el estudio de las neumonías adquiridas en la comunidad, que comienza a ejecutarse en seis hospitales pediátricos en tres provincias del país (Habana, Cienfuegos y Santiago de Cuba), con el auspicio del Instituto Finlay de Vacunas y la participación del IPK (Linares-Pérez N. Model for clinical research and impact evaluation of the Cuban pneumococcal vaccine [Oral Presentation]. Vacci Pharma International Conference. Varadero, Cuba; 2015).

La investigación que se describe en el presente trabajo de tesis se inserta en este contexto y es parte activa de los esfuerzos para el perfeccionamiento de la vigilancia de la ENI en el país.

Atendiendo entonces a que entre los factores claves para lograr la efectividad de la vacunación son igualmente importantes tanto la eficacia de la vacuna en cuestión y el alcance poblacional que se logre con su administración, como la cobertura teórica de serotipos y su potencial para reducir el estado de portador, se plantearon los siguientes objetivos a partir del estudio de los aislados invasivos y los recuperados de portadores nasofaríngeos entre Enero-Diciembre del 2015.

### 1.1 Objetivos

1. Definir la cobertura serotípica para la prevención de la enfermedad neumocócica de las vacunas conjugadas multivalentes con posibilidades de ser empleadas en Cuba.
2. Distinguir los perfiles de susceptibilidad a los antimicrobianos de los serotipos vacunales y no vacunales demostrados entre los aislados invasivos.
3. Determinar la frecuencia de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* entre niños  $\leq 5$  años con diagnóstico de infección respiratoria aguda y los serotipos involucrados en ella.
4. Comparar los perfiles de susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislados nasofaríngeos de *S. pneumoniae* y de los responsables de enfermedad entre niños  $\leq 5$  años.

*J. J. Revisión Bibliográfica*

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *S. pneumoniae*. Generalidades microbiológicas.

*S. pneumoniae* es una bacteria Gram positiva, extracelular, patógena, anaerobia facultativa, con múltiples componentes celulares que juegan un rol importante en la patogénesis. Su superficie está cubierta por una capsula polisacáridica, compuesta por ácido teicoico unido covalentemente al peptidoglicano que es considerada un importante determinante de patogenicidad, (Black *et al.*, 2008). El peptidoglicano tiene la composición clásica de las bacterias Gram positivas: ácido N- acetilmurámico, N- acetilglucosamina y lisina; por el contrario, el ácido teicoico es inusual y está compuesto por una cadena de ribitol fosfato unida covalentemente a fosfoserilcolina, que al mismo tiempo sirve como plataforma de unión para proteínas (Li *et al.*, 2013).

La diversidad en la composición de la superficie celular de *S. pneumoniae* permite distinguir dos fenotipos diferentes: colonias transparentes y colonias opacas. Las colonias transparentes son las que con más frecuencia se observan en aislados de la nasofaringe y obedecen a una expresión menor de la cápsula y proteínas de superficie, pero mayor presencia de colina y contenido de autolisina. El fenotipo opaco es el que predomina en los aislados de neumococo a partir del cultivo de muestras de sangre y es consecuencia de una mayor expresión del polisacárido capsular y de Proteína A, por lo que tienen una mayor capacidad para la formación de biopelículas (biofilms) y resultan más invasivos. El mecanismo de conversión de un fenotipo en otro no se ha precisado pero se sugiere que este contribuye tanto a la evasión de los mecanismos de defensa del hospedero, como la Proteína C-Reactiva y leucocitos de la sangre, así como a la adhesión a las células de la nasofaringe (Henriques-Normark y Tuomanen, 2013).

El locus capsular en *S. pneumoniae* se transcribe como un único operón y en todas las cepas presenta una organización similar de los genes que codifican para una cápsula específica. El polimorfismo de los genes de este operón es el que determina las variantes serológicas de la cápsula (serotipos), para las que actualmente se reconocen 46 serogrupos y 97 serotipos distintos. Determinados serotipos se asocian más con el estado de portador nasofaríngeo y

otros se describen con más frecuencia como responsables de enfermedad invasiva; así mismo, su distribución varía para las diferentes áreas geográficas y entre algunos serotipos es más prevalente el fenómeno de la resistencia a antimicrobianos (Hausdorff *et al.*, 2008; Geno *et al.*, 2015).

Otros determinantes de patogenicidad de *S. pneumoniae* son los pilis, estructuras filamentosas unidas a la pared celular e involucrados en la adhesión, para los que se describen dos tipos (PI-1 y PI-2) (Henriques-Normark y Tuomanen, 2013). Así mismo, se reconoce el papel que juegan en la patogenicidad y la infección por neumococo diferentes proteínas, particularmente la neumolisina, la proteína A y la neuroaminidasa (Li *et al.*, 2013).

*S. pneumoniae* es una especie bacteriana muy recombinante y hasta la fecha la única forma para diferenciar a una cepa como invasiva continua siendo la asociación con el serotipo capsular, pues aún no ha identificado una proteína o variante alélica que permita abordar la diferenciación entre cepas invasivas y cepas colonizadoras del tracto respiratorio. Hasta el momento solo a través de la secuenciación del genoma de la bacteria se logran resultados en este sentido (Klugman *et al.*, 2014).

En la nasofaringe *S. pneumoniae* desarrolla biofilms, un fenotipo de crecimiento caracterizado por la unión superficial, la integración en una matriz extracelular y la resistencia a antimicrobianos. Este fenotipo estimula en las células hospederas una menor producción de citoquinas y quimoquinas, y en la propia bacteria origina una disminución del metabolismo celular que condiciona una menor producción de polisacárido capsular y de neumolisina. Aunque el mecanismo a través del cual se transita del biofilm a la forma invasiva aún no se ha dilucidado, la adherencia de neumococo a las células hospederas se reconoce como prerrequisito para una infección severa (Gilley y Orihuela, 2014; Marks, *et al.*, 2013). En esta interacción patógeno-hospedero es clave el papel de determinadas moléculas. Por ejemplo, la actividad de la neurominidasa, que promueve la formación del biofilm y facilita la extensión de la bacteria a los tejidos; así como la interacción con otras proteínas como la fibronectina, que le permite escapar de la respuesta inflamatoria (Henriques-Normark y Tuomanen, 2013).

## 2.2 Interacción de *S. pneumoniae* con otros patógenos.

El monitoreo del estado de portador para los diferentes integrantes de la microbiota normal de la nasofaringe, de la cual es parte *S. pneumoniae*, es relevante en la vigilancia de las infecciones del tracto respiratorio superior y específicamente de las neumonías.

La colonización de la nasofaringe por neumococo es un paso previo y necesario pero no suficiente para el desarrollo de una enfermedad. En la nasofaringe *S. pneumoniae* comparte el nicho con otras bacterias y agentes virales, concretamente con miembros de la familia *Moraxellaceae*, *Streptococaceae*, *Corynebacterium*, *Pastereullaceae* y *Staphylococcaceae*. La interacción con estas especies y ente ellas mismas tiene impacto en la colonización por *S. pneumoniae* pues influye en la formación del biofilm, en la virulencia y la prevalencia del estado de portador (Shak *et al.*, 2013).

Por ejemplo, se ha demostrado una relación inversa entre el estado de portador nasofaríngeo para *S. pneumoniae* y por *S. aureus*; sin embargo, hasta el momento los estudios han fallado en demostrar esa misma correlación inversa para la colonización por *S. aureus* resistente a meticilina (SARM). En relación con *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis* otros estudios aportan evidencias de la asociación positiva entre su presencia en la nasofaringe y el estado de portador para *S. pneumoniae* (van den Bergh *et al.*, 2012). En este caso se plantea que el biofilm le confiere a neumococo protección frente a la acción de los antibióticos, por ejemplo, a través de la acción de las  $\beta$ -lactamasa producidas por cepas de *H. influenzae* (Weirner *et al.*, 2011).

Con base en estas interacciones se sugiere también que la propia vacunación antineumocócica se asocia con un aumento de las (OMA) producidas por *H. influenzae* no tipables. Las vacunas conjugadas neumocócicas (VCN) reducen la colonización y la enfermedad invasiva por los serotipos contenidos en ellas, por consiguiente modifican la interacción de *S. pneumoniae* con otros comensales de la nasofaringe (Dunne *et al.*, 2013; Dagan *et al.*, 2013).

*S. pneumoniae* también interactúa en la nasofaringe con virus respiratorios, justamente un aspecto relevante de la epidemiología de su colonización es la ocurrencia frecuente de

coinfeción con varios virus de la gripe, aumentando la morbilidad y mortalidad (Koon *et al.*, 2011; Masia *et al.*, 2011; Wolter *et al.*, 2014). La infección viral modifica la respuesta inmune innata del epitelio respiratorio que es la responsable de eliminar la invasión bacteriana e impedir la adhesión (Koon *et al.*, 2011; Short *et al.*, 2012). Esta sinergia en el proceso de colonización también se describe para el virus Sincitial Respiratorio y metapneumovirus (Muhlemann *et al.*, 2011; Verkaik *et al.*, 2011).

### **2.3 Epidemiología y carga de la enfermedad neumocócica**

La transmisión de la bacteria se produce de persona a persona por aerosoles procedentes de individuos afectados por enfermedad neumocócica y de portadores nasofaríngeos asintomáticos. Las bacterias una vez en la nasofaringe simplemente puede causar la colonización asintomática por días o semanas pero otras veces se extiende a los senos paranasales, los pulmones, o rompe las defensas de mucosa y participa en el flujo de sangre para causar bacteriemia, o cruza la barrera hematoencefálica y causa meningitis (Henriques-Normark y Tuomanen, 2013; Mehr y Wood, 2012). Muy raramente neumococo es responsable de otras infecciones en sitios como articulaciones, huesos y tejidos blandos (Black *et al.*, 2008).

La portación nasofaríngea es más común en los niños < 5 años. En niños de 1 a 3 años de edad se informan cifras entre 23 y 85%, mientras que entre estudiantes de secundaria es del 25% y de solo un 10 % en adultos mayores (WHO, 2012; Henriques-Normark y Tuomanen, 2013). La incidencia de contagio más elevado se ha demostrado en países en desarrollo y el índice de ENI es más alto en los niños < 2 años de edad, también en países en desarrollo (O'Brien *et al.*, 2009; Weinberger *et al.*, 2013; Adegbola *et al.*, 2014).

Después de la implementación de la vacunación infantil los ancianos pasan a constituir en la población más susceptible a la enfermedad neumocócica (Vila-Corcoles y Ochoa-Gondar, 2013). La pérdida de las funciones del sistema inmune es determinante para el incremento de la susceptibilidad en los ancianos porque se produce inmunodepresión y como consecuencia mayor susceptibilidad a infecciones y otras condiciones como el cáncer. La concentración de anticuerpos IgG contra proteínas de neumococo y de

anticuerpos IgM contra la cápsula polisacáridica se reduce notablemente con la edad, particularmente en mujeres. Sin embargo, las funciones de estos anticuerpos durante la tercera edad aún se discute. En cambio, si se sabe que la inflamación crónica y la depresión celular provocan susceptibilidad durante la tercera edad a la infección por neumococo (Simell *et al.*, 2008; Shivshankar, 2012). Así mismo, se conoce que algunos factores resultan predisponentes para la infección, como por ejemplo: defectos congénitos: agammaglobulinemia, mieloma múltiple, neutropenia, asplenia, alcoholismo, malnutrición y la diabetes (Musher, 2005).

Por ENI se entiende al aislados de *S. pneumoniae* o la detección de sus antígenos en líquidos corporales estériles (CDC, 2013). La neumonía por neumococo puede ser invasiva (bacteriemia) y no invasiva y se sugiere que por cada caso con bacteriemia se producen tres casos no bacteriémicos; por consiguiente, la mayor carga de enfermedad neumocócica corresponde justamente a la enfermedad no invasiva (Said *et al.*, 2013).

Según la OMS la neumonía por *S. pneumoniae* es la principal causa de mortalidad infantil en todo el mundo. Se estima que durante el 2013 a nivel mundial murieron por esta causa 935 000 niños < 5 años, lo que supone el 15% del total de defunciones en este grupo de edad, aunque en África subsahariana y Asia meridional la prevalencia es incluso superior (OMS, 2014).

En adultos la enfermedad neumocócica no invasiva se presenta principalmente en la forma de neumonía adquirida en la comunidad (NAC) y tiene un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad en pacientes de la tercera edad, a pesar de la introducción de los programas de inmunización (Restrepo *et al.*, 2008; Welte *et al.*, 2012; Drijkoningen y Rohde, 2014). En la población infantil, entre las principales complicaciones de las formas no invasivas se reconoce a la OMA, con una incidencia de 709 millones de casos anuales en el mundo, el 51% de ellos en < 5 años, y con complicaciones y secuelas como las supuraciones y sordera (Monasta *et al.*, 2012). Los episodios de OMA son atendidos generalmente en consulta externa y resuelven con la prescripción del antibiótico recomendado en los protocolos de tratamiento en consecuencia con la experiencia clínica pero a causa del

número elevado de prescripciones se considera que esta práctica contribuye al fenómeno de la resistencia a antimicrobianos (Vergison *et al.*, 2010).

A través de múltiples estudios a nivel mundial se ha confirmado que los diferentes serotipos de *S. pneumoniae* se distribuyen en función de la edad y el sexo de los pacientes, así como que es también dependiente del área geográfica. De este modo, la ENI tiene una marcada incidencia en niños menores de 5 años y adultos mayores de 65 años. En relación con la estacionalidad las observaciones revelan diferencias en los patrones para las diferentes formas de la ENI. Así, por ejemplo, las bacteriemias se producen predominantemente en invierno, probablemente debido al incremento de susceptibilidad por la infección, condicionada por las infecciones virales. En cambio, las formas no invasivas de la enfermedad neumocócica se presentan más frecuentemente durante el otoño y esto parece estar relacionado con variaciones también estacionales del estado de portador nasofaríngeo y subsecuentemente de la transmisión del patógeno (Weinberger *et al.*, 2014).

### **2.4 Identificación y serotipaje de aislados de *S. pneumoniae***

*S. pneumoniae* es una especie  $\alpha$ -hemolítica del género *Streptococcus*, en la que se incluyen cocos Gram positivos dispuestos en pares (diplococos, aunque también pueden disponerse en cadenas cortas), lanceolados, de 0,5 a 1,25 $\mu$ m de diámetro, inmóviles y no forman esporas. En agar sangre producen colonias redondas con un característico halo verde, que crecen mejor en atmósfera de CO<sub>2</sub> entre 5 y 10%, a 37°C y pH entre 7,4 - 7,8. Tras una incubación prolongada la zona central de las colonias se puede deprimir por autólisis celular progresiva. En agar chocolate el crecimiento se visualiza rodeado de un color amarillo verdoso. Es una especie susceptible a la optoquina, soluble en las sales de bilis y negativa a la prueba de bilis esculina. Como algunos estudios informan aislados de *S. pneumoniae* con resistencia a la optoquina, la confirmación de la identificación se realiza mediante la prueba de solubilidad en bilis (Musher, 2005).

Para la determinación de los serotipos de *S. pneumoniae* pueden emplearse en el laboratorio los siguientes métodos: Reacción de Neufeld - Quellung, aglutinación en lámina, aglutinación con látex, coaglutinación, PCR y difusión en gel.

La reacción de Neufeld - Quellung o reacción de hinchazón capsular constituye el método de oro para este propósito. Consiste en una reacción de precipitación entre el suero específico (anticuerpo) y el polisacárido capsular (antígeno) de la bacteria, que debe ser observada al microscopio. Si la reacción es positiva la cápsula aumenta de tamaño como consecuencia del incremento de la tensión superficial y se hace más fácil su visualización (se hincha); eso es precisamente lo que significa el término alemán "Quellung". Para este propósito se utiliza internacionalmente el kit comercial Pneumotest (Statem Serum Institute, Dinamarca) (Habib, 2014).

Los anticuerpos que se emplean para este método son obtenidos tras la inmunización de animales de laboratorio (usualmente conejos) con cepas de serotipos específicos. Cuando estos son acoplados a partículas de látex o a la proteína A de *S. aureus* pueden ser entonces empleados también en reacciones de aglutinación que son visibles a simple vista; este es el principio de las pruebas de aglutinación en lámina, aglutinación con látex y de la coaglutinación.

Cuando para un aislado de *S. pneumoniae* no se observa reacción con ninguno de los antisueros incluidos en el kit Pneumotest este pudiera tratarse como no tipificable (NT) pero deberá ser informado como SS hasta tanto el resultado se confirme por otro laboratorio de referencia, pues este método es propenso a errores debidos a: diferencias en la calidad de los sueros, fallas humanas o la pérdida de la capacidad de producción de la cápsula por parte del aislado como consecuencia de los subcultivos (Ing, 2012).

Bajo la designación NT pueden entonces quedar incluidos aislados con defectos en la producción de la cápsula, no encapsulados, e incluso aquellos mal identificados como *S. pneumoniae*. Los estudios genéticos del locus capsular de aislados NT revelan dos grandes grupos: Grupo I, que incluye los que conservan los elementos genéticos para la síntesis de la cápsula pero no la expresan, y Grupo II, en el que se incluyen los que no conservan estos genes pero tienen otros que codifican para la síntesis de proteínas que facilitan la adherencia epitelial y la colonización. En correspondencia con esto, los aislados NT de portadores nasofaríngeos pertenecen generalmente al Grupo II. Por razones

desconocidas, el serotipo 8 es el más propenso a convertirse en NT (Hathaway *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2014; Scott *et al.*, 2012).

Los aislados NT son más frecuentes entre los portadores nasofaríngeos de *S. pneumoniae* luego de la generalización del uso de las vacunas conjugadas, llegando a representar entre 15 y 18% de los aislados (Sa-Leao *et al.*, 2009; Van der Windt *et al.*, 2012).

### **2.5 Resistencia a antimicrobianos en *S. pneumoniae***

La resistencia a los antimicrobianos en *S. pneumoniae* es un problema creciente en el que ha influido la presión selectiva ejercida por el uso indiscriminado, la exposición prolongada a los antibióticos y el propio empleo de las vacunas conjugadas (Melander *et al.*, 1998; Melander *et al.*, 2000).

Las primeras cepas moderadamente resistentes a penicilina se identificaron en Australia y Nueva Guinea en 1964. En 1997, en Sudáfrica, se informaron por primera vez aislados con altos niveles de resistencia. En España, entre 1979 y 1981, el 9% de los aislados responsables de ENI son resistentes a penicilina y ya en la década de 1990, fundamentalmente seis clones de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina se diseminan en toda Europa (serotipos 6A, 6B, 9V, 14, 19F y 23F), caracterizados por presentar además resistencia a macrólidos y otros antibióticos. Actualmente se informan altos niveles de resistencia en España, Francia, en países de Europa del este y en Estados Unidos, Sudáfrica y en el centro y sur de América (Lynch y Zhanel *et al.*, 2009)

Los antibióticos betalactámicos inhiben competitivamente las enzimas transpeptidasas cuya función es entrelazar las grandes moléculas de peptidoglicano para formar una estructura rígida que protege a la célula bacteriana de los cambios extremos de osmolaridad en el medio extracelular. Estas enzimas reciben el nombre de proteínas fijadoras de la penicilina (PBP; del inglés *penicillin-binding proteins*). La inhibición competitiva de las PBP por los betalactámicos ocurre debido a que estos antibióticos son similares a su sustrato natural, que es un pentapéptido que termina en D-alanina. En *S. pneumoniae* se describen seis PBP: 1a, b, 2x, 2a, 2b y 3 y diferentes grados niveles de susceptibilidad (bajo, intermedio y alto). Usualmente, las infecciones extra-meníngeas causadas por cepas con resistencia intermedia

pueden ser tratadas exitosamente con altas dosis de bencilpenicilina. La PBP más frecuentemente alterada es la 2b. Esto determina resistencia a penicilina y en un alto porcentaje de aislados, también a cefalosporinas de tercera generación. Sin embargo, la resistencia a cefalosporinas y carbapenémicos se describe solo esporádicamente por lo que estos antibióticos mantienen su efectividad en el tratamiento de las infecciones neumocócica (Cohen, 2009; Ronald *et al.*, 2010).

También la resistencia a los macrólidos/azálidos en *S. pneumoniae* ha aumentado progresivamente como consecuencia de la prescripción indiscriminada de esta clase de antibióticos para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio superior. Es más frecuente precisamente entre las cepas resistentes a penicilina (Gay, 2000; Cohen, 2009).

Los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas se unen a la subunidad 23S del RNA ribosomal e inhiben la acción del RNA mensajero y consecuentemente la síntesis de proteínas. Esta resistencia se debe a la acción de las metilasas; enzimas que intervienen en dos mecanismos fundamentalmente: 1) La metilación del sitio diana en el ribosoma, codificado por el gen *erm* (B) que confiere resistencia a macrólidos/azálidos, lincosamidas y estreptograminas. Los aislados con este gen expresan el fenotipo de resistencia a Macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLS<sub>B</sub>) y altos niveles de resistencia (CMI  $\geq 128$   $\mu\text{g/mL}$ ); y 2) Bombas de eflujo, mecanismo codificado por el gen *mef*(A), a través de las cuales se reduce la concentración intracelular de la droga y se impide que interactúe con su diana. Los aislados con este gen expresan el fenotipo M, caracterizado por altos niveles de CMI, resistencia que no se solventa con el incremento de las dosis de tratamiento. La resistencia a macrólidos/azálidos es el mayor problema demostrado in vitro a nivel internacional para *S. pneumoniae*, particularmente en países asiáticos (Ronald *et al.*, 2010).

Para las fluoroquinolonas con actividad contra neumococo (levofloxacin y moxifloxacin) la resistencia está mediada por mutaciones en el gen *parC* (inhibición de la topoisomerasa IV) y/o el gen *gyrA* (inhibición de la DNA girasa), pero puede además obedecer a bombas de eflujo que excretan a la droga al exterior de la célula. Las mutaciones en *parC* determinan resistencia de bajo grado, que afectan solo a la ciprofloxacina pero se mantiene

la susceptibilidad a la levofloxacin, la gatifloxacin, la moxiflosacin y la gemifloxacin (Mulvey y Simor, 2009; Brueggemann *et al.*, 2002; Fraimow y Tsigrelis, 2011). Es una resistencia de baja frecuencia a nivel mundial aunque con diferencias marcadas entre distintas regiones geográficas, por ejemplo: en Europa, durante el 2013, el 4,9% de los aislados de neumococo se informan como resistentes a fluoroquinolonas; en Taiwan se notifica un valor de 9,1% de resistencia a levofloxacin, en Corea de 5,2%, entre el 2008-2009 y en Canadá de 7,3% en el 2006. (Kyaw *et al.*, 2006; Linares *et al.*, 2010; Song, 2013).

### **2.5.1 *S. pneumoniae* multidrogoresistentes**

Por multidrogoresistencia (MDR) en *S. pneumoniae* se entiende la resistencia a tres o más tipos de antibióticos pero como la resistencia a la penicilina es el fenómeno más constante, pues entonces un aislado MDR es aquel para el que se demuestra resistencia a  $\beta$ -lactámicos y para al menos otras dos clases de antibióticos, frecuentemente macrólidos/azálidos y timetropim/sulfametoxazol (cotrimoxazol) (Song, 2013). En un estudio en 15 países de Europa, entre 2004-2005, el 15,8% de los aislados de neumococo se informan MDR (Riedel *et al.*, 2007).

La emergencia de clones de *S. pneumoniae* MDR serotipo 19A es hoy un motivo de preocupación a nivel mundial. La mayoría de los aislados de este serotipo pertenecen al complejo clonal CC320 que se ha incrementado tras la introducción de la vacuna neumocócica conjugada 13-valente (VCN13v), a pesar de su inclusión en ella. Se especula acerca de que otros serotipos no vacunales, como el 6C, 15A, 33A o 35B puedan emerger también en relación con este fenómeno. Tal es el caso de aislados resistentes del serotipo 11A y de aislados MDR del serotipo 6A recientemente descritos en Corea (Song, 2013).

### **2.6 Reemplazo de serotipos y la resistencia a los antibióticos.**

El reemplazo de serotipos se define como una disminución en la prevalencia de los serotipos contenidos en la VCN7v, acompañado de un aumento correspondiente de los serotipos no incluidos en ella. Los serotipos 19A, 1, 5, 7F y 33F, así como el serogrupo 15 representan los incrementos más significativos entre los aislados responsables de ENI, por

lo que se les considera los serotipos de reemplazo. Este fenómeno se observa tanto entre los informados como causa de ENI en < 5 años de edad como entre los adultos > 65 años (Domínguez *et al.*, 2014).

El serotipo 19A es reconocido como el serotipo de reemplazo más predominante en Estados Unidos (Kaplan *et al.* 2010). En los países con escaso o ningún uso de la VCN7v, la reemergencia de este serotipo se atribuye al uso indiscriminado de antibióticos, especialmente de la clase de los macrólidos (Black, 2008; Muñoz-Almagro *et al.* 2008; Van Effelterre *et al.* 2010). Otras posibles razones que se aducen son la expansión clonal y la conmutación o "switching" capsular de otros serotipos al serotipo 19A, pues durante la recombinación de fragmentos de ADN se incluye tanto el locus capsular como genes que codifican para la PBP2x y PBP1a. Así mismo, se refiere como otra posible causa del reemplazo a la falta de protección cruzada para el serotipo 19A que se esperaba indujera el serotipo 19F presente en la VCN7v (Pai *et al.*, 2005; Moore *et al.* 2008; Dagan y Klugman, 2008).

En resumen, a pesar de que la incidencia de la ENI debida a los serotipos resistentes a penicilina y eritromicina incluidos en la VCN7v disminuye significativamente después de su introducción, hay un aumento simultáneo de casos de la enfermedad causada por otros serotipos resistentes a los antibióticos que han devenido en serotipos de reemplazo. Actualmente, los aislados de *S. pneumoniae* clínicamente importantes por su resistencia a las drogas de elección para el tratamiento pertenecen por lo general a alguno de los siguientes siete serotipos: 6A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F, y 23F; solo cinco de ellos (6B, 9V, 14, 19F, y 23F) están incluidos en la VCN7v, el resto los contiene la VCN13v (Tan, 2012).

### **2.7 Vacunas antineumocócicas**

La diversidad del antígeno capsular de *S. pneumoniae* permite la diferenciación de 97 serotipos dentro de esta especie, sin embargo, un número relativamente pequeño de estos son los causantes de la mayoría de las infecciones neumocócicas. Los múltiples estudios sobre la vigilancia de serotipos capsulares muestran una distribución heterogénea para las diferentes regiones geográficas y este comportamiento supone un problema para la formulación de vacunas que potencialmente protejan a todos los susceptibles (Wyres *et al.*,

2013; Kandasamy, *et al.*, 2015). Los datos epidemiológicos reunidos a nivel internacional muestran diferencias entre los serotipos de *S. pneumoniae* encontrados en países desarrollados y en vías de desarrollo, observándose de este modo diferencias, por ejemplo, para los que predominan en Latinoamérica (Castañeda *et al.*, 2009).

Del mismo modo, la emergencia de serotipos MDR constituye un estímulo para la búsqueda constante de una vacuna más eficaz que los incluya para poder incidir en la disminución de la morbilidad y mortalidad asociada a la ENI en lactantes, niños y ancianos (Tan, 2012).

La historia de la inmunización contra neumococo se inicia en 1911 con el primer ensayo clínico entre mineros de oro sudafricanos, entre los que se registraba una elevada incidencia de neumonía. El propósito de esta vacuna era matar a la bacteria. A partir de 1940 las siguientes generaciones de formulaciones de vacunas neumocócica están basadas en la purificación del polisacárido capsular de la bacteria. Estas se introducen en el mercado al mismo tiempo que la penicilina y otros antimicrobianos a lo que se les consideró entonces como la cura definitiva para la neumonía por neumococo, por eso el entusiasmo por la prevención de la enfermedad neumocócica a través de la inmunización no cobra auge hasta 1954 (Makela y Butler, 2008).

En 1983 se licencia en Estados Unidos y Canadá una vacuna compuesta por una mezcla de los polisacáridos capsulares de los 23 serotipos responsables de la mayoría de las infecciones neumocócicas (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F). Esta vacuna se recomienda actualmente para adultos  $\geq 65$  años, e incluso para adultos jóvenes pero con afecciones de la salud como las enfermedades pulmonares o cardiovasculares crónicas; así como para niños de más de 2 años con patologías que acrecienten el riesgo de desarrollar infecciones neumocócicas (CDC, 2015).

El polisacárido capsular estimula la actividad de las células B por lo que induce una respuesta inmune independiente de linfocitos T, es decir, no genera memoria inmunológica. Debido a esto es que la vacuna polisacáridica 23 valente no previene la colonización del tracto nasofaríngeo ni genera inmunidad protectora duradera en niños  $< 2$  años o en

pacientes inmunocomprometidos (van der Poll y Opal, 2009). Su uso se recomienda, en los países de altos ingresos económicos para la inmunización de grupos de riesgo médicos y de personas  $\geq 65$  años. Hay evidencias de que su combinación con la vacuna del virus del papiloma humano resulta ventajosa (Pilishvili y Bennett, 2015).

En el 2001 se introduce la VCN7v, en la que quedaron incluidos los serotipos responsables de la mayoría de los casos de ENI infantil en Estados Unidos (4, 6B, 19F, 23F, 18C, 14 y 9V). Gracias a la conjugación de estos a un componente proteico (toxóide diftérico) se logra que la vacuna estimule la respuesta inmune mediada por linfocitos T y genere la estimulación de células B específicas, con producción de anticuerpos IgG por células de plasmáticas y células memoria inmunológica de larga duración (American Academy of Pediatrics 2000; Vilá y Bello, 2004). Como otra de sus ventajas se reconoce la capacidad para prevenir la OMA y reducir la colonización nasofaríngea (van Deursen *et al.*, 2012; Von Gottberg *et al.*, 2014).

A partir del uso extendido de la VCN7, se observa una disminución de la resistencia a los antibióticos entre los neumococos responsables de enfermedad invasiva, así como una reducción en las hospitalizaciones por concepto de neumonía en niños  $< 2$  años (Grijalva *et al.*, 2007). Sin embargo, también se observa el reemplazo de serotipos, anteriormente comentado en este documento y que se contrarresta con el desarrollo de nuevas conjugadas.

La primera de ellas es la vacuna neumocócica conjugada 10-valente (VCN10v) en la que se incluyen además los serotipos 1, 5 y 7F. Más tarde se desarrolla la VCN13v a la que se agregaron los serotipos 3, 6A y 19A (Moore *et al.*, 2015). Actualmente se trabaja en la evaluación clínica en adultos entre 18 y 45 años de edad y en lactantes, de la vacuna neumocócica conjugada 15-valente (VCN15v), en la que se involucran también a los serotipos 22F y 33F. Sin embargo, el número total de serotipos que pueden ser potencialmente cubiertos por las vacunas conjugadas es restringido pues estas son muy complejas desde el punto de vista de la fabricación. La tecnología de conjugación necesita ser optimizada para cada polisacárido capsular que contienen y la producción del componente polisacárido es cara (Sobanjo-ter Meulen *et al.*, 2015; McFetridge *et al.*, 2015).

Otro enfoque a este tema es el de desarrollar vacunas antineumocócicas de proteínas, en las que no es determinante el serotipo capsular. Con estas nuevas vacunas se aspira a resolver el fenómeno del remplazo de serotipos y constituyen una alternativa más económica para países en desarrollo (Patón y Boslego, 2008).

Diferentes proteínas se han barajado como candidatas a estas novedosas vacunas, como son: PspA (proteína A de superficie), PsaA (adhesina A de superficie), Cbp A (colina unida a proteína A), Sps A (IgA secretada por neumococo unida a proteína), neumolisina y neuraminidasa. La proteína que parece tener más futuro para esta propuesta es la proteína A de superficie (PspA), pues los estudios realizados en animales y humanos demuestran que los anticuerpos contra esta protege frente a infecciones neumocócicas y su disminución se asocia con una mayor frecuencia de infección neumocócica invasiva, sin embargo requiere de más estudios para demostrar su eficacia (Vilá y Bello, 2004).

También se realizan esfuerzos para la obtención de una vacuna intranasal, de células vivas de *S. pneumoniae* en la que suprimen los genes que codifican para factores de virulencia. Se ha demostrado que ésta vacuna puede prevenir el estado de portador, la infección pulmonar y la sepsis por *S. pneumoniae*. Esta no requiere inactivación o adyuvantes y se obtienen a través de un proceso de fabricación menos costoso; sin embargo, la posibilidad de reversión de las células al estado virulento original constituye un motivo de preocupación (Tarahomjoo, 2014).

Al mismo tiempo, como consecuencia del progreso de la genómica y la propuesta de estrategias innovadoras, tales como la vacunología inversa, se experimenta también con vacunas de ADN. La secuenciación de ADN ha conducido a una comprensión más completa de este patógeno y de la respuesta inmune que genera en el humano (Delany *et al.*, 2013; Talukdar *et al.*, 2014).

Las vacunas de ADN son una buena perspectiva de futuro porque, además de ofrecer una protección amplia para los distintos serotipos de neumococo, ofrecen otras ventajas a tener en cuenta: *a)* son más fáciles de producir y purificar, con un bajo costo y un uso potencial más amplio, y *b)* son más estables al calor que las vacunas clásicas por lo que su

almacenamiento es menos problemático. Ambas ventajas son muy importantes para su utilización en países en vías de desarrollo (Vilá y Bello, 2004).

Por otro lado este enfoque está apuntando a nuevos sistemas y esquemas de administración, entre los que destaca el de la vacunación personalizada que es particularmente relevante para los ancianos (Oviedo-Orta *et al.*, 2013).

*I. I. I. Materiales y Métodos*

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Diseño general de la investigación

Para responder a los objetivos propuestos se llevó a cabo en el LNRN-IPK una investigación descriptiva prospectiva que se extendió por un año (Enero-Diciembre del 2015), dirigida a la caracterización en serotipos y susceptibilidad a los antimicrobianos de aislados cubanos de *S. pneumoniae*, invasivos y nasofaríngeos.

El protocolo de investigación fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética de Investigación-IPK (Código de aprobación: CEI IPK 32-15; Anexo 1).

La investigación se estructuró como se muestra en la Figura 3.1. Simultáneamente se condujeron dos estudios:

- En el Estudio 1 el universo estuvo constituido por el total de los aislados invasivos de *S. pneumoniae* recibidos viables en el LNRN-IPK durante todo el año 2015, remitidos desde las diferentes provincias del país. También se incluyeron los aislados recuperados de OMA. Este estudio se desarrolló en el marco de la actividad de referencia y vigilancia poblacional de la ENI que se hace en Cuba sobre la base de aislados meníngeos fundamentalmente.
- En el Estudio 2 el universo fue el total de niños  $\leq 5$  años con diagnóstico de infección respiratoria aguda grave (IRAG) y con indicación de una toma de muestra de exudado nasofaríngeo (ENF) para la determinación del estado de portador para neumococo. Este se desplegó en el marco de vigilancia centinela de la ENI en niños  $\leq 5$  años de edad, de base hospitalaria y con énfasis en el estudio de las neumonías adquiridas en la comunidad, al que se hizo referencia en el capítulo de Introducción de este documento.

En ambos estudios los datos de la edad de los pacientes y del diagnóstico clínico se obtuvieron del Modelo de recolección de datos sobre muestras para el diagnóstico microbiológico o envío de cepas para el trabajo de referencia nacional en el IPK (modelo

aprobado por el Minsap), que acompañó a los aislados y a los exudados nasofaríngeos al ser recibidos en el LNRN-IPK (Anexo 2).

Tema de investigación	Preguntas a responder	Tipo de vigilancia
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Estudio 1</b> - Enfermedad neumocócica invasiva</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ¿Cual es la frecuencia de serotipos por edad y tipo de enfermedad neumocócica?</li> <li>• ¿Cuáles son los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos?</li> <li>• ¿Cual es la cobertura serotípica de las vacunas conjugadas (VCN10, VC13 y CVC7-T)?</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Vigilancia poblacional</b> - Inclusión de todos los aislados de <i>S. pneumoniae</i> responsable de enfermedad remitidos al LNRN-IPK (todas las edades y hospitales)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Estudio 2</b> - Portación nasofaríngea de <i>S. pneumoniae</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ¿Cual es la frecuencia de colonización nasofaríngea por neumococo entre niños <math>\leq 5</math> años con diagnóstico de IRAG?</li> <li>• ¿Cuáles son los serotipos más frecuentes entre los portadores nasofaríngeos?</li> <li>• ¿Cual son los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos entre los aislados nasofaríngeos?</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Vigilancia centinela de base hospitalaria</b> - Inclusión de todos los niños <math>\leq 5</math> años con diagnóstico de IRAG, ingresados en los hospitales centinelas, a los cuales se les tomó muestra de ENF.</li> </ul>

**Figura 3.1 Organigrama de la investigación para la caracterización en serotipos y susceptibilidad a los antimicrobianos de aislados cubanos invasivos y nasofaríngeos de *S. pneumoniae* en el LNRN-IPK el 2015.**

### 3.2 Confirmación de los aislados invasivos de *S. pneumoniae* recibidos en el LNRN-IPK (Estudio 1).

Para la confirmación de los aislados invasivos de *S. pneumoniae* en el marco de la actividad de referencia/vigilancia de la ENI se siguió el procedimiento normalizado en el LNRN-IPK (Figura 3.2) de acuerdo con las recomendaciones internacionales (Perrila *et al.*, 2003).

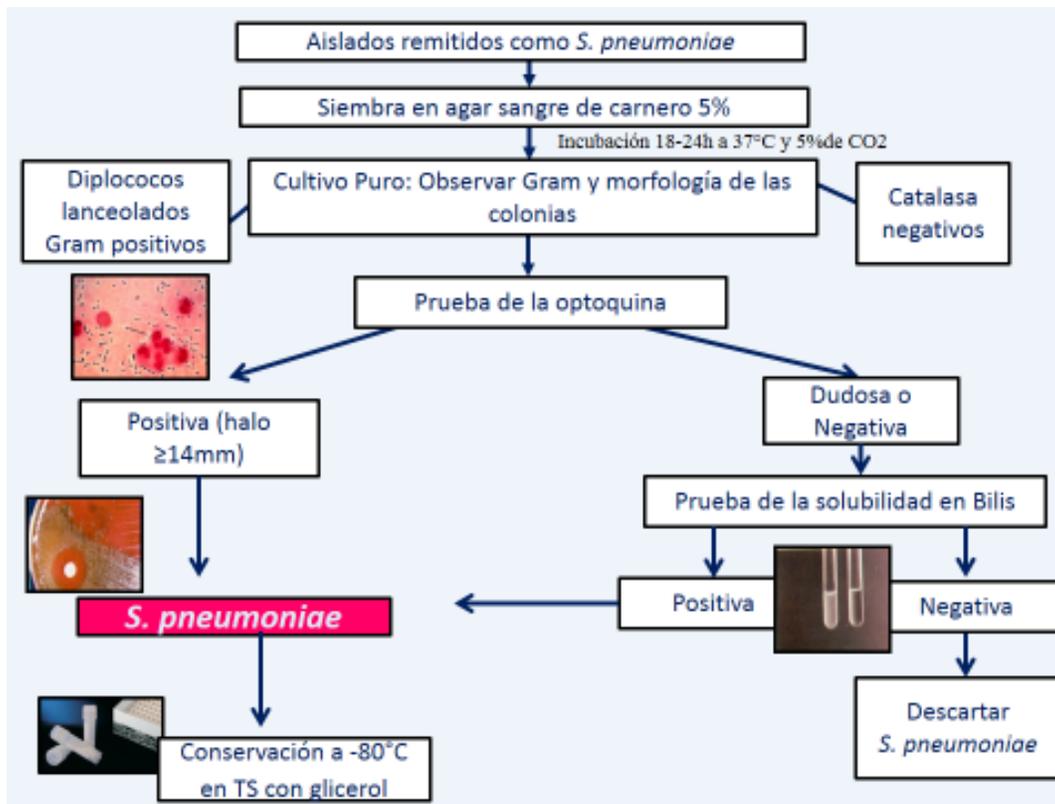


Figura 3.2 Diagrama de flujo para la confirmación de la identificación como *S. pneumoniae* de los aislados invasivos remitidos al LNRN-IPK.

Para comprobar la viabilidad y pureza de cada aislado recibido estos se cultivaron en placas de agar sangre de carnero al 5% durante 18 a 24 horas, a 35 °C y en atmósfera de CO<sub>2</sub> (5%). Tras corroborar el desarrollo de colonias α hemolíticas, pequeñas, de bordes lisos, no pigmentadas y con depresión central (rasgo distintivo de la generalidad de los cultivos de neumococo que no obstante no se consideró indispensable) se realizó tinción de Gram para verificar al microscopio la presencia de diplococos lanceolados y Gram positivos.

Para la identificación como *S. pneumoniae* se emplearon las pruebas de optoquina y solubilidad en bilis, incluyendo como control positivo en ambos casos la cepa de referencia *S. pneumoniae* ATCC 49619.

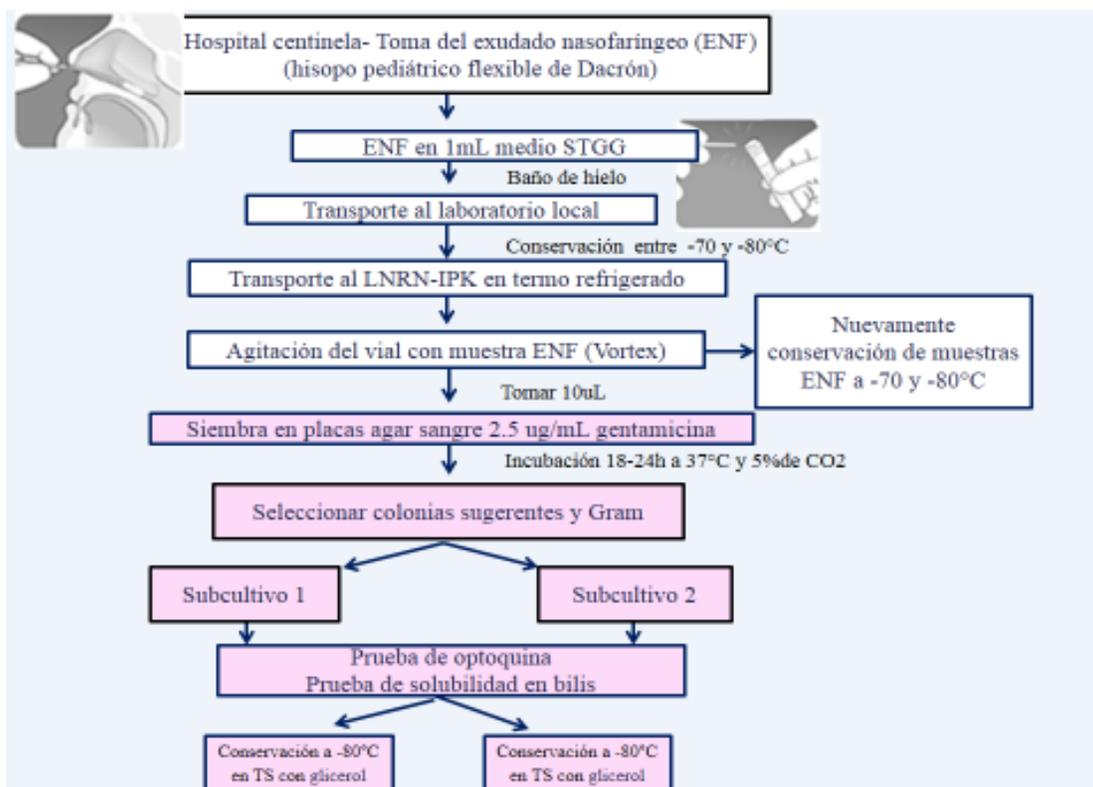
Para la prueba de la susceptibilidad a la optoquina (hidrocloruro de etilhidrocupreína) se tomó con un asa bacteriológica una colonia de cada aislado en estudio y se estrió en forma confluyente sobre una placa de agar sangre de carnero al 5%. Seguidamente, sobre la superficie del agar inoculado se colocó un disco de optoquina (5 µg) y el cultivo se incubó durante 24 horas en atmósfera de CO<sub>2</sub> a 35°C. Se informaron aislados con identificación confirmada para *S. pneumoniae* todos aquellos en los que se observó un halo de inhibición del crecimiento  $\geq 14$  mm alrededor del disco de optoquina.

En el caso de los aislados para los que se registraron zonas de inhibición negativa o dudosa (entre 6 y 14 mm) se realizó la prueba de solubilidad en bilis. Para ello, a partir de una asada del cultivo de la misma placa de agar sangre en la cual se obtuvo el resultado negativo/dudoso a la optoquina (18-24 horas) se preparó una suspensión celular en un tubo conteniendo 1 mL de solución salina estéril, hasta lograr una concentración equivalente al tubo 1 de la escala de Mac Farland. De esta suspensión se transfirieron 0,5 mL a otro tubo al que se añadieron 0,5 mL de desoxicolato de sodio al 2% (tubo prueba); y al tubo inicial se añadieron otros 0,5 mL de solución salina (tubo control). Ambos se incubaron entre 2 y 3 horas, a 35 - 36 °C, con observación cada 30 min. Ante la aparición de transparencia parcial o total en el tubo prueba, mientras que en el tubo control se mantuvo la turbidez, se informó la prueba como positiva a la solubilidad en bilis y se confirmó como *S. pneumoniae* el aislado en estudio, independientemente del resultado de la prueba de optoquina.

Los aislados para los que se confirmó la identificación se conservaron a - 80 °C en viales conteniendo medio Triptona Soya con Glicerol al 15%, para su posterior caracterización en función de serotipos y susceptibilidad a antimicrobianos. Para la conservación se les asignó el número de orden que les correspondió en la Base de Datos de la Vigilancia de aislados invasivos de *S. pneumoniae* del LNRN-IPK (BD-IRAB-05).

### 3.3 Procesamiento de los exudados nasofaríngeos remitidos al LNRN-IPK en el marco de la vigilancia centinela de la ENI en niños $\leq 5$ años de edad (Estudio 2).

En el marco de la vigilancia centinela de la ENI en niños  $\leq 5$  años de edad cada hospital participante es responsable de definir la estrategia más conveniente y oportuna a sus condiciones para la indicación y obtención de una muestra de ENF a los niños con diagnóstico de IRAG. Por eso, la toma de los ENF incluidos en esta investigación estuvo a cargo del laboratorio de Microbiología de cada sitio. En la Figura 3.3 se muestra el flujo de trabajo que se siguió desde la obtención de las muestras en los hospitales centinelas hasta el inicio de su procesamiento en el LNRN-IPK.



**Figura 3.3** Flujo de trabajo seguido desde la obtención de los ENF en los hospitales centinelas hasta su procesamiento en el LNRN-IPK, para el estudio de colonización nasofaríngea de *S. pneumoniae* en niños  $\leq 5$  años con diagnóstico de IRAG, 2015.

Se emplearon para este propósito hisopos pediátricos flexibles de dacrón que tras la obtención de la muestra se colocaron en viales conteniendo 1 mL de medio Triptona Soya

con Glicerol y Glucosa (STGG) y se transportaron en un baño de hielo al laboratorio local. Una vez allí se conservaron en congelación (entre -70 y -80 °C) hasta su envío (en termo refrigerado) al LNRN-IPK, donde fueron procesados de inmediato para evitar procesos repetidos de congelación y descongelación (O'Brien *et al.*, 2003).

Los viales conteniendo las muestras de ENF se agitaron vigorosamente (20 - 30 segundos) y de cada uno se tomaron 10 µL que se inocularon en placas de agar sangre conteniendo 2,5 µg/mL de gentamicina. Las placas se incubaron por 18 -24 h a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>, tras las cuales se inspeccionaron los cultivos en busca de colonias sugerentes de *S. pneumoniae*. En cada caso se seleccionaron dos colonias típicas y a partir de cada una se procedió simultáneamente a la identificación (sub cultivos 1 y 2), siguiendo el mismo flujo de trabajo descrito para la confirmación de la identificación de los aislados invasivos remitidos al LNRN-IPK, detallado anteriormente para el Estudio 1. Los aislados de *S. pneumoniae* recuperados de los ENF se conservaron a - 80 °C en viales conteniendo medio Triptona Soya con Glicerol al 15% para su posterior caracterización en serotipos y susceptibilidad a antimicrobianos. Para los ENF en que ambos sub cultivos se identificaron como neumococo se realizó la conservación de manera independiente. Para ello, se le asignó un código constituido por el número con el que se identificó el ENF en la Base de Datos de la Vigilancia de Portadores de *S. pneumoniae* del LNRN-IPK (BD-IRAB-08) y un subíndice para indicar el sub cultivo. Esta diferenciación se mantuvo hasta conocer el resultado del serotipaje, previendo la posibilidad que un mismo niño pudiera estar colonizado por más de un serotipo de *S. pneumoniae*.

### **3.4 Determinación del serotipo capsular de los aislados invasivos y nasofaríngeos de *S. pneumoniae*.**

Para la determinación del serotipo capsular se empleó la reacción de Neufeld - Quellung o reacción de hinchamiento capsular, utilizando el juego de reactivos Pneumotest (*Statens Serum Institute*, Copenhagen, Dinamarca) (Habib, 2014). Se incluyó sistemáticamente como control de la prueba a la cepa *S. pneumoniae* ATCC 49619 (serotipo 19F), conservada en la colección del LNRN-IPK. A continuación se describe el procedimiento que se siguió:

- Para cada aislado se dispusieron cuatro láminas portaobjetos.
- En cada lámina se colocaron dos gotas (1  $\mu$ L) de solución salina, una en cada extremo.
- Con un asa se tocó una colonia del aislado en estudio y se emulsionó en cada gota.
- Sobre cada gota se adicionó 1  $\mu$ L del pool correspondiente en el juego de reactivos Pneumotest, como se describe a continuación: Lámina 1 - pooles A y B; lámina 2 - pooles C y D; lámina 3 - pooles E y F y lámina 4 - pooles H y Omnisuero (Conjunto de sueros).
- Se colocó un cubreobjetos sobre cada suspensión y sobre este una gota de aceite de inmersión.
- Se examinó al microscopio con el objetivo de 100x.
- Se informó positivo el pool para el que se visualizó un hinchamiento de la cápsula (aumento del tamaño) y aglutinación de las células.
- Seguidamente, dependiendo del resultado hasta este paso, se repitió el procedimiento para los pooles P, Q, R, S o T, en correspondencia con el algoritmo que propone el Tablero para la serotipificación de *S. pneumoniae* con el empleo del juego de reactivos Pneumotest, que se muestra en la Figura 3.4. Por ejemplo, si la prueba resultó positiva para el pool H se repitió el procedimiento para P, Q y S.

En los casos en los que hasta este paso solo fue posible identificar el Grupo (señalados con \* en el Tablero) se realizó la misma operación pero empleando entonces los sueros factores requeridos para identificar el serotipo (Statens Serum Institute, Copenhagen, Dinamarca). Los más frecuentes y el patrón de reactividad esperado se muestran en el Anexo 3. Cuando no se dispuso de los sueros factores se informó el resultado en función de Grupo.

Los aislados para los que no se registró ninguna reacción positiva se informaron sin serotipar.

Si el serotipo de los sub cultivos 1 y 2 de un ENF resultó ser el mismo, ambos se consideraron como un único aislamiento para la caracterización posterior atendiendo a la susceptibilidad a los antimicrobianos.

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

**Figura 3.4. Tablero para la serotipificación de aislados de *S. pneumoniae* con el empleo del Pneumotest.**

\* Indica el Grupo.

<sup>a</sup> Los polivalentes G e I no reaccionan con los tipos más frecuentes, que son los incluidos en la vacuna de 23 serogrupos, por lo que no están contenidos en el tablero.

### 3.5 Estudio de la susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislados invasivos y nasofaríngeos de *S. pneumoniae*.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en caldo siguiendo el procedimiento recomendado por el *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI). Los antimicrobianos y los rangos de concentración probados fueron: penicilina (16 - 0,015 µg/mL), ceftriaxona (8 - 0,007 µg/mL), vancomicina (16 - 0,015 µg/mL), eritromicina (16 - 0,015 µg/mL), cloranfenicol (32 - 0,03 µg/mL) y trimetoprim/sulfametoxazol (TMT/SMX) (64/1216 - 0,06/1,1 µg/mL) (CLSI, 2015). Todos los antimicrobianos provenían de la casa comercial Sigma.

Se utilizaron placas de microdilución estériles de 96 pocillos y de fondo U (Nunc<sup>tm</sup>). A cada pocillo se añadieron 50 µL de caldo Mueller Hinton con cationes ajustados (Biolife), suplementado con 2-3% de sangre lisada de caballo (CMHAC-SLC) y las diferentes concentraciones de las drogas, como se describe en el siguiente acápite.

### 3.5.1 Preparación de las placas para la determinación de la CMI.

A continuación se describen detalladamente los cálculos y el procedimiento seguido para la preparación de las placas de microdilución, tomando como ejemplo a la penicilina; para el resto de las drogas esta información se resume en el Anexo 4.

Aplicando la siguiente fórmula se prepararon 10 mL de la solución madre de penicilina en agua destilada estéril como solvente, a una concentración de 1 280  $\mu\text{g/mL}$ .

$$m = V \times [ ] / P$$

Donde:

m: cantidad que se debe pesar de la droga (mg)

V: volumen que se desea preparar de la solución madre (mL)

[ ]: Concentración a la que debe quedar la droga en la solución madre ( $\mu\text{g/mL}$ )

P: potencia de la droga ( $\mu\text{g/mg}$ ) que informa la casa comercial en la etiqueta del frasco

La solución así preparada se distribuyó en alícuotas pequeñas (en función de  $V_1$ , como se describe más adelante) y se conservaron a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . En el momento de preparar las diluciones se removió una alícuota de la conservación y se calculó el volumen necesario para preparar 10 mL (suficiente para 10 placas) de la primera dilución a colocar en la placa de microdilución: [8  $\mu\text{g/mL}$ ], pero se calculó para [16  $\mu\text{g/mL}$ ], para que al diluir v/v en el momento de montar la prueba quedara en la concentración deseada.

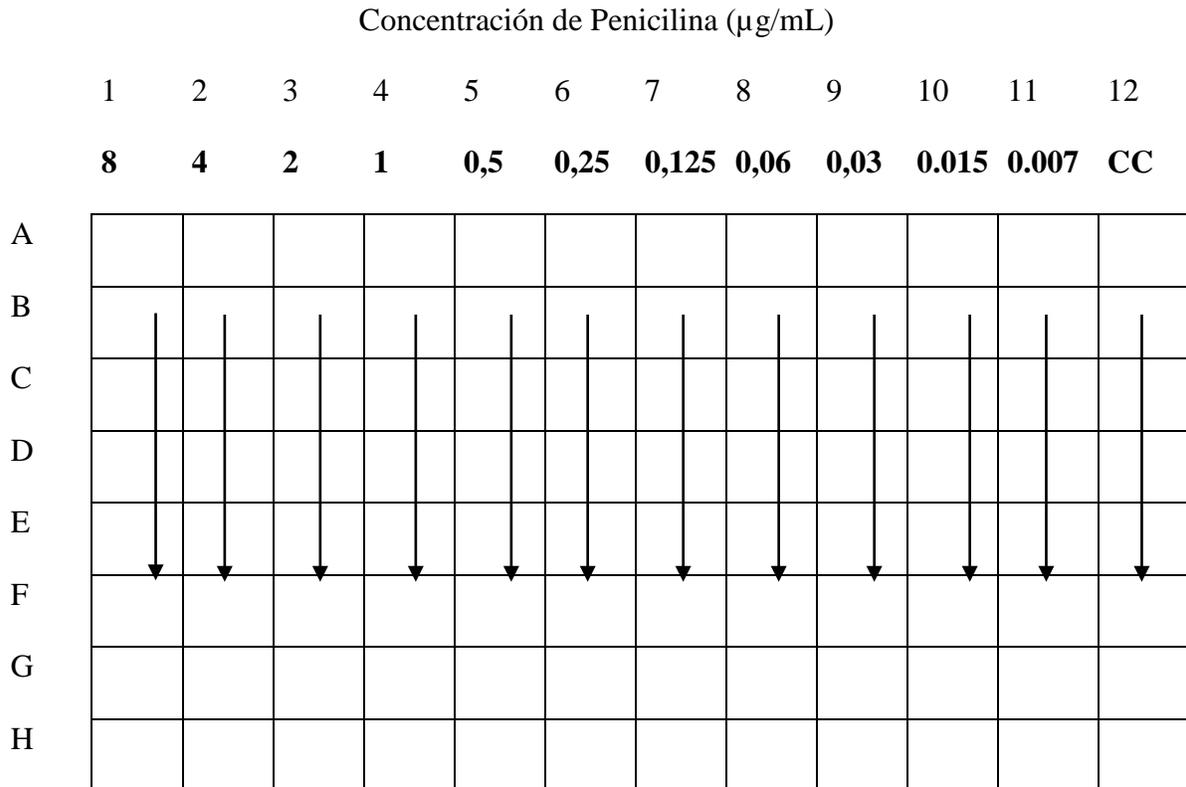
$$1\ 280\ \mu\text{g/mL} \times V_1 = 16\ \mu\text{g/mL} \times 10\ \text{mL}$$

$$V_1 = 125\ \mu\text{L}$$

Se tomaron entonces 125  $\mu\text{L}$  de la solución madre de penicilina y se colocaron en un volumétrico de 10 mL. Se completó el volumen con CMHAC-SLC.

Para la preparación de las diluciones de la droga se dispusieron 11 tubos (16 x 160 mm) en una gradilla y se identificaron en correspondencia con la concentración de esta que se deseaba obtener en cada uno. Del segundo tubo en adelante se colocaron 5 mL de caldo de cultivo. Al primer tubo se añadieron los 10 mL de la dilución del antimicrobiano preparada

previamente en el volumétrico y 5 mL se transfirieron al segundo tubo, 5 mL de este al tercero y así sucesivamente hasta llegar al tubo número 11. Para el llenado o sensibilización de las placas se dispensaron 50  $\mu$ L de cada una de las diluciones del antibiótico en el pozo respectivo (pozos 1 al 11), como se muestra en el siguiente esquema.



**Figura 3.5** Esquema para el llenado de una placa de microdilución durante la sensibilización con penicilina para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de la droga frente a aislados de *S. pneumoniae*, LNRN-IPK, 2015.

Los números al inicio de cada columna (1-11) significan la concentración de penicilina que se añadió desde la fila A hasta la H. Las filas de la A hasta la G se corresponden, cada una, con un aislamiento en estudio en el momento de la realización de la prueba. La fila H se reservó para la cepa control *S. pneumoniae* ATCC 49619; y la que se identifica con CC (columna 12) se empleó como control de crecimiento, por lo que en todos los pocillos de esta columna solo se añadieron 50  $\mu$ L de CMHAC-SLC.

Las placas se sellaron con plástico adhesivo y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Se descongelaron 30 minutos antes de la inoculación.

### **3.5.2 Preparación del inóculo y siembra de las placas de microdilución.**

Los inóculos de los aislados en estudio se prepararon en solución salina estéril a partir de cultivos de 18- 24 horas de incubación. Se ajustó la concentración a  $5 \times 10^4$  UFC/mL, para lo que se realizó la lectura de la densidad óptica en un fotocolorímetro (WPA Modelo CO 700D) a 625 nm (DO = 0,08 - 0,13). De esta suspensión se tomaron 50  $\mu\text{L}$  y se añadieron a 4,95 mL de CMHAC-SLC. De la dilución así lograda (1/100) para cada aislado se colocaron 50  $\mu\text{L}$  en todos los pocillos de una misma fila.

Como control de prueba en cada placa se incluyó la cepa *S. pneumoniae* ATCC 49619. Adicionalmente se llevó a cabo un control de inóculo o recuento del inóculo bacteriano utilizado. Para esto, al azar, de algunos de los aislados se tomaron 10  $\mu\text{L}$  del pocillo 12 y se diluyeron en 10 mL de solución salina estéril; se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  de esta dilución a una placa de agar sangre y con una espátula de vidrio se expandió el inóculo. Se incubó a  $35-37^{\circ}\text{C}$  por 24 h, al término de las cuales el conteo de colonias debió oscilar entre 10 y 50 para considerar válida la prueba.

Las placas de microdilución se incubaron a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, tras las que se procedió a la lectura, visualmente. La concentración a partir de la que no se observó crecimiento de la bacteria se consideró como la CMI y los resultados se interpretaron siguiendo los criterios del CLSI (CLSI, 2015).

Para la interpretación de los resultados para penicilina y ceftriaxona se tomó en consideración la procedencia de los aislados (Tabla 3.1). Para los aislados meníngeos y extra meníngeos se utilizaron los valores de corte definidos respectivamente para el uso de penicilina y ceftriaxona por vía parenteral. Para los aislados nasofaríngeos los resultados de susceptibilidad a penicilina se compararon aplicando dos criterios: los valores de corte para el uso de la penicilina por vía parental ante infecciones extra meníngea y los establecidos para el empleo de esta por vía oral (CLSI, 2015).

**Tabla 3.1 Valores de corte utilizados para interpretar los resultados de susceptibilidad a penicilina y ceftriaxona de aislados invasivos y nasofaríngeos de *S. pneumoniae* en el LNRN-IPK, 2015.**

Tipo de aislamiento y vía de administración del antibiótico	Categoría de susceptibilidad y CMI µg/mL		
	Sensible	Intermedia	Resistente
Penicilina			
Meníngeo, intravenosa	≤ 0,06	-	≥ 0,12
No meníngeo, intravenosa	≤ 2	4	≥ 8
Nasofaríngeos, oral	≤ 0,06	0,12 - 1	≥ 2
Ceftriaxona			
Meníngeo	≤ 0,5	1	≥ 2
No meníngeo*	≤ 1	2	≥ 4

\* Se incluyen los exudados nasofaríngeos

### 3.6 Análisis de los resultados.

Para el análisis descriptivo de los resultados se confeccionó una base de datos en soporte digital utilizando el programa Microsoft Office Excel 2010 en la que se incluyeron las variables que se muestran en la Tabla 3.2. Se confeccionaron tablas de frecuencias y gráficos.

Para estimar la cobertura teórica de serotipos para las VCN con posibilidades de ser empleadas en Cuba (VCN10v, VCN13v y CVC7-T) se comparó el grado de concordancia entre los serotipos contenidos en estas y los serotipos de los responsables de enfermedad en el período de estudio. El resultado se expresó en por ciento.

**Tabla 3.2 Variables consideradas durante el estudio de aislados nasofaríngeos e invasivos de *Streptococcus pneumoniae* en el LNRN-IPK, 2015.**

Variables	Variables		
	Clasificación	Categorías	Definición
Grupos de edad	Cuantitativa continua	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ &lt;12 meses</li> <li>▪ de 12-23 meses</li> <li>▪ de 24-59 meses</li> <li>▪ de 5-18 años</li> <li>▪ de 19-59 años</li> <li>▪ ≥ 60 años</li> </ul>	Años cumplidos al enfermar
Serotipos	Cualitativa nominal	Se reconocen actualmente 97 serotipos para <i>S. pneumoniae</i>	Tipo antigénico capsular de cada aislado en estudio
Enfermedad	Cualitativa nominal	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Meningitis</li> <li>▪ Neumonía</li> <li>▪ Bacteriemia</li> <li>▪ Pericarditis</li> <li>▪ OMA</li> </ul>	Diagnóstico clínico que informó el hospital de procedencia del paciente
Susceptibilidad antimicrobiana	Cualitativa ordinal	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Susceptibilidad</li> <li>▪ Susceptibilidad Intermedia</li> <li>▪ Resistencia</li> </ul>	Susceptibilidad demostrada para cada aislamiento en estudio
Portador nasofaríngeo	Cualitativa nominal	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Si</li> <li>▪ No</li> </ul>	Resultado del cultivo del exudado nasofaríngeo

Para distinguir los perfiles de susceptibilidad a los antimicrobianos de los serotipos vacunales y no vacunales estos se definieron como:

- Serotipo vacunales - los serotipos contenidos en la VCN10v, VCN13v y CVC7-T.
- Serotipos no vacunales - los no contenidos en las vacunas antes mencionadas.

Se consideraron MDR a aquellos aislados para los que se demostró resistencia a penicilina y para al menos otras dos clases de los antibióticos estudiados.

Para comparar los resultados de susceptibilidad obtenidos para la penicilina aplicando los diferentes valores de corte (penicilina por vía parental ante infecciones extra meníngeas y penicilina vía oral) y los perfiles de susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislados nasofaríngeos y de los responsables de enfermedad entre niños  $\leq 5$  años se utilizó el programa para análisis epidemiológico de datos tabulados EpiDATA, versión 3.1 (EpiData Association, Dinamarca), con un intervalo de confianza del 95%.

*IV. Resultados*

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Estudio de aislados de *S. pneumoniae* responsables de enfermedad

#### 4.1.1 Descripción del universo del estudio

En la Tabla 4.1 se muestra la procedencia de los aislados incluidos en el Estudio 1, en función del tipo de enfermedad neumocócica y el grupo de edad de los pacientes. Entre enero-diciembre 2015 resultaron útiles para su estudio en el LNRN-IPK, 131 aislados de *S. pneumoniae* que constituyeron el total de los viables y confirmados entre los remitidos desde las diferentes provincias (Total 150; seis aislados se informaron contaminados, dos como no viables y para 11 no se corroboró la identificación como neumococo).

**Tabla 4.1. Repartición de aislados de *S. pneumoniae* según tipo de enfermedad neumocócica y grupo de edad, Cuba 2015.**

Enfermedad neumocócica	Grupo de edad									Total
	< 12 m	12-23 m	24-59 m	5-18 a	Total	19-59 a	≥60 a	Total	Sin dato	
Meningitis	6	13	1	0	20	22	24	46	5	<b>71</b>
Neumonía	6	21	12	2	41	1	2	3	4	<b>48</b>
Bacteriemia	1	2	0	1	4	0	0	0	1	<b>5</b>
OMA	3	2	0	0	5	0	0	0	1	<b>6</b>
Pericarditis	0	1	0	0	1	0	0	0	0	<b>1</b>
<b>Sub-Total</b>	<b>16</b>	<b>39</b>	<b>13</b>	<b>3</b>	<b>71</b>	<b>23</b>	<b>26</b>	<b>49</b>	<b>11</b>	<b>131</b>

OMA - Otitis media aguda; m- meses; a- años

Para 11 de los aislados no se conoció el dato de la edad de los pacientes a partir de cuyas muestras se recuperaron; 71 fueron responsables de enfermedad en niños (0-18 años) y 49 en adultos. El mayor número de aislados provino de meningitis, seguido de las neumonías. Solo se recibieron cinco aislados de bacteriemia, seis de OMA y uno de pericarditis, todos provenientes de casos en niños. Los aislados meníngeos provinieron fundamentalmente de adultos: 24 en  $\geq 60$  años y 22 en el grupo de 19-59 años de edad. En cambio, los aislados de neumonía procedieron mayoritariamente de casos de enfermedad en niños (41 de 48

aislados estudiados), mientras que en el grupo de los adultos solo quedaron incluidos tres recuperados de neumonía.

#### **4.1.2 Frecuencia de serotipos capsulares entre los aislados invasivos de *S. pneumoniae*.**

En la Tabla 4.2 se resume el número de aislados para cada uno de los serotipos identificados, según el tipo de enfermedad. Entre los 131 aislados estudiados se demostraron 16 serotipos diferentes; 11 de ellos considerados serotipos vacunales (3, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F). No se encontraron los serotipos 1 y 5.

Se informó el serotipo para 126 de los aislados (96,15%) y cinco se notificaron SS. Los más frecuentes fueron: 14 (21,37%), 19A (20,61%), 19F (10,68%), 23F (10,68%), 6A (7,63%), 3 (6,8%) y 6B (5,34%), que en conjunto representaron el 83,11% del total. Entre los aislados meníngeos se observó un predominio del serotipo 14, mientras que el 19A fue el más frecuente entre las neumonías, seguido del 14 y 6A. Entre los aislados de pericarditis, bacteriemia y OMA se demostraron los serotipos 14, 19A, 19F y 23F.

En las Tabla 4.3 y 4.4 se resume el número de aislados para los serotipos responsables de enfermedad en niños (total- 71) y adultos (total- 49), respectivamente. Los 11 aislados para los que no se dispuso de este dato no se incluyeron en ninguna de las dos tablas.

Los serotipos más frecuentemente implicados en la enfermedad neumocócica en niños (Tabla 4.3) fueron: 14, 19A y 6A. El serotipo 14 se demostró en 23 aislados recuperados de enfermedad en los grupos de menores de 12 meses, de 12-23 y 24-59 meses de edad. El serotipo 19A se identificó en 17 aislados y se presentó en todos los grupos. El serotipo 6A se informó para siete aislados obtenidos de enfermedad en niños menores de 12 meses y en el grupo de 12-23 meses de edad. En cambio en los adultos (Tabla 4.4) predominaron los serotipos 23F, 19A, 19F y 3 en ambos grupos de edad definidos para el análisis. Para el 23F se apreció un predominio en los adultos  $\geq 60$  años (ocho aislados).

Tabla 4.2. Número de aislados por serotipos de *S. pneumoniae* según el tipo de enfermedad, Cuba 2015.

Serotipos	Meningitis	Neumonía	Bacteriemia	Pericarditis	OMA	Total (%)
<b>3</b>	6	3				<b>9 (6,8%)</b>
<b>4</b>		1				1 (0,76%)
<b>6A</b>	3	7				<b>10 (7,63%)</b>
<b>6B</b>	4	3				<b>7 (5,34%)</b>
<b>6C</b>		3				3 (2,29%)
<b>7F</b>	2					2 (1,52%)
<b>9V</b>	2					2 (1,52%)
<b>10A</b>	1					1 (0,76%)
<b>14</b>	13	12	2		1	<b>28 (21,37%)</b>
<b>15C</b>	1					1 (0,76%)
<b>18A</b>	3					3 (2,29%)
<b>18C</b>	2					2 (1,52%)
<b>19A</b>	9	14	1	1	2	<b>27 (20,61%)</b>
<b>19F</b>	10	2	1		1	<b>14 (10,68%)</b>
<b>23F</b>	12				2	<b>14 (10,68%)</b>
<b>23B</b>	2					2 (1,52%)
<b>SS</b>	1	3	1			5 (3,81%)
<b>Total</b>	71	48	5	1	6	131

OMA - Otitis media aguda; SS - Sin serotipar

Serotipos vacunales - 3, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F

Serotipo no vacunales - 6C, 10A, 15C, 18A y 23B

**Tabla 4.3. Número de aislados por serotipos de *S. pneumoniae* identificados responsables de enfermedad en niños (n=71), según el grupo de edad, Cuba 2015.**

Edad	Número de aislados											
	3	4	6A	6B	6C	14	15C	18A	19A	19F	23F	SS
< 12 meses (n=15)	2		2	1		3		1	4	1	1	
12-23 meses (n= 35)	1	1	5	2	3	13	1		5	3	1	
24-59 meses (n=18)				3		7			7		1	
5-18 años (n=3)									1			2
Total =71	3	1	7	6	3	23	1	1	17	4	3	2

SS- Sin serotipar

Solo se incluyen 11 de los 16 serotipos informados para el total de los aislados estudiados en el período porque para los recuperados de enfermedad neumocócica en niños no se notificaron los serotipos 7F, 9V, 10A, 18C y 23B.

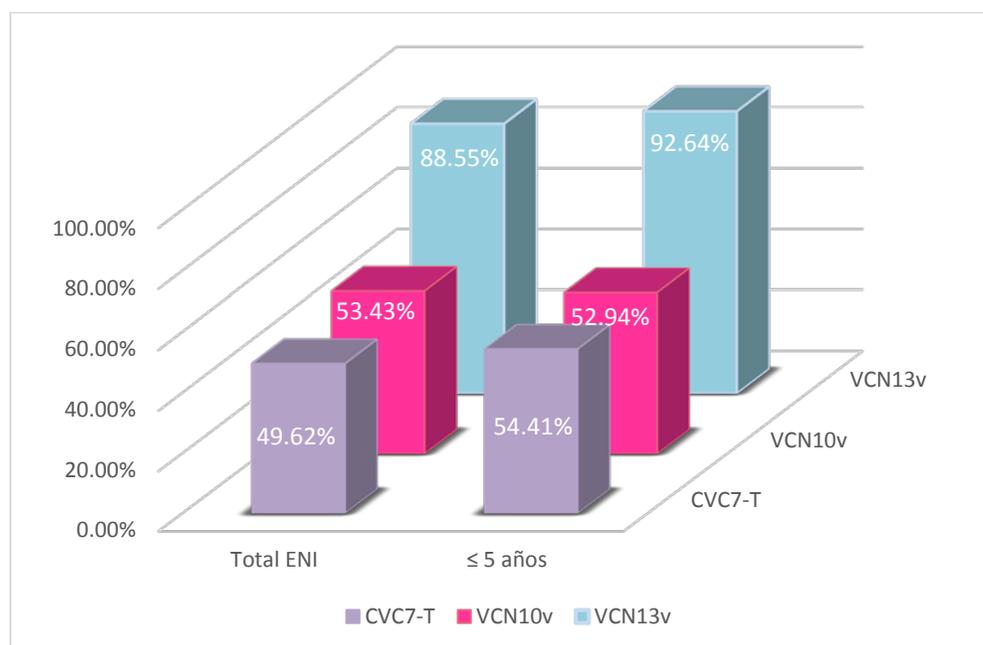
**Tabla 4.4. Número de aislados por serotipos de *S. pneumoniae* identificados responsables de enfermedad en adultos (n=49), según el grupo de edad, Cuba 2015.**

Edad años	Número de aislados												
	3	6A	6B	7F	9V	14	18A	18C	19A	19F	23F	23B	SS
19-59 (n=23)	3	1		1	1	1	1	1	4	4	3	1	2
≥60 (n=26)	2		1	1	1	1	1	1	4	4	8	1	1
Total (n=49)	5	1	1	2	2	2	2	2	8	8	11	2	3

SS- Sin serotipar

Solo se incluyen 12 de los 16 serotipos informados para el total de los aislados estudiados en el período porque para los recuperados de enfermedad neumocócica en adultos no se notificaron los serotipos 4, 6C, 10A y 15C

En la Figura 4.1 se representa la cobertura teórica de serotipos estimada para las VCN10v y VCN13v y para el CVC7-T, a partir de la frecuencia de serotipos de aislados invasivos de *S. pneumoniae*. Como se aprecia (en la parte izquierda de la Figura 4.1) para la VCN10v y el CVC7-T la cobertura fue similar: 53,43% y 49,62%, respectivamente; mientras que para la VCN13v fue superior: 88,55%.



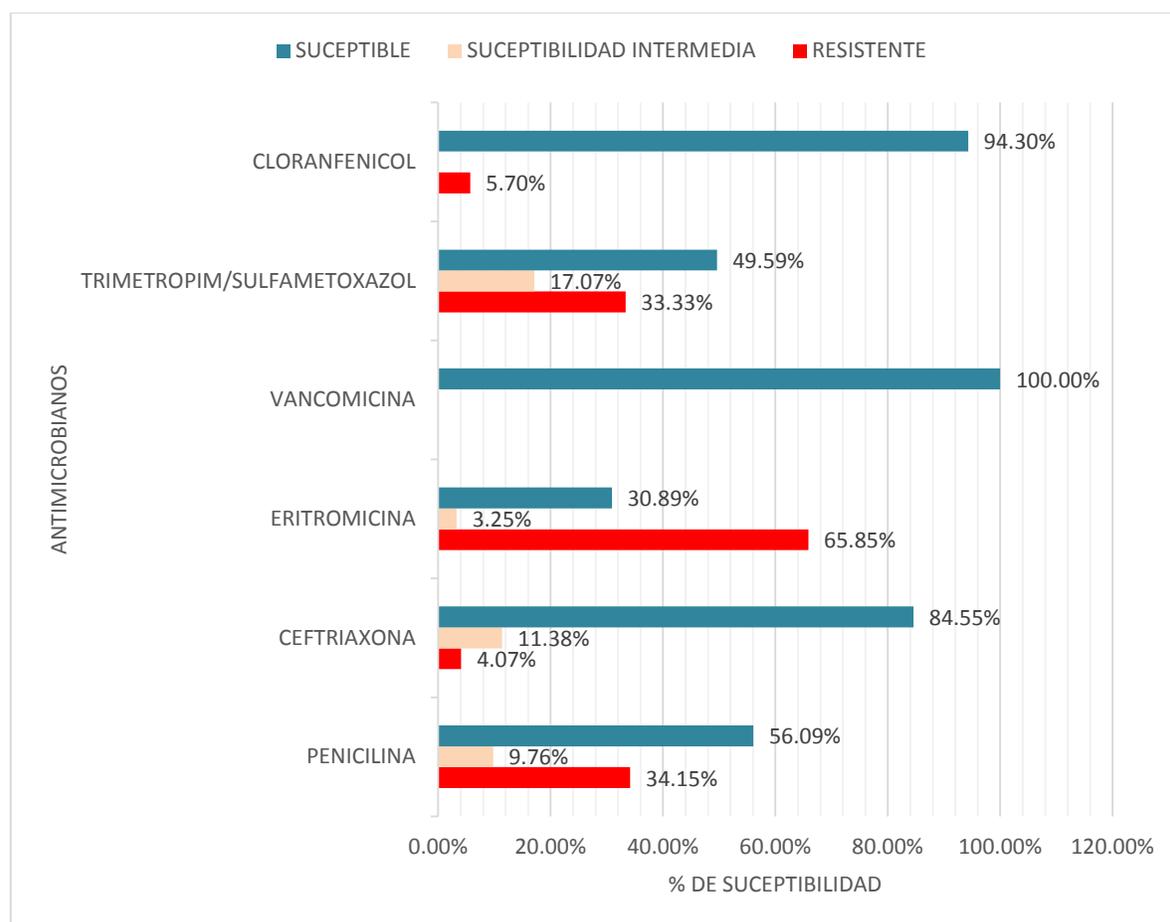
CVC7-T- Candidato vacunal cubano; VCN10v y VCN13v- Vacunas conjugadas 10 y 13 valente.  
 Total ENI - se incluyen el total de los aislados recuperados de Enfermedad Neumocócica Invasiva.  
 ≤ 5 años - se incluyen solo los aislados recuperados de ENI en ese grupo de edad.

**Figura 4.1. Cobertura teórica de serotipos estimada para las vacunas neumocócica conjugadas 10 y 13 valente y para el candidato vacunal cubano a partir de la caracterización en serotipos de aislados invasivos, Cuba, 2015.**

Considerando solo los aislados recuperados como responsables de infecciones en niños ≤ 5 años (68 aislados; parte derecha de la Figura 4.1) también fueron semejantes las coberturas serotípicas para la VCN10v y el CVC7-T (54,41 y 52,94%, respectivamente); y nuevamente para el VCN13v se obtuvo la mayor cobertura (92,64%).

### 4.1.3 Susceptibilidad antimicrobiana de los aislados invasivos de *S. pneumoniae*.

En la Figura 4.2 se muestran los resultados generales del estudio para la determinación de la susceptibilidad de los aislados de *S. pneumoniae* frente a las drogas antimicrobianas recomendadas para el tratamiento de la ENI. Los resultados estuvieron disponibles para 123 aislados porque para ocho fue imposible el estudio de la susceptibilidad como consecuencia de la pérdida de la viabilidad durante la conservación.



**Figura 4.2. Susceptibilidad a antimicrobianos de aislados invasivos de *S. pneumoniae*, determinada por el método de la concentración mínima inhibitoria, Cuba, 2015 (n=123).**

El 34,15% de los aislados resultaron resistentes a penicilina y el 9,76% mostró susceptibilidad intermedia. En cambio, el 84,55% de los aislados resultó sensible a la ceftriaxona. Para la eritromicina y el trimetoprim/sulfametoxazol se obtuvieron altos

valores de resistencia (65,85 y 33,33%, respectivamente) además de que para algunos aislados se demostró susceptibilidad intermedia (3,25 y 17,07%, respectivamente). Llama la atención el predominio (74,07%) de aislados resistentes a eritromicina con  $CMI \geq 16 \mu\text{g/mL}$ .

Para la vancomicina el 100% de los aislados se reveló sensible. El 82,1% de ellos resultaron inhibidos por CMI de la droga entre 0,06 - 0,5  $\mu\text{g/mL}$  y el por ciento restante mostró  $CMI = 1 \mu\text{g/mL}$ .

Solo el 5,7% de los aislados resultó resistente al cloranfenicol (cinco con  $CMI = 8 \mu\text{g/mL}$  y dos con  $CMI = 16 \mu\text{g/mL}$ ). Para el 54,47% se obtuvieron CMI entre 0,5 y 2  $\mu\text{g/mL}$  y para el 30% valores de CMI de 4  $\mu\text{g/mL}$ .

Considerando el comportamiento frente a todas las drogas estudiadas solamente 12 aislados se clasificaron como MDR (9.76%): ocho de ellos mostraron resistencia a penicilina, trimetoprim/sulfametoxazol y eritromicina y los otros cuatro fueron además resistentes a ceftriaxona.

En la Figura 4.3 se compara la resistencia a penicilina y ceftriaxona diferenciando en meníngeos y extra meníngeos a los aislados estudiados en el período. Como se observa, 38 de los 42 demostrados resistentes a penicilina se corresponden con aislados meníngeos (90,47%). Para estos, los valores de CMI oscilaron entre 0,125 y 8  $\mu\text{g/mL}$  (Tabla 4.5); aunque solo un aislado mostró CMI de 8  $\mu\text{g/mL}$  y la gran mayoría resultaron inhibidos por bajas concentraciones de penicilina (entre 0,5  $\mu\text{g/mL}$  y 0,125  $\mu\text{g/mL}$ ). En cambio, solo cuatro aislados procedían de enfermedad extra meníngea y para todos se demostró una CMI de 8  $\mu\text{g/mL}$ . Así mismo, entre los aislados resistentes a ceftriaxona predominaron los meníngeos (cuatro con CMI de 2  $\mu\text{g/mL}$ ) y solo uno extra meníngeo, con CMI de 4  $\mu\text{g/mL}$ .

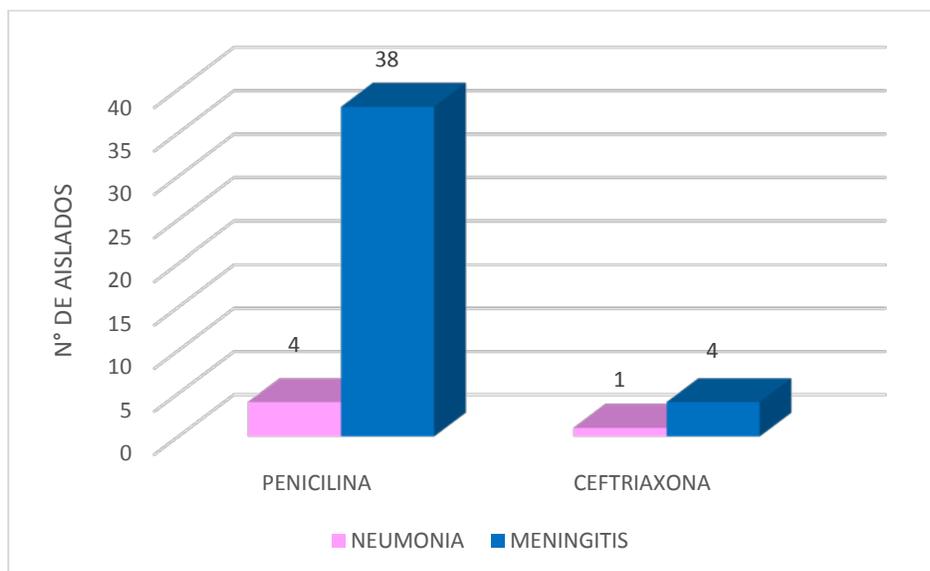


Figura 4.3 Comparación de la resistencia a penicilina y ceftriaxona para aislados meníngeos y extra meníngeos de *S. pneumoniae*, Cuba, 2015.

Tabla 4.5 Valores de CMI para penicilina y ceftriaxona de los aislados meníngeos y extra meníngeos de *S. pneumoniae*. Cuba, 2015.

Total de aislados resistentes	Número de aislados en cada una de las diferentes CMI (µg/mL) ensayadas						
	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
<b>Penicilina</b>	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
Meníngeo (n=38)	1	5	5	5	10	8	4
No meníngeo (n=4)	4	-	-	-	-	-	-
<b>Ceftriaxona</b>							
Meníngeo (n=4)	-	-	4	-	-	-	-
No meníngeo (n=1)	-	1	-	-	-	-	-

Entre los aislados MDR predominaron los recuperados de meningitis (10 de meningitis con CMI entre 1 y 8  $\mu\text{g/mL}$ . Los otros dos se obtuvieron de neumonías con derrame pleural (CMI= 8  $\mu\text{g/mL}$ ).

En la Tabla 4.6 se desglosan los datos del estudio de la susceptibilidad para los serotipos vacunales y no vacunales demostrados entre los aislados invasivos.

**Tabla 4.6 Frecuencia de aislados invasivos resistentes a antimicrobianos entre los serotipo de *S. pneumoniae* vacunales y no vacunales, Cuba 2015.**

Serotipos	Penicilina		Ceftriaxona		Eritromicina		TMT/SMX		Cloranfenicol	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Vacunales (n=116)										
3 (n=9)	1	11,1	0	0	2	22,2	0	0	0	0
4 (n=1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6A (n=10)	2	20	1	10	10	100	2	20	1	0
6B (n=7)	1	14,2	0	0	6	85,7	1	14,2	0	0
7F (n=2)	1	50	0	0	2	100	0	0	1	50
9V (n=2)	1	50	0	0	0	0	1	50	0	0
14 (n=28)	9	32,1	1	3,5	13	46,4	5	17,8	3	10,7
18C (n=2)	1	50	0	0	0	0	1	50	0	0
19A (n=27)	12	44,4	3	11,1	24	88,8	21	77,7	1	3,7
19F (n=14)	7	50	0	0	8	57,1	5	35,7	1	7,1
23F (n=14)	6	42,8	0	0	10	71,4	3	21,4	0	0
No vacunales (n=10)										
6C (n=3)	0	0	0	0	2	66,6	0	0	0	0
10A (n=1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15C (n=1)	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0
18A (n=3)	0	0	0	0	1	33,3	0	0	0	0
23B (n=2)	0	0	0	0	1	50	1	50	0	0
Sin serotipar (n=5)	0	0	0	0	1	20	0	0	0	0

Entre los 10 aislados para los cuales se demostraron serotipos no vacunales solo uno (serotipo 15C) se reveló resistente a penicilina y dos aislados 6C, uno 18A y otro 23B fueron resistentes a eritromicina, este último fue además resistente al trimetoprim/sulfametoxazol. Entre el total de aislados de serotipos vacunales (116 aislados) se demostró un número mayor de resistentes a penicilina en los serotipos 19A (10,34%) , 14 (7,76%) y 23F (5,17%). Doce de los 27 serotipos 19A resultaron resistentes a penicilina, seis de los 14 aislados 23F y nueve de los 28 aislados serotipo 14. La resistencia a eritromicina se manifestó para todos los serotipos vacunales excepto el 4, 9V y 18C e involucró a un número mayor de aislados que los demostrados resistentes a penicilina. Los únicos siete resistentes al cloranfenicol pertenecieron a los serotipos 6A, 7F, 14, 19A y 19F.

En este punto se impone retomar el resultado anteriormente enunciado acerca de la MDR puesta de manifiesto para 12 aislados. Nueve de estos pertenecieron al serotipo 19A y los otros tres fueron serotipo 6A, 19F y 23F. Tres de los cuatro aislados para los cuales se demostró además resistencia a ceftriaxona pertenecieron al serotipo 19A y el otro fue serotipo 6A.

### **4.2 Estudio de aislados nasofaríngeos de *S. pneumoniae***

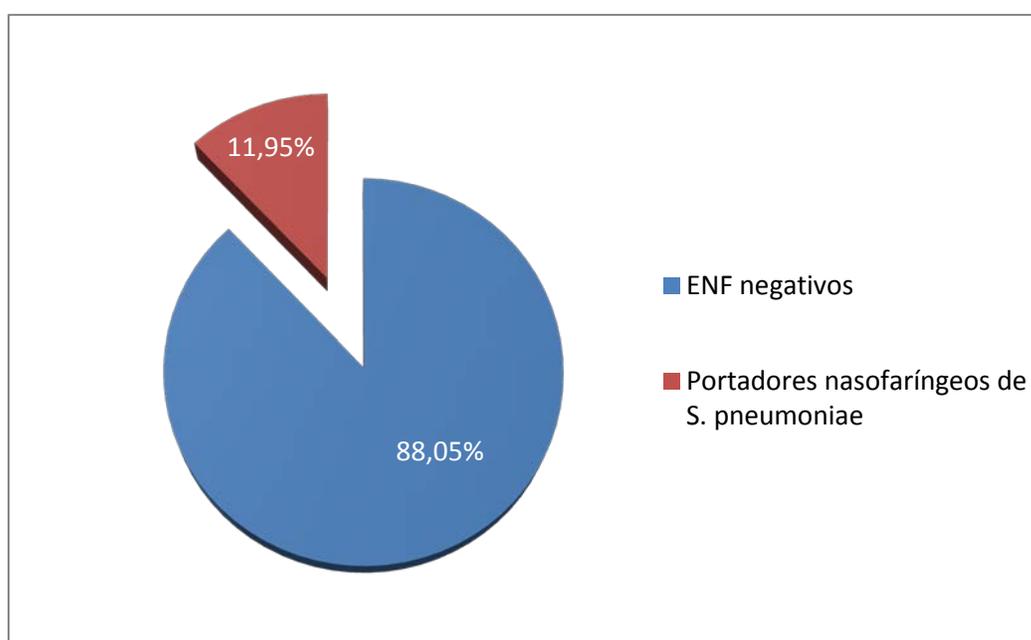
Para la determinación del estado de portador para neumococo se recibieron (entre enero y diciembre de 2015) 436 muestras de ENF en el LNRN-IPK, procedentes de niños  $\leq 5$  años y con diagnóstico de IRAG. En la Tabla 4.7 se muestra la procedencia de estos atendiendo a la provincia donde se encuentran ubicados los hospitales centinelas en los fueron colectados.

En 52 de los 436 ENF estudiados (11,95%) se obtuvieron cultivos positivos para *S. pneumoniae* y en correspondencia se informaron igual número de niños como portadores nasofaríngeos de la bacteria (Figura 4.4).

**Tabla 4.7 Procedencia por provincia/hospital centinela de los exudados nasofaríngeos recibidos para el estudio del estado de portador para *S. pneumoniae* en el LNRN-IPK, Cuba 2015.**

Provincia	Cienfuegos	Habana	Santiago de Cuba
Cantidad de ENF	77	29	330
<b>Total</b>	436		

Cienfuegos - Hospital Paquito González; Habana - Hospitales William Soler, Juan Manuel Márquez y Pediátrico de Centro Habana; Santiago de Cuba - Infantil Norte e Infantil Sur



**Figura 4.4 Portación nasofaríngea de *S. pneumoniae* entre niños  $\leq 5$  años de edad y con diagnóstico de IRAG, atendidos en los hospitales centinelas para la vigilancia de la enfermedad neumocócica invasiva, LNRN-IPK, Cuba 2015.**

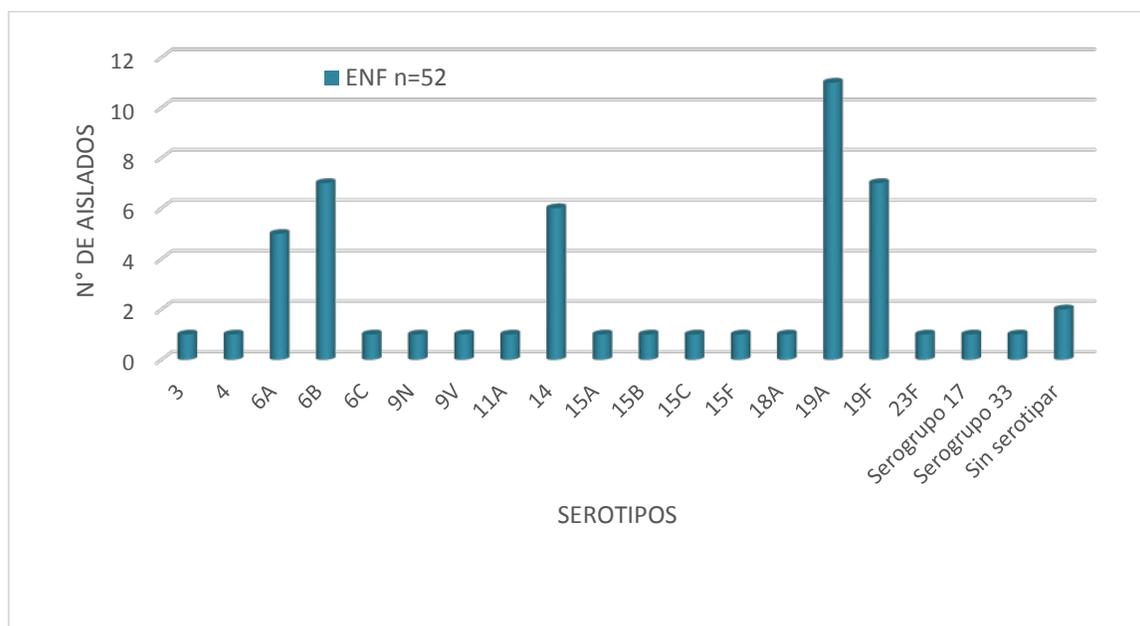
Entre los 52 portadores nasofaríngeos de *S. pneumoniae* predominaron los menores de 12 meses y los niños entre 12 y 24 meses de edad (25 y 21 niños, respectivamente); solo cinco se ubicaron en el grupo de los 3 años de edad y para uno no se dispuso del dato.

Para 30 de los portadores nasofaríngeos el diagnóstico clínico que motivó el ingreso fue la neumonía, en otros 10 casos fue la bronquiolitis y para el resto (12 casos) las causas fueron:

síndrome coqueluchoide, rinitis y OMA. Llama la atención que para ninguno de los portadores nasofaríngeos se registró coincidencia en el LNRN-IPK con un caso de neumonía u OMA para el cual se obtuviera en el hospital centinela un cultivo positivo para *S. pneumoniae* a través del estudio de una muestra de sangre, líquido pleural o exudado de oído medio.

#### 4.2.1 Serotipos capsulares de *S. pneumoniae* entre portadores nasofaríngeos ≤ 5 años de edad con diagnóstico de IRAG.

En la Figura 4.5 se muestran los serotipos encontrados entre los portadores nasofaríngeos ≤ 5 años de edad con diagnóstico de IRAG. En la Tabla 4.8 se confronta este resultado con el de los serotipos demostrados entre los aislados responsables de enfermedad en niños ≤ 5 años, informados durante el Estudio 1 (68 aislados).



**Figura 4.5. Serotipos de *S. pneumoniae* en portadores nasofaríngeos ≤ 5 años de edad y con diagnóstico de IRAG, atendidos en los hospitales centinelas para la vigilancia de la enfermedad neumocócica invasiva, LNRN-IPK, Cuba 2015.**

**Tabla 4.8. Confrontación de los serotipos de *S. pneumoniae* de aislados nasofaríngeos y los responsables de enfermedad en niños  $\leq 5$  años, LNRN-IPK, Cuba 2015.**

Aislados nasofaríngeos		Aislados de enfermedad invasiva	
Serotipos	N°	Serotipos	N°
3	1	3	3
4	1	4	1
<b>6A</b>	<b>5</b>	<b>6A</b>	<b>7</b>
<b>6B</b>	<b>7</b>	<b>6B</b>	<b>6</b>
6C	1	6C	3
9N	1	-	-
9V	1	-	-
11A	1	-	-
<b>14</b>	<b>6</b>	<b>14</b>	<b>23</b>
15A	1	-	-
15B	1	-	-
15C	1	15C	1
15F	1	-	-
18A	1	18A	1
<b>19A</b>	<b>11</b>	<b>19A</b>	<b>16</b>
<b>19F</b>	<b>7</b>	<b>19F</b>	<b>4</b>
23F	1	23F	3
Serogrupo 17	1	-	-
Serogrupo 33	1	-	-
Sin serotipar	2	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>52</b>	<b>TOTAL</b>	<b>68</b>

En 48 de los 52 aislados nasofaríngeos de *S. pneumoniae* se demostraron 17 serotipos diferentes (Figura 4.5), en ningún caso se demostró portación par más de un serotipo. Para dos la caracterización se logró solo hasta serogrupo (un serogrupo 17 y un serogrupo 33) y únicamente dos se informaron SS (3,85%). Cinco serotipos predominaron: 19A (11 aislados), 6B y 19F (siete cada uno), 14 (seis) y 6A (cinco). Para los 12 serotipos restantes se informó un solo aislado.

Entre los aislados nasofaríngeos se encontraron un mayor número de serotipos/serogrupos. Entre estos quedaron incluidos todos los serotipos hallados entre los aislados responsables de enfermedad neumocócica. En ambos grupos de aislados predominaron, en orden de frecuencia, los serotipos 14, 19A, 6A, 6B y 19F, todos contenidos en la VCN13v. Entre los aislados nasofaríngeos se detectaron más serotipos no vacunales pero la cantidad de estos en ambos grupos fue similar; excepto para el serotipo 6C, para el que se notificaron tres aislados entre los invasivos, para el resto siempre se trató de un aislado. Llama la atención entre los aislados nasofaríngeos el hallazgo de un serogrupo 17 y un serogrupo 33.

#### **4.2.2 Susceptibilidad antimicrobiana de los aislados nasofaríngeos de *S. pneumoniae*.**

Los resultados de este acápite se presentan para 48 de los 52 aislados nasofaríngeos de *S. pneumoniae* recuperados de niños  $\leq 5$  años con diagnóstico de IRAG pues para cuatro de ellos fue imposible el estudio de la susceptibilidad como consecuencia de la pérdida de la viabilidad durante la conservación.

En la Tabla 4.9 se muestra el número de aislados nasofaríngeos resistentes y susceptibles a penicilina y ceftriaxona. Para la penicilina se incluyen los dos criterios utilizados para la interpretación de la prueba de susceptibilidad (penicilina por vía intravenosa para aislados no meníngeos y penicilina vía oral). Utilizado el primero (penicilina por vía intravenosa) se informaron solo tres aislados resistentes a penicilina y seis con susceptibilidad intermedia; mientras que con el criterio de penicilina por vía oral el número de resistentes se incrementó a 14, con significación estadística (IC 95%;  $p=0.0075$ ). Esta comparación fue posible porque el número de aislados y en correspondencia el número de pruebas de susceptibilidad fue superior a 30 (CLSI, 2015). Para la ceftriaxona solo dos aislados

resultaron resistentes y tres con susceptibilidad intermedia, todos incluidos entre los resistentes a penicilina.

**Tabla 4.9. Susceptibilidad a penicilina y ceftriaxona de aislados nasofaríngeos de *S. pneumoniae* en niños ≤5 años con IRAG, LNRN-IPK, Cuba 2015 (n=48).**

Valores de corte MIC Penicilina (µg/mL)	No meníngeo, VI			Penicilina, VO		
	≤2 (S)	4 (SI)	≥8 (R)	≤0,06 (S)	0,12-1 (SI)	≥2 (R)
Número de aislados	39	6	3	8	26*	14

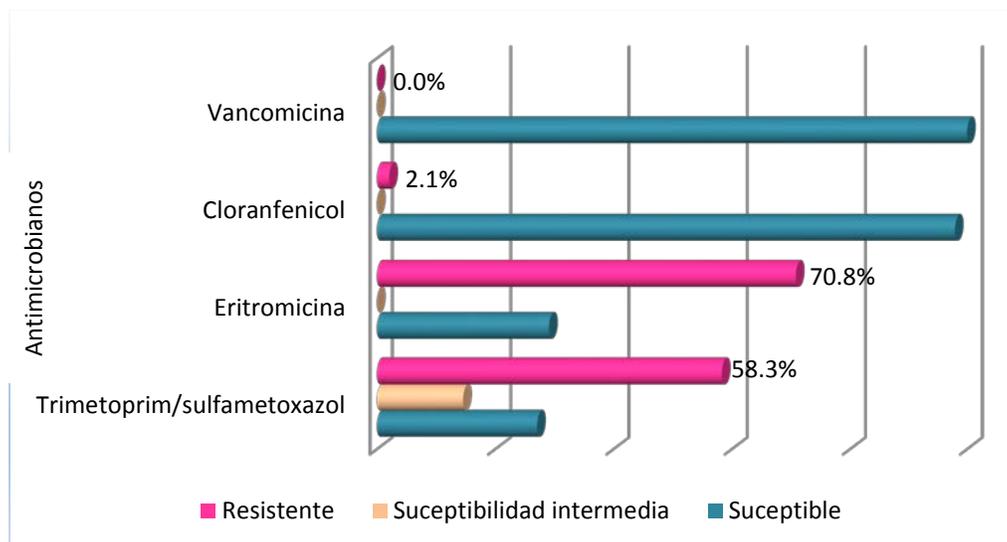
Valores de corte MIC Ceftriaxona (µg/mL)	No meníngeo I.V.		
	≤1 (S)	2 (SI)	≥4 (R)
Número de aislados	43	3	2

\* Cinco aislados con CMI= 1 µg/mL

MIC-Concentración mínima inhibitoria; VI- Vía intravenosa; VO- Vía oral

S-Sensible; SI-Sensibilidad intermedia; R-Resistente

En la Figura 4.6 se muestran los resultados del estudio de la susceptibilidad a los antimicrobianos no β-lactámicos.



**Figura 4.6. Susceptibilidad a antimicrobianos no β-lactámicos de aislados nasofaríngeos de *S. pneumoniae* en niños ≤5 años con IRAG, LNRN-IPK, Cuba 2015 (n=48).**

Para la eritromicina y el trimetoprim/sulfametoxazol se observaron cifras superiores de resistencia: 70,8% y 58,3%, respectivamente. Para el cloranfenicol solo un aislado se informó resistente (2,1%) y para la vancomicina la susceptibilidad fue absoluta.

De los 14 aislados resistentes a penicilina ( $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$ ), 11 lo fueron también a eritromicina y trimetoprim/sulfametoxazol por lo que se clasificaron como MDR (29,16%). En la Tabla 4.10, diez de ellos se corresponden con aislados serotipo 19A y 19F (siete y tres, respectivamente), tres con los serotipos 6B y 6C (dos y uno, respectivamente), y con un aislado serotipo 19F y otro serogrupo 33, demostrados además como resistentes a ceftriaxona.

La resistencia más común entre los aislados nasofaríngeos se presentó en la eritromicina y fundamentalmente en los serotipos 19A, (diez aislados), 19F (seis aislados), 6A, 6B y 14 (cuatro aislados en cada uno). En todos los casos los valores de CMI fueron  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$ . También para la resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol predominaron los aislados nasofaríngeos de los serotipos 19A (diez aislados) y 19F (cuatro aislados).

### **4.3 Comparación de los perfiles de susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislados nasofaríngeos de *S. pneumoniae* y de los responsables de enfermedad entre niños $\leq 5$ años.**

Para esta comparación se impone retomar que el número total de aislados notificados como responsables de enfermedad en niños al inicio de este capítulo (acápito 4.1.1) fue 71. La mayoría de ellos (68 aislados) fueron aislados de episodios de enfermedad neumocócica en niños  $\leq 5$  años de edad.

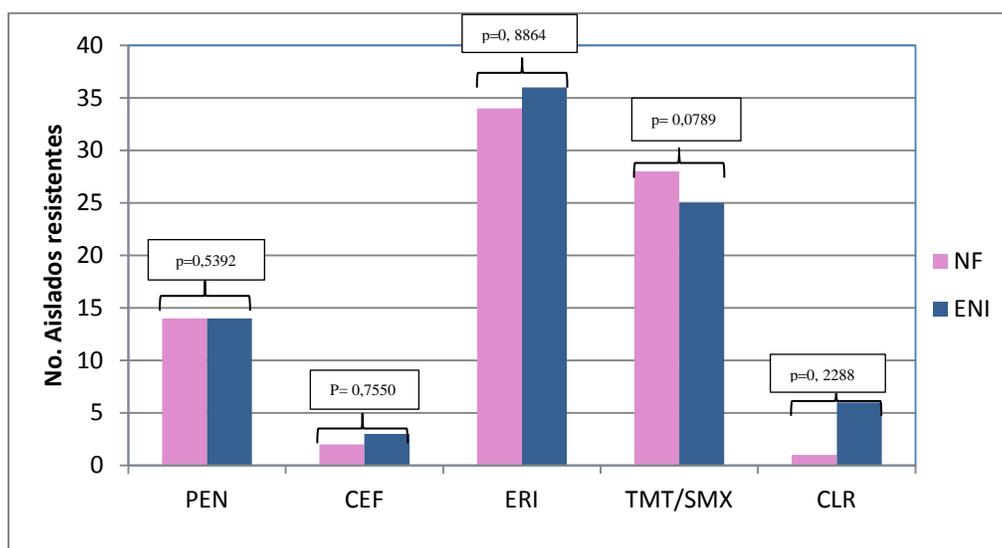
En la Figura 4.7 se confrontan los resultados de la susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislados de *S. pneumoniae* nasofaríngeos y de los responsables de enfermedad en niños  $\leq 5$  años, LNRN-IPK, Cuba 2015. Como en ambos grupos de aislados el número de pruebas de susceptibilidad fue superior a 30, fue posible la comparación estadística (CLSI, 2015). En la Figura 4.7 se muestra el resultado de dicho análisis.

**Tabla 4.10. Resistencia a antimicrobianos de los serotipos demostrados entre los aislados nasofaríngeos de *S. pneumoniae*, recuperados de niños  $\leq 5$  años con IRAG, LNRN-IPK, Cuba 2015 (n=48).**

Serotipos	Penicilina		Ceftriaxona		Eritromicina		TMT/SMX		Cloranfenicol	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
3 (n=1)							1	100		
4 (n=1)							1	100		
6A (n=5)					4	80	1	20		
6B (n=4)	2	50			4	57	2	28	1	14
6C (n=1)	1	100			1	100				
9N (n=1)							1	100		
9V (n=1)					1	100	1	100		
11A (n=1)							1	100		
14 (n=5)					4	67	1	17		
15A (n=1)					1	100				
15B (n=1)							1	100		
15C (n=1)										
15F (n=1)										
18A (n=1)										
19A (n=11)	7	63			10	90	10	90		
19F (n=7)	3	43	1	14	6	85	4	57		
23F (n=1)					1	100	1	100		
Serogrupo 17 (n=1)					1	100	1	100		
Serogrupo 33 (n=1)	1	100	1	100	1	100	1	100		
Sin serotipar (n=2)							1	100		

Para la penicilina, ceftriaxona, eritromicina y trimetoprim/sulfametoxazol se observó una frecuencia similar de resistencia entre ambos grupos. Sin embargo, para el cloranfenicol la resistencia fue ligeramente superior entre los aislados invasivos (6 frente a un aislado nasofaríngeo).

**Figura 4.7 Comparación de la resistencia a los antimicrobianos de aislados de *S. pneumoniae* nasofaríngeo y responsable de enfermedad en niños  $\leq 5$  años, LNRN-IPK, Cuba 2015.**



PEN- Penicilina, CEF-Ceftriaxona, ERI-Eritromicina, TMT/SMX-Trimetoprim/sulfametoxazol, CLR-Cloranfenicol, NF-Nasofaríngeos, ENI-Enfermedad neumocócica invasiva.

La comparación de los resultados de la resistencia demostrada para todas las drogas en ambos grupos de aislados no puso en evidencia diferencias estadísticamente significativas (penicilina,  $p=0,5392$ ; ceftriaxona,  $p= 0,7550$ ; eritromicina,  $p= 0,8864$ ; trimetoprim-sulfametoxazol,  $p= 0,0789$  y cloranfenicol,  $p= 0,2288$ , con un IC 95%).

*V. Discusión*

## V. DISCUSIÓN

### 5.1 Estudio de aislados de *S. pneumoniae* responsables de enfermedad

En relación al número de aislados que constituyeron el universo del Estudio 1 (131 aislados invasivos de *S. pneumoniae*) se impone comentar la posibilidad que se dio durante la investigación de caracterizar una cantidad ligeramente superior de los responsables de enfermedad en niños (71 vs 49 aislados de adultos). Esto puede asumirse como una consecuencia directa de la implementación del protocolo de vigilancia centinela de la ENI en niños  $\leq 5$  años, pues la gran mayoría de estos fueron colectados fundamentalmente en los hospitales integrados a dicha vigilancia (datos no mostrados).

Así mismo, el predominio de aislados comprometidos con casos de neumonías en niños  $\leq 5$  años (41 de 48 estudiados) puede atribuirse a la ejecución de dicho protocolo, en el marco del cual se trabaja por la indicación sistemática de los hemocultivos (Linares-Pérez N. Model for clinical research and impact evaluation of the Cuban pneumococcal vaccine [Oral Presentation]. Vacci Pharma International Conference. Varadero, Cuba; 2015). Esto resulta de vital importancia pues aunque las neumonías por neumococo pueden cursar con o sin bacteriemia, se estiman tres infecciones no bacteriémicas por cada caso con bacteriemia; de modo que la mayor carga por concepto de enfermedad neumocócica corresponde a la enfermedad no invasiva (Said *et al.*, 2013). Entonces, en la misma medida en que se estudien un mayor número de casos de ENI será más relevante la información clínica y epidemiológica que se recaude para hacer inferencias útiles al comportamiento de las formas no invasivas.

Este constituye un objetivo común al que aspiran los sistemas de vigilancia de diferentes países. Por ejemplo, en Argentina, en dos estudios distintos entre el 2013 y 2014, uno en adultos y otro en niños, predominan los aislados de neumonía: 72% y 60,8%, respectivamente (Pérez *et al.*, 2013; Fossati *et al.*, 2015). Al respecto es perentorio señalar la necesidad de incrementar también el número de aislados de *S. pneumoniae* responsables de enfermedad de adultos en Cuba, de los cuales que en el presente estudio solo quedaron incluidos tres casos.

Hasta la fecha se han identificado 97 serotipos en *S. pneumoniae*, pero antes del empleo extendido de las VCN el 70% de los casos de ENI eran producidos fundamentalmente por los serotipos: 14, 6B, 1, 23F, 5 y 19F (Geno *et al.*, 2015). Los encontrados en este estudio se corresponden en su mayoría con los mencionados anteriormente aunque no se demostraron en el estudio los serotipos 1 y 5. El informe de cinco aislados SS deberá corroborarse en un laboratorio regional de referencia o a través de la metodología de PCR para la detección de serotipos directamente a partir de muestras de ENF, cuando esta se implemente en el LNRN-IPK.

El serotipo 5 se describe como muy invasivo entre niños de países del continente africano, pero al mismo tiempo, junto al serotipo 1 se notifica en > 5 años en España, Bélgica, Alemania y Suiza (van Effelterre *et al.*, 2010; Isaacman *et al.*, 2010). Llama además la atención en este estudio el hallazgo de un número importante de aislados serotipo 19A y 6A, fundamentalmente entre niños  $\leq 5$  años, pues ambos se reconocen como serotipos emergentes tras el uso de la VCN7v (Darenberg y Henriques-Normark., 2009).

El estudio de la distribución de serotipos ha sido siempre extremadamente complejo pues aunque se ha comprobado que suelen ser los mismos los que con mayor frecuencia causan enfermedad, su distribución es desigual en diferentes países, tipo de enfermedad y edad. Así, por ejemplo, el serotipo 14 que se reconoce como asociado a bacteriemia y meningitis en niños pequeños se demostró en este estudio también como el más frecuente en meningitis y como el responsable de dos de los tres casos de bacteriemia notificados en niños < 5 años de edad. De la misma forma, en correspondencia con los reportes a nivel mundial de que el serotipo 19A es causa de OMA y empiema, en el presente estudio este fue informado en dos de los seis únicos aislados recuperados de OMA y fue responsable de 14 neumonía severas, en ocho de las cuales se recuperó precisamente a partir de muestras de líquido pleural. Por otra parte, el 23F que se reconoce como responsable de meningitis tanto entre niños como adultos, también prevaleció en esta investigación entre los aislados meníngeos (van Effelterre *et al.*, 2010; Isaacman *et al.*, 2010).

En Cuba, la insuficiencia de datos al respecto de la carga de la ENI podría hacer suponer erróneamente que su incidencia es baja. Por ejemplo, en el año 2000 se registra un alta

incidencia de meningitis por neumococo en lactantes ( $23.8 \times 10^5$  habitantes) que en el 2012 decrece a  $3.1 \times 10^5$  habitantes, sin que esto obedezca a una intervención de prevención y control concreta, como la vacunación (Toraño *et al.* 2010). En este sentido, los datos que se muestran en la Tabla 4.1 aportan evidencias de la ENI como problema de salud para la población cubana entre 0-18 años de edad.

La demostración de los serotipos 14, 19A y 6A entre los más frecuentes en la ENI en niños coincide con lo informado por un estudio en Paraguay en el 2009 (Chamorro *et al.*, 2011). Así mismo, con los resultados de una investigación en Tailandia, en la que como en esta, se alerta sobre un incremento de aislados serotipo 19A en ENI entre niños  $\leq 5$  años en relación con etapas previas de la vigilancia (Phongsamart *et al.*, 2014; Toraño *et al.* 2010 y 2014).

Por otra parte, el grupo de serotipos demostradas como los más frecuentes entre los aislados invasivos recuperados de enfermedad en adultos en Cuba durante el 2015 (23F, 19A, 19F y 3) concuerda parcialmente con lo comunicado por un estudio realizado en Japón entre el 2010-2013. En dicho estudio se indican cambios en la circulación de serotipos responsables de enfermedad en adultos luego de la introducción de la VCN7v, pues junto a los serotipos 3 y 14 se notifica un predominio del 19A en los aislados responsables de neumonía y se informa una frecuencia mayor del 23F entre los aislados meníngeos, pero junto a los serotipos 10A, 15A, 23A (Ubukata *et al.*, 2015). Para estos últimos los resultados de la presente investigación no se ajustan a los de estudio en Japón.

En otro estudio, desarrollado en Galicia durante el 2011 y 2012 para conocer la epidemiología de la infección neumocócica tras la incorporación de la vacunación, y en el que se incluyeron un número mayor de neumococos (555 aislados invasivos), se anuncian también los serotipo 3 y 19A como los más frecuentes pero junto al 7F. En la presente investigación los únicos dos aislados serotipo 7F se encontraron en neumococos responsables de meningitis justamente en adultos (Méndez-Lage *et al.*, 2015)

En resumen, los serotipos más frecuentes (14, 19A, 19F, 23F, 6A, 3 y 6B) constituyeron el 83,11% de los aislados cubanos invasivos de *S. pneumoniae* en Cuba durante el 2015 y la estimación de la cobertura de serotipos para las diferentes vacunas conjugadas multivalentes con posibilidades de ser empleadas en Cuba puso de manifiesto que el mayor

beneficio potencial se lograría con la administración de la VCN13v. El incremento del valor de la cobertura para la VCN13v respecto las otras vacunas conjugadas, tanto para la población en general como para los  $\leq 5$  años de edad (Figura 4.1), es atribuible fundamentalmente al aumento del número de aislados serotipo 19A, el que no está contenido en la VCN10v ni en el CVC7-T.

Entre el 2000-2005 en Cuba, en el grupo de los menores de 2 años de edad, también para la VCN13v se demuestra una cobertura mayor (96,3%) (Castañeda *et al.*, 2009). Entre el 2007-2012 se estima en un valor inferior 70,4% pero considerando solo los aislados meníngeos y sin diferenciar grupos de edad (Toraño *et al.*, 2014).

Este es un resultado que se repite para múltiples estudios desarrollados en diferentes regiones del planeta tras el empleo de la VCN7v con la que se logra una disminución importante de la ENI pero que se acompaña de una notificación de casos debidos a serotipos considerados de reemplazo, como el 19A y el 6A (Pilishvili *et al.*, 2010 ; Fossati *et al.*, 2015; Méndez-Lage *et al.*, 2015). Esto fue lo que justamente impulsó el desarrollo de la VCN10v y de la VCN13v. Tras la introducción de esta última en Estados Unidos se observa una reducción de la incidencia total de la ENI, entre la población de adultos no vacunados (Moore *et al.*, 2015). De igual forma, un estudio en el Reino Unido aporta fuertes evidencias acerca del beneficio que se logra en la comunidad con la administración de la VCN13v; pero al mismo tiempo, del incremento de ENI en niños y adultos, debida a serotipos no contenidos en la VCN13v (Andrews *et al.*, 2014; Waight *et al.*, 2015).

La cobertura serotípica referida al CVC7-T estimada en el presente estudio fue baja (varió entre 49,62 y 54,41% considerando la población en general y solo los  $\leq 5$  años, respectivamente) pero podría ascender a 77,86% si se considerará a los serotipos 6A y 19A en la comparación del grado de concordancia entre los contenidos en este y el de aislados circulantes en el período de estudio. Esta estimación se fundamenta en el supuesto de que se obtiene un cierto grado de protección para los serotipos relacionados antigénicamente, como es al caso del 6A y 6B (Vakevainen *et al.*, 2001). Así mismo, para los serotipos 19A y 19F, aunque para estos los resultados de estudios publicados son divergentes y algunos describen escasa o ninguna protección cruzada (Kuttel *et al.*, 2015; Hausdorff *et al.*, 2010).

Sin embargo, tal hipótesis deberá ser confirmada en el marco de la evaluación clínica del CVC7-T que se ejecuta en el país.

A partir de las coberturas de serotipos estimadas para las diferentes vacunas neumocócicas multivalentes con posibilidades de ser empleadas en Cuba se puede predecir entonces que la introducción de la vacunación incidirá en la reducción de la ENI debida a los serotipos contenidos en ellas. Sin embargo, es inquietante que alrededor de un 50% de los serotipos que circulan en el país no sean cubiertos por el CVC7-T, y que incluso los no contenidos en la VCN13v potencialmente podrían, a mediano o largo plazo, remplazar a los serotipos vacunales, con selección incluso de aquellos con mayor resistencia. Por esto es necesario sostener un sistema de vigilancia nacional que permita detectar oportunamente los cambios en los serotipos que circulan y los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos de elección para el tratamiento, con el fin de evaluar su beneficio y decidir la inclusión de otros en futuras formulaciones vacunales.

En este sentido, con relación a la susceptibilidad a antimicrobianos entre aislados invasivos de *S. pneumoniae*, de manera general en el presente estudio se ratifican las observaciones de la etapa previa de la vigilancia en Cuba (Tamargo *et al.*, 2008; Pías, 2012; Toraño *et al.*, 2014). Los valores más altos de resistencia en el presente estudio, además de para la penicilina, se obtuvieron para la eritromicina (65,85%) y el trimetoprim/sulfametoxazol (33,33%), que constituyen dos de los agentes antimicrobianos más comúnmente prescritos para el tratamiento de infecciones bacterianas en la práctica clínica.

La resistencia a macrólidos en *S. pneumoniae* varía para las diferentes áreas geográficas. En la comunidad de Valencia, España, entre el 2009-2010 se notifica un 25% de aislados invasivos resistentes a eritromicina, resultado que se repite en Galicia (24,7%) entre el 2011-2012 (Gant *et al.*, 2012; Méndez-Lage, *et al.*, 2015). Así mismo, en Arabia Saudita y Australia las cifras oscilan entre 25 y 62%, respectivamente (Shibl *et al.*, 2012; Weinberger *et al.*, 2011). Por otra parte, en Latinoamérica la resistencia a eritromicina se estima alrededor del 25%, aunque con diferencias entre los países de la región. Por ejemplo, se informa un 28,3% en Argentina mientras que en México es mayor (40%) (Tamargo *et al.*, 2008; Gabastou *et al.*, 2008; Fossati *et al.*, 2015).

El valor demostrado para Cuba en el 2015 (65,85%) es muy superior al que se informa entre 2007-2011; 19,4% (Pías, 2012) y es preocupante que la gran mayoría de los aislados solo resulten inhibido por CMI superiores a 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Este incremento pudiera ser una consecuencia de la prescripción indiscriminada de los macrólidos para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio superior y es más frecuente entre los aislados resistentes a penicilina (Gay *et al.*, 2000; Cohen, 2009). Se impone entonces el estudio de la susceptibilidad a eritromicina utilizando concentraciones mayores de la droga con el propósito de poder demostrar entre estos aislados el fenotipo MLSB, para los que se expresan los niveles más altos de resistencia (CMI  $\geq 128 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) debido a mutaciones en el gen *erm(B)*, que confieren resistencia a macrólidos/azálidos, lincosaminas y estreptograminas. En estos casos la respuesta en el paciente no se modifica con el aumento de la dosis del antibiótico durante el tratamiento (Ronald *et al.*, 2010). De esto puede inferirse que el tratamiento empírico inicial de una neumonía por *S. pneumoniae* con macrólidos es solo aconsejable en los casos en que se conoce la susceptibilidad específica del aislado, si es probable la coinfección con otras bacterias o ante un caso de alergia severa a  $\beta$ -lactámicos (Cardozo *et al.*, 2008).

La resistencia al trimetoprim/sulfametoxazol es también común y diversa para los aislados de *S. pneumoniae* de diferentes áreas geográficas. Las cifras de resistencia oscilan a nivel mundial entre un 20 y 70%, el fenómeno se presenta tanto entre aislados resistentes como sensibles a penicilina y se asocia al alto consumo que de esta droga se hace para el tratamiento y profilaxis de múltiples infecciones bacterianas; de ahí que muchos de los reportes al respecto procedan de países donde ha sido utilizado en la profilaxis de infecciones por agentes oportunistas en pacientes de VIH/Sida. Por ejemplo, en Malawi, entre el 2000-2009 se incrementa por este concepto de un 73.8% a un 92.6% y en Sudáfrica se anuncia en el 2008 una resistencia del 55% (Crowther-Gibson *et al.*, 2012; Hoffmann *et al.*, 2014).

La resistencia demostrada para el trimetoprim/sulfametoxazol para aislados invasivos de *S. pneumoniae* durante el 2015 en Cuba (33,33%) se mantiene similar a la informada en estudios precedentes en el país (22-37%) y es semejante a la advertida por algunos países de Latinoamérica, donde incluso se hallan valores más altos: Colombia (33,9%), Argentina

(61,9%) y Uruguay (53,2%) (Tamargo *et al.* 2008). En países de regiones más distantes, como por ejemplo la India, es la droga para la cual se observa más comúnmente la resistencia en neumococo, con cifras de hasta 77,5% (Kumar *et al.*, 2013). Este resultado ratifica que, como los macrólidos, el trimetoprim/sulfametoxazol tampoco debe ser recomendado como droga de primera línea en el tratamiento de infecciones neumocócicas a menos que se conozca la susceptibilidad específica del aislado en cuestión.

En relación con el cloranfenicol la baja resistencia revelada para el 2015 en Cuba (5,7%) está en total correspondencia con los reportes de estudios similares a nivel internacional. La pérdida de susceptibilidad a esta droga es un fenómeno infrecuente que se debe a la producción de la enzima acetiltransferasa, responsable de su inactivación (Dang-Van *et al.*, 1978). El cloranfenicol fue muy utilizado para el tratamiento de las meningitis, pues además de constituir un agente bacteriostático para la mayoría de los gérmenes sensibles, es bactericida para *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *N. meningitidis*. Ante la disponibilidad de drogas menos tóxicas ha quedado en desuso pero se le considera aun un antibiótico alternativo en caso de alergia a los  $\beta$ -lactámicos. Por eso, y no obstante a lo inusual de la resistencia, se recomienda incluirlo como antibiótico centinela en la vigilancia de la susceptibilidad de aislados de *S. pneumoniae*. Esto ha permitido que recientemente se registren esporádicos informes de una tendencia al incremento de los valores de CMI, como es el caso por ejemplo, de un estudio en Nueva Guinea, en el que la media de CMI para el cloranfenicol de aislados pediátricos de neumococos meníngeos es de 3  $\mu\text{g/mL}$ , y para el 42% de ellos se demuestra una CMI  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$  (Manning *et al.*, 2011). Aunque entre los aislados cubanos se demostraron cinco resistentes al cloranfenicol predominaron en cambio los aislados con valores de CMI en la zona de franca susceptibilidad (54,47% con CMI entre 0,5 y 2  $\mu\text{g/mL}$ ).

La total susceptibilidad a vancomicina en el presente estudio y los valores de CMI demostrados para esta droga están entre 0,06 - 0,5  $\mu\text{g/mL}$  que concuerdan con lo reportado en las etapas anteriores de la vigilancia en Cuba (Toraño *et al.*, 2010, 2012 y 2014) y con investigaciones foráneas en las que no se informa resistencia (Gosbell y Neville 2000; Cardoso y Velázquez, 2007; Bagga y Shenep 2010; Fossati *et al.*, 2015). En cambio, se conoce de la ocurrencia del fenómeno de tolerancia a la vancomicina (supervivencia de la

bacteria en presencia de la droga pero sin multiplicación celular) del que en Cuba no existen antecedentes. No obstante a que este no constituye un problema, todo aislado con una CMI para vancomicina  $>1 \mu\text{g/mL}$  debe ser inmediatamente notificado al sistema de salud nacional y enviado a un laboratorio de referencia para su confirmación (CLSI, 2015).

En relación con la penicilina, hasta el año 2007, Cuba se sitúa entre los países de Latinoamérica con más baja resistencia y susceptibilidad disminuida a esta droga. Hasta esa misma fecha, el 4,1% de los aislados de la región muestran susceptibilidad intermedia a la penicilina (rango: 0,6% en Argentina a 16,8% en México) y el 0,8% se clasifican como resistentes (rango: 1,9% en Cuba a 8,4% en México) (Castañeda *et al.*, 2009). Sin embargo, entre el 2007-2011 el 36,4% de los aislados estudiados en Cuba (Universo - 236 aislados) se notifican como resistentes (Pías, 2012).

Este resultado se repite en la actual investigación (34,15% de resistencia a penicilina) y concuerda con las evidencias presentadas por Argentina en el 2015 en relación al incremento, hasta un 20,1%, de la resistencia a penicilina entre aislados meníngeos (Fossati *et al.*, 2015). Así mismo, con los de otros reportes a nivel internacional, aunque con variaciones en los valores de resistencia. Por ejemplo, estudios en la India revelan un incremento entre aislados invasivos de *S. pneumoniae* de un 1,3% en el 2007 a 18,3% en el 2010 (Goyal *et al.*, 2007; Chawla *et al.*, 2010); mientras que en Malasia entre el 2000-2007 se informa un 33% de aislados invasivos resistentes a penicilina (Jefferies *et al.*, 2014). Por otra parte, una revisión publicada en el 2010 acerca de la situación en Europa revela un 31% de resistencia a penicilina en  $<18$  años (rango 7 y 53%) (Isaacman *et al.*, 2010).

Para las cefalosporinas la baja resistencia demostrada en este estudio (4,07%) concuerda con los datos divulgados a nivel internacional. Esta es una familia de drogas para la cual la resistencia en *S. pneumoniae* es rara, aunque la frecuencia con que se informa, por ejemplo en Europa, varía en el rango de 0 a 36% (Isaacman *et al.*, 2010). En Cuba, entre 2006-2007 se notifican escasos aislados no susceptibles, a pesar de la resistencia observada para penicilina: resistencia nula a cefalosporinas para aislados procedentes de ENI entre  $< 6$  años, 1% para el grupo de 6 - 14 años y que aumenta a 3,7% en el grupo de los  $> 14$  años (Tamargo *et al.*, 2007 y 2008). De igual forma, en otras regiones del planeta más

distantes, como Oman, al suroeste de Asia, se reporta un 56% de aislados resistentes a penicilina contra un 99% de susceptibilidad a ceftriaxona (Al-Yaqoubi y Elhag, 2011).

Este gran contraste en cuanto a la susceptibilidad a penicilina y cefalosporinas puede ser explicado a través del conocimiento de que en la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos en *S. pneumoniae* intervienen diferentes tipos de PBP. El nivel de resistencia depende del tipo de PBP involucrada y de la afinidad del agente  $\beta$ -lactámico en cuestión por estas. Mutaciones en la PBP2x y PBP2b conducen a bajos niveles de resistencia. La PBP2b no está involucrada en la resistencia a cefalosporinas y para que se pongan de manifiesto altos niveles de CMI mediados por mutaciones en la PBP1 estas deben coexistir con mutaciones en la PBP2x y/o PBP2b (Hakenbeck *et al.*, 2012). De este modo, tras conocer los valores de CMI para penicilina y ceftriaxona resumidos en la Tabla 4.5 puede inferirse que los pocos aislados cubanos demostrados resistentes a ceftriaxona en este estudio (cinco aislados) presentan mutaciones en la PBP2x.

El fenómeno de la resistencia a penicilina está frecuentemente asociado a la resistencia a diferentes clases de antibióticos, incluyendo otros  $\beta$ -lactámicos, cefalosporinas, trimetoprim/sulfametoxazol, macrólidos, quinolonas y cloranfenicol. En el presente estudio esta conducta se puso en evidencia para un número relativamente bajo de aislados, que en correspondencia fueron clasificados como MDR (12 aislados; 9,76%). Este resultado coincide con el obtenido en el LNRN-IPK de este el 2014 (9% MDR) (Toraño G. Susceptibilidad a antimicrobianos en *Streptococcus pneumoniae*: Ocho años de vigilancia en Cuba (Enero 2007 - Enero 2015) [Presentación oral]. IV Taller de Resistencia Antimicrobiana en Bacterias y Hongos Patógenos. Habana, Cuba; 2015).

Como la resistencia a penicilina fue superior entre los aislados meníngeos (Figura 4.3) la MDR se observó justamente también entre ellos, para los cuales se demostraron altos valores de CMI para la droga. Esto ratifica con nuevos datos nacionales la recomendación de mantener a la penicilina como tratamiento de elección en casos de neumonía por neumococo, informada con anterioridad en el período 2007-2012 de la vigilancia de la ENI en Cuba (Pías, 2012).

La MDR en *S. pneumoniae*, tiene una incidencia variable y constituye una alarma mundial hasta el 2008, cuando se modifican los valores de corte para la interpretación de la resistencia a penicilina, pues con los utilizados hasta ese momento se sobrestimaba el fenómeno (CDC, 2008; CLSI, 2008). De la misma manera la MDR para las distintas regiones del planeta cambia como consecuencia de la introducción de la VCN7v. Por ejemplo, un estudio entre el 2004-2005 en 15 países de Europa demuestra una prevalencia del 15,8% pero con una gran variabilidad entre los países (0% en Dinamarca; 40,8% en Francia y 42,9% en Grecia) (Riedel *et al.*, 2007). En Asia la cifra global de MDR informada entre el 2000-2001 es incluso superiores (26,8%), con frecuencias excepcionales en Vietnam (71.4%), Hong Kong (44.9%) y Korea (45.2%) (Song *et al.*, 2004). En cambio, en Brasil entre 2000-2004 se comunica un valor inferior de MDR (4.6%) (Brandileone *et al.*, 2006). En la India entre el 2010 y 2013 se incrementa de un 4% a 20% (Chawla *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2013).

En Estados Unidos, antes del empleo de la VCN7v en el 2000, la mayoría de los aislados MDR se corresponden con los serotipos incluidos en esta. Luego de su introducción la resistencia es más común para el serotipo 19A (CDC, 2013). Al respecto, hay una coincidencia absoluta con los resultados demostrados para Cuba en el 2015 pues precisamente el serotipo 19A fue el que dominó entre los aislados resistentes a penicilina (10,34%), seguido de los serotipos 23F y 14, aunque aún no ha sido introducida la vacunación antineumocócica. Esta observación junto a los resultados de la estimación de la cobertura teórica de serotipos de las vacunas con posibilidades de ser utilizadas en el país afianza la necesidad de mantener una atención sistemática de los serotipos responsables de ENI, con énfasis en la detección de patrones de resistencia inusuales o alarmantes.

El serotipo 19A, junto al 1, 5, 7F, 33F y el serogrupo 15 figuran entre los que se reconocen como los de reemplazo en la ENI tras el empleo de la VCN7v; de ellos el 19A se considera el predominante fundamentalmente en niños < 5 años de edad y en adultos  $\geq$  65 años (Tan, 2012). Varias razones se alegan para explicar la dominancia del serotipo 19A en el fenómeno de reemplazo. En el caso de los países con un uso limitado de la VCN7v esto se asocia más al empleo indiscriminado de antibióticos, especialmente los de la familia de los

macrólidos (Muñoz-Almagro *et al.* 2008; Van Effeltherre *et al.* 2010). Otra de las explicaciones se refiere a la posible expansión de un clon 19A resistente a antibióticos, como consecuencia del fenómeno de conmutación o "switching" capsular, y la consecuente pérdida de reacción cruzada generada para el serotipo 19A por el 19F incluido en la VCN7v (Moore *et al.*, 2008).

## 5.2 Estudio de aislados nasofaríngeos de *S. pneumoniae*

El conocimiento de la frecuencia de colonización/portación nasofaríngea por los diferentes serotipos de *S. pneumoniae* es importante pues existe correlación entre estos y los responsables de ENI. Así mismo, esta sirve como indicador de la prevalencia de la resistencia a los antimicrobianos utilizados en las diferentes poblaciones.

En Cuba el único precedente de estudio de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* lo constituye una investigación recientemente aprobada para su publicación en la que se incluyen niños sanos : 984 entre 2 y 18 meses de edad en el período Octubre-Diciembre del 2013 y 1 135 niños entre 1 y 5 años que asisten a círculos infantiles, entre Junio 2014 y Noviembre 2015. La prevalencia global de colonización en el primer grupo es de 21.6% y en el segundo de 31,01% (Toledo *et al.*, 2016).

En el presente estudio la frecuencia de colonización nasofaríngea entre niños  $\leq 5$  años con diagnóstico de IRAG fue inferior (11,95%). En este punto se impone comentar que la frecuencia de colonización nasofaríngea demostrada debe ser considerada como preliminar atendiendo a que esta vigilancia es de reciente implementación en el marco del protocolo de vigilancia centinela de la ENI en niños  $\leq 5$  años (Linares-Pérez N. Model for clinical research and impact evaluation of the Cuban pneumococcal vaccine [Oral Presentation]. Vacci Pharma International Conference. Varadero, Cuba; 2015). Por otra parte, entre Enero-Diciembre 2015, la contribución de los diferentes sitios centinelas a este estudio es desigual (Tabla 4.7) lo que pudiera contribuir a la introducción de sesgos en los resultados.

Son múltiples los estudios publicados que abordan el tema de la colonización nasofaríngea y su frecuencia entre niños sanos o entre los que se confirma neumonía adquirida en la comunidad, así como los dirigidos a asociar el estado de portador nasofaríngeo por

*S. pneumoniae* con el impacto de la vacunación. En consecuencia son también variadas las tasas de colonización nasofaríngea informadas a nivel internacional.

Una investigación en Murcia, España, en 1 562 niños sanos entre 1 y 4 años de edad vacunados, concluye una frecuencia de colonización nasofaríngea que oscila entre 24,6% y 38,9% entre el verano e invierno, respectivamente (Alfayate-Miguélez *et al.*, 2014). Otro estudio en Perú en el que se incluyen 2 123 niños también sanos pero no vacunados, entre 2 meses y 2 años de edad, comunica una frecuencia de colonización nasofaríngea de 27% (Mercado *et al.*, 2012). Cifras similares anuncia un estudio en el Distrito Federal, México, durante el 2005 en niños entre dos meses y 5 años de edad: 28% de colonización entre niños con enfermedad respiratoria leve en la comunidad y 17,4% en niños sanos (Solórzano-Santos *et al.*, 2005). De igual forma, una investigación realizada en Estados Unidos entre el 2013-2014 en niños sanos entre 0 y 17 años demuestra una tasa global de colonización nasofaríngea de 18,3%, que entre los menores de 6 años es superior y oscila entre 37 y 32% (Zhou *et al.*, 2015).

Entre niños  $\leq 6$  años con IRAG, un estudio en Lituania entre el 2012-2013 y otro en Tanzania en el 2010, advierten frecuencias de colonización nasofaríngea superiores (40 y 35%, respectivamente) a la demostrada para niños cubanos de este mismo grupo durante el 2015 (Usonis *et al.*, 2015; Moyo *et al.*, 2012).

Toda ENI está precedida de la colonización nasofaríngea de modo que es evidente la estrecha relación que existe entre los serotipos que colonizan la nasofaringe y los que provocan enfermedad, sin embargo algunos considerados como muy invasivos se encuentran raramente entre portadores (por ejemplo los serotipos 1 y 5) (Brueggemann *et al.*, 2004). En relación a los serotipos que predominaron entre los aislados nasofaríngeos en el presente estudio (19A, 6B y 19F, 14 y 6A) los resultados son comparables parcialmente con los comunicados por otras investigaciones, pues independientemente de que al respecto hay diferencias a nivel internacional, antes de la introducción de la vacunación varían poco los serotipos comunicados como los más frecuentes: 19F, 6B, 14, 23F y 6A (Dagan *et al.*, 2002). Por ejemplo, en Argelia, en el período previo a la vacunación (2011-2012) entre niños sanos  $< 5$  años de edad se reconocen como los más comunes entre portadores

nasofaríngeos, a los serotipos 6B, 14, 19F, 23F, 4, 9V/A, 1, 19A, 6A y 3 (Ziane *et al.*, 2016).

Un estudio en Barcelona, España, luego de la introducción de la VCN7v (2007-2011) demuestra, a través del análisis de 209 exudados nasofaríngeos de niños sanos < 6 años de edad el predominio de portadores de los serotipos 19A, 23B, 6A y 19F (del Amo *et al.*, 2013). Otra investigación en Suiza, entre < 16 años con neumonía adquirida en la comunidad, luego de cuatro años del uso de la VCN7v, notifica a los serotipos 19A, 6A, 6B y 7F como los más comunes entre los portadores y alerta acerca de que el 51,4% de los serotipos demostrados entre estos se corresponden con los seis nuevos serotipos incluidos en la VCN13v (Chappuy *et al.*, 2013).

Ante esta diversidad de serotipos informados por los diferentes estudios a nivel internacional lo realmente relevante en la actual investigación es la coincidencia general entre los demostrados como responsables de ENI en Cuba en el 2015 y entre los portadores nasofaríngeos. En estudios similares en el marco del protocolo de vigilancia centinela de la ENI en niños  $\leq 5$  años de edad sería conveniente contar con la metodología de PCR para la determinación directa de serotipos de *S. pneumoniae* en la nasofaringe. Esto permitirá demostrar portadores con más de un serotipo y llevar al mínimo el número de aislados que se informen SS (Kandasamy *et al.*, 2015).

Por otro parte, es también aceptado que la selección de aislados de *S. pneumoniae* resistentes a antibióticos tiene lugar justamente en la nasofaringe de los portadores por lo que existe una relación consistente entre los serotipos más frecuentemente aislados de la nasofaringe y aquellos que presentan mayor resistencia (Whitney *et al.*, 2000).

En el presente estudio la comparación de los resultados de la susceptibilidad a penicilina utilizando los valores de corte para esta droga por vía intravenosa o por vía oral demostró diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4.9) que conllevaron a proponer a este último como el criterio más acertado para el estudio de la susceptibilidad a penicilina de los aislados nasofaríngeos. De este modo se hizo posible la detección de un número mayor de aislados resistentes a penicilina (de tres a 14 aislados) porque el valor de corte disminuye de 8 a 2  $\mu\text{g/mL}$ . Incluso fue posible informar cinco aislados con CMI de 1  $\mu\text{g/mL}$ , para los

cuales se describe resistencia a cefalosporinas de tercera generación administradas por vía oral (Ejemplo: Cefuroxime). Estas no se incluyen de rutina entre las pruebas de susceptibilidad, en las que solo son evaluadas las consideradas como drogas centinelas (entre los  $\beta$ -lactámicos - penicilina y ceftriaxona), que no permiten inferir la respuesta a otros antimicrobianos del grupo (Fenoll *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2015)

Clásicamente, a nivel internacional, los serotipos más relacionados con la resistencia, especialmente a penicilina son: 6A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F y 23F (Hausdorff *et al.*, 2000). Los anunciados como resistentes entre los aislados de portadores nasofaríngeos de *S. pneumoniae* en  $\leq 5$  años de edad y con diagnóstico de IRAG, en Cuba durante el 2015, coinciden de manera general con estos (fueron: 19A, 19F, 6A, 6B y 14).

Así por ejemplo, concuerdan con los divulgados por un estudio en Argelia entre el 2010-2014 entre portadores asintomáticos  $< 5$  años de edad (14, 19A, 19F y 23F) y con los de uno en Brasil durante el 2010 entre niños que acuden a círculos infantiles (6A, 6B, 9V, 14, 15A, 19F, 19A, y 23F) (Ziane *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2010). Así mismo, se ajustan en parte con los resultados de otro estudio en Brasil, también en el 2010 pero entre portadores  $< 6$  años atendidos en el servicio de emergencia de pediatría, entre los que se demuestran como los serotipos de mayor resistencia el 14, 23F, 6A, 6B, 10A y 19F (Neves *et al.*, 2013). En cambio, son muy similares a los del estudio realizado en Lituania entre el 2012-2013, en niños  $\leq 6$  años con IRAG antes de la introducción de la vacuna contra neumococo (14, 19 F, 6A, 6B y 15) (Stacevičienė *et al.*, 2016).

Sin embargo, aunque la asociación entre serotipos específicos de *S. pneumoniae* y la resistencia a los antimicrobianos está bien documentada el fenómeno puede ser también observado para otros serotipos como por ejemplo el 3, 6C, 10A y 18C (Neves *et al.*, 2013). En el presente estudio así se constató para un aislado serotipo 6C.

Finalmente, la comparación de los perfiles de susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislados nasofaríngeos de *S. pneumoniae* y de los responsables de enfermedad entre niños  $\leq 5$  años durante el 2015 en Cuba no reveló diferencias significativas en relación a la resistencia a penicilina. Este resultado discrepa del expuesto por un estudio en Estados Unidos entre el 2013-2014 entre portadores de 0-17 años, en el que empleando también el

criterio de penicilina vía oral, se observa una mayor resistencia a penicilina entre los aislados nasofaríngeos. Difiere además de los resultados de otro estudio en Estados Unidos y de uno en Israel, donde se demuestra un incremento de la susceptibilidad a la penicilina entre los aislados nasofaríngeos tras el uso de la VCN13v (Desai *et al.*, 2015; Dagan *et al.*, 2015).

El porcentaje mediano de resistencia a penicilina demostrado para los aislados nasofaríngeos, así como las altas cifras de resistencia para la eritromicina y el trimetoprim/sulfametoxazol, pueden entenderse como un reflejo del comportamiento de los aislados de *S. pneumoniae* responsables de enfermedad invasiva en el país.

Los portadores nasofaríngeos constituyen el principal reservorio de la bacteria y más que un estado importante para el propio individuo es una condición relevante para la comunidad pues los portadores se convierten en vectores para el resto de la población, incluyendo la resistencia pues es en la nasofaringe donde se seleccionan fundamentalmente los aislados resistentes por la exposición a los tratamientos antimicrobianos y la ganancia de genes de resistencia a partir de otras especies bacterianas (García, 2010; Henriques-Normark y Tuomanen, 2013).

La principal fortalezas de este trabajo radica en el momento de su realización, justo antes de la introducción de la vacunación antineumocócica en Cuba. Pues sus resultados contribuyen a la línea base de la vigilancia en el país, y en que por primera vez se aborda la comparación de aislados invasivos y nasofaríngeos.

*V.I. Conclusiones*

## VI. CONCLUSIONES

- En Cuba, durante el 2015, entre el 49,6 y 88,5% de los aislados invasivos de *S. pneumoniae* están contenidos en las VCN con posibilidades de ser empleadas en el país, por lo que se estima que con estas potencialmente se habría logrado una reducción importante de los casos de ENI en el período.
- La mayor y menor prevención de la ENI en los niños  $\leq 5$  años se habría logrado con la VCN13v (92,6%) y el CVC7-T (54,4%), respectivamente, lo que puede atribuirse a la frecuencia observada para aislados de *S. pneumoniae* de los serotipos 6A y 19A, resultado que deberá considerarse al decidir la mejor estrategia de vacunación en Cuba y en el desarrollo/mejoramiento del candidato vacunal autóctono.
- La resistencia a antimicrobianos fue más frecuente entre los serotipos vacunales 19A, 14 y 23F de aislados invasivos de *S. pneumoniae*, lo que sugiere que la vacunación antineumocócica en Cuba podría impactar adicionalmente en la disminución de ese fenómeno.
- La demostración de la colonización/portación nasofaríngea por *S. pneumoniae* para 11,95% de los niños  $\leq 5$  años con IRAG permitió el reconocimiento en estos de la condición inicial o prerrequisito para desarrollar una ENI, al tiempo de revelarlos como fuentes de transmisión de la bacteria en el ambiente hospitalario.
- Los serotipos de *S. pneumoniae* aislados con mayor frecuencia de la nasofaringe de niños  $\leq 5$  años con IRAG fueron un reflejo de los predominantes como responsables de ENI en este mismo grupo, lo que sugiere que con la introducción de la vacunación potencialmente se lograría el mismo impacto en la reducción del estado de portador nasofaríngeo.
- La similitud de los perfiles de susceptibilidad de los aislados nasofaríngeos y de los responsables de enfermedad entre niños  $\leq 5$  años ratifica que la prevalencia de portadores nasofaríngeos de *S. pneumoniae* resistentes a antimicrobianos puede ser utilizada como un indicador subrogado de la resistencia entre aislados invasivos de una misma región o sitio, en el mismo período.

*V.F.F. Recomendaciones*

## VII. RECOMENDACIONES

- Implementar en el LNRN-IPK la metodología de PCR para la detección directa de serotipos de *S. pneumoniae* a partir de muestras de exudados nasofaríngeos para lograr la detección de portadores de más de un serotipo y minimizar el informe de aislados SS.
- Incluir en el estudio de la susceptibilidad a eritromicina concentraciones de la droga superiores a 16 µg/mL para poder detectar aislados de *S. pneumoniae* con fenotipo MLSB (CMI  $\geq$  128 µg/mL).

*V.I.I. Referencias Bibliograficas*

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Adegbola RA, DeAntonio R, Hill PC, Roca A, Usuf E, Hoet B, *et al.* Carriage of *Streptococcus pneumoniae* and Other Respiratory Bacterial Pathogens in Low and Lower-Middle Income Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS ONE 2014;9(8):e103293.
- Al-Yaqoubi M, Elhag K. Serotype Prevalence and Penicillin-susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in Oman. OMJ 2011; 26(1):43-7.
- Alfayate- MS, Ruiz-Gómez J, Fenoll-Comes A, Sanchez –Solis –de Querol M, Iofrío –de Arce A, Casquet - Barceló A, *et al.* Estudio epidemiológico de portadores nasofaríngeos de *Streptococcus pneumoniae* en niños en la comunidad autónoma de Murcia Enferm Infecc Microbiol Clin 2014;32(7):434–440.
- Almeida E, Andrade JG, Andrade AL, Franco CM, Silva S, Oliveira CR, *et al.* Survey of nonsusceptible nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates in children attending day-care centers in Brazil. Pediatr Infect Dis J 2010;29:77–79.
- American Academy of Pediatrics – Committee on Infectious Diseases Policy statement: recommendations for the prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate vaccine (Prevnar), pneumococcal polysaccharide vaccine, and antibiotic prophylaxis. Pediatrics 2000;106:362–366.
- Andrews NJ, Waight PA, Burbidge P, Pearce E, Roalfe L, Zancolli M *et al.* Serotype-specific effectiveness and correlates of protection for the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine: a postlicensure indirect cohort study. Lancet Infect Dis 2014;14:839-846.
- Bagga B, Shenep J. Management of Infections Caused by Vancomycin-Resistant Gram-Positive Bacteria. Pediatric Infect Dis J 2010;29(7):662-4.
- Billings ME, Deloria-Knoll M, O'Brien KL. Global Burden of Neonatal Invasive Pneumococcal Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. Pediatr Infect Dis J 2016;35(2):172-179.
- Black S. Changing epidemiology of invasive pneumococcal disease: a complicated story. Clin Infect Dis 2008;47:485– 486.

- Black S, Eskola J, Whitney C, Shinefield H. Pneumococcal conjugate vaccine and pneumococcal common protein vaccine. In Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA eds. Vaccines, 5th ed. Philadelphia, PA, WB Saunders Company: 2008:531–567.
- Brandileone MC, Casagrande ST, Guerra ML, Zanella RC, Andrade AL, Di Fabio JL. Increase in numbers of beta-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. J Med Microbiol 2006;55(5):567–574.
- Brueggemann AB, Peto TE, Crook DK, Butler JC, Kristinsson KG, Spratt BG. Temporal and geographic stability of the serogroup- specific invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children. J Infect Dis 2004;190:1203-11.
- Brueggemann AB, Coffman SL, Rhomberg P. Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* in United States since 1994-1995. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:680-8.
- Caierão J, Hawkins P, Santanna FH, daCunha GR , d’Azevedo PA, McGee L *et al.* Serotypes and genotypes of invasive *Streptococcus pneumoniae* before and after PCV10 implementation in southern Brazil. PLoS ONE 2014. 9:e111129.doi:10.1371/journal.pone.0111129.
- Cardozo D, Nascimento-Carvalho C, Andrade A, Silvany-Neto A, Daltro C, Brandão M, *et al.* Prevalence and risk factors for nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* among adolescents. J Med Microbiol 2008;5:185-9.
- Cardoso G, Velázquez N. Importancia clínica de *Streptococcus pneumoniae* tolerante a la vancomicina. Enfer Infecc Pediatr 2007;20(79):51-3.
- Castañeda E, Agudelo CI, Regueira M, Corso A, Brandileone MC, Brandao A, *et al.* Laboratory-based surveillance of *Streptococcus pneumoniae* invasive disease in children in 10 Latin American countries. SIREVA II Project, 2000–2005. Pediatric Infect Dis J 2009;28(9):265-70.
- CDC. Pneumococcal Disease Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. 13<sup>th</sup> edition. Atlanta. Center for Disease Prevention and Control 2015.pp 279-294.

- CDC. Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) recommended immunization schedules for persons aged 0 through 18 years and adults aged 19 years and older —United States. *MMWR Surveill. Summ* 2013;62(1):1–19.
- CDC. Effects of New Penicillin Susceptibility Breakpoints for *Streptococcus pneumoniae* - United States, 2006-2007. *MMWR* 2008;57(50):1353-5.
- Cohen R. The need for prudent use of antibiotics and routine use of vaccines. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(3):21-23.
- Chamorro G, León M, Kawabata A, Franco R, Gómez G, Quiñónez B, *et al.* Prevalencia de serotipos y resistencia a antibióticos betalactámicos de *Streptococcus pneumoniae* en menores de 6 años. Paraguay 2000 a 2008. *Rev Par Epidemiol* 2011;2(1)11-17.
- Chappuy H, Keitel K, Gehri M, Tabin R, Robitaille L, Raymond F, *et al.* Nasopharyngeal carriage of individual *Streptococcus pneumoniae* serotypes during pediatric radiologically confirmed community acquired pneumonia following PCV7 introduction in Switzerland *BMC Infectious Diseases* 2013; 13:357.
- Chawla K, Gurung B, Mukhopadhyay C, Bairy I. Reporting Emerging Resistance of *Streptococcus pneumoniae* from India. *J Glob Infect Dis* 2010;2(1):10-4.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement, CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2015.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eighteenth informational supplement, CLSI document M100-S18. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2008.
- Crowther-Gibson P, Cohen C, Klugman K, Gouveia L, Gottberg A, Group for Enteric, Respiratory, and Meningeal Disease Surveillance in South Africa (GERMS-SA). Risk Factors for Multidrug-Resistant Invasive Pneumococcal Disease in South Africa, a Setting with High HIV Prevalence, in the Prevacine Era from 2003 to 2008 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012;56(10):5088–5095.
- Dagan R, Juergens C, Trammel J, Patterson S, Greenberg D, Givon-Lavi N, *et al.* Efficacy of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) versus that of 7-

- valent PCV (PCV7) against nasopharyngeal colonization of antibiotic-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 2015;211:1144–53.
- Dagan R, Leibovitz E, Greenberg D, Bakaletz L, Givon-Lavi N. Mixed pneumococcal-nontypable *Haemophilus influenzae* otitis media is a distinct clinical entity with unique epidemiologic characteristics and pneumococcal serotype distribution. *J Infect Dis* 2013;208:1152-1160.
  - Dagan R, Klugman KP. Impact of conjugate pneumococcal vaccine on antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* 2008;8:785–795.
  - Dagan R, Givon-Lavi N, Zamir O, Sikuler-Cohen M, Guy L, Janco J *et al*. Reduction of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* after administration of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine to toddlers attending day care centers. *J Infect Dis* 2002;185:927-36.
  - Dang-Van A, Tinabg G, Acan J, Shaw W, Bouanchaud D. Chloranphenicol resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Enzymatic acetylation and possible plasmid linkage. *Antimicrob Agents Chemother* 1978;13(4):577-83.
  - Darenberg J, Henriques Normark B. The epidemiology of pneumococcal infections- the Swedish experience. *Vaccine* 2009;27(6):G27-32.
  - Delany I, Rappuoli R, Seib KL. Vaccines, reverse vaccinology, and bacterial pathogenesis. *Cold Spring Hard Perspect Med* 2013;3:a012476 doi:10.1101/cshperspect a012476.
  - Desai AP, Sharma D, Crispell EK, Baughman W, Thomas S, Tunali A, *et al*. Decline in pneumococcal nasopharyngeal carriage of vaccine serotypes after the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children in Atlanta, Georgia. *Pediatr Infect Dis J*. 2015;34(11):1168-74.
  - del Amo E, Brotons P, Monsonis M, Triviño M, Iñigo M, Selva L, Sa-Leñao R and Muñoz- Almagro C. High invasiveness of pneumococcal serotypes included in the new generation of conjugate vaccines. *Clin Microbiol Infect* 2014;20: 684–689. doi:10.1111/1469-0691.12422.
  - Dickinson F, Rodríguez M, Toraño G. Pneumococcal meningitis in Cuban children and adolescents: A fifteen years follow up. *Pediatrics Research International Journal* 2015; Article ID 596251. DOI: 10.5171/2015.

- Domínguez CM, Verani JR, Montenegro Renoier EI, de Cunto Brandileone MC, Flannery B, de Oliveira LH, Santos JB, de Moraes JC. Brazilian Pneumococcal Conjugate Vaccine Effectiveness Study Group. Effectiveness of ten-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in Brazil: a matched casecontrol study. *Lancet Respir Med* 2014;2:464–471.
- Dotres C, Puga R, Ricardo Y, Broño C, Paredes B, Echemendía V *et al.* Safety and preliminary immunogenicity of Cuban pneumococcal conjugate vaccine candidate in healthy children: A randomized phase I clinical trial. *Vaccine* 2014;32(41):5266–5270.
- Dunne EM, Smith-Vaughan HC, Robins-Browne RM, Mulholland EK, Satzke C. Nasopharyngeal microbial interactions in the era of pneumococcal conjugate vaccination. *Vaccine* 2013;31:2333-2342.
- Drijkoningen JJ, Rohde GG. Pneumococcal infection in adults: burden of disease. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2014;20 (5):45-51. doi:10.1111/1469-0691.12461.
- Fenoll A, Gimenez M, Robledo O, Aguilar L, Tarrago D, Granizo J, Martin-Herrero J. Influence of penicillin/amoxicillin non-susceptibility on the activity of third-generation cephalosporins against *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;27:75-80. DOI10.1007/s10096-007-0402-5.
- Fossati S, Galletti P, Veliz O, Sorhouet C, Moscoloni M, Regueira M, Grupo SIREVAII Adultos- Argentina Inicio de la Vigilancia nacional de serotipos y resistencia antimicrobiana en *S. pneumoniae* en adultos con enfermedad invasiva de Argentina: 2013-2014 (Presentación Oral. V Congreso de Enfermedades Endemoepidémicas del Hospital Infecciosas Francisco J Muñiz, 2015. [www.congresomuñiz.org.ar](http://www.congresomuñiz.org.ar)
- Fraimow HS, Tsigrelis S. Antimicrobial Resistance in the Intensive Care Unit: Mechanisms, Epidemiology, and Management of Specific Resistant Pathogens. *Crit Care Clin* 2011;27:163-205.
- Gabastou JM, Agudelo CI, Brandileone MC, Castañeda E, Silva de Lemos AP, Di Fabio JL. Caracterización de aislamientos invasivos de *S. pneumoniae*, *H.*

- influenzae* y *N meningitidis* en América Latina y el Caribe: SIREVA II, 2000-2005. *Rev Panam Salud* 2008;24(1):1-15.
- Gant CM, Rosingh AW, López-Hontangas JL, van der Heijden M, González-Morán F, Bijlsma JJ, Canton E; RedMiva (Network of Microbiological Vigilance of Comunidad Valenciana). Serotype distribution and antimicrobial resistance of invasive pneumococcal disease strains in the Comunidad Valenciana, Spain, during the winter of 2009-2010: low PCV7 coverage and high levofloxacin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:4988-9; PMID:22751535; <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01201-12>.
  - García Vera C. Estado de portador de neumococo en niños y su relación con la enfermedad invasiva. ¿Qué ha cambiado tras la introducción de la vacuna conjugada? *Revista Pediátrica de Atención Primaria* 2010;12(47):457-482.
  - Gay K, Baughman W, Miller Y, Jackson D, Whitney CG, Schuchat A *et al*. The emergence of *Streptococcus pneumoniae* resistant to macrolide antimicrobial agents: A 6 years population-based assessment. *J. Infect Dis* 2000;182:1417-24.
  - Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C, *et al*. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clinical Microbiology Reviews* 2015;28(3):871-99.
  - Gilley RP, Orihuela CJ. Pneumococci in biofilms are non-invasive: implications of nasopharyngeal colonization. *Front Cell Infect Microbiol* 2014;4(163):1-6.
  - Ginsburg AS, Tinkham L, Riley K, Kay NA, Klugman KP and Gill CJ. Antibiotic non-susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* isolates identified in African cohorts: ameta-analysis of three decades of published studies. *Int J Antimicrob Agents* 2013;42:482-491.
  - Goldblatt D, Hussain M, Andrews N, Ashton L, Virta C, Melegaro A, *et al*. Antibody responses to nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in adults: a longitudinal household study. *J Infect Dis* 2005;192(3):387-93.
  - González N, Paredes B, Pérez S, Mirabal M, Rivero I, González C, *et al*. Safety and immunogenicity of Cuban antipneumococcal conjugate vaccine PCV7-TT in Healthy Adults. *MEDICC Review* 2015;17(4):32-37.

- Gosbell I, Neville S. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: a decade of results from south-western Sydney. *Commun Dis Intell* 2000;24:340-3.
- Goyal R, Singh NP, Kaur M, Talwar V. Antimicrobial resistance in invasive and colonizing *Streptococcus pneumoniae* in North India. *Indian J Med Microbiol* 2007;25(3):256-59.
- Grijalva CG, Nuorti JP, Arbogast PG, Martin SW, Edwards KM, Griffin MR. Decline in pneumonia admissions after routine childhood immunization with pneumococcal conjugate vaccine in the USA: a time-series analysis. *Lancet* 2007;369:1179-1186.
- Habib M, Porter B, Satzke C. Capsular Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* using the Quellung Reaction. *J. Vis Exp* 2014;(84),e51208, doi:10.3791/51208.
- Hakenbeck R, Brückner R, Denapaite D and Maurer P. Molecular mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Future Microbiol* 2012;7(3), 395–410. Doi:10.2217/FMB.12.2 2012 Future Medicine Ltd.
- Hathaway LJ, Stutzmann Meier P, Battig P, Aebi S, Muhlemann K. A homologue of aliB is found in the capsule region of nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 2004;186:3721–3729.
- Hausdorff W, Hoet B, Schuerman L. Do pneumococcal conjugate vaccines provide any cross-protection against serotype 19A? *BMC Pediatrics* 2010;10:4.
- Hausdorff WP, Brueggemann AB, Hackell JG, Scott JAG. Pneumococcal serotype epidemiology. In: Silber GR, Klugman KP, Makela PH (Eds). *Pneumococcal vaccines: The impact of conjugate vaccine*. Washington D.C: ASM Press 2008;pp.139-162.
- Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000;30:100-21.
- Henriques-Normark B, Tuomanen EI. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013;3(7). Downloaded from <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/> on June 27, 2016.

- Hoffmann CJ, Chaisson RE, Martinson NA. Cotrimoxazole Prophylaxis and Tuberculosis Risk among People Living with HIV. PLoS ONE 2014;9(1):e83750. doi:10.1371/journal.pone.0083750.
- Ing J, Mason EO, Kaplan SL, Lamberth LB, Revell PA, Luna RA, *et al.* Characterization of nontypeable and atypical *Streptococcus pneumoniae* pediatric isolates from 1994 to 2010. Journal Clinical Microbiology 2012;50(4):1326-30.
- Iroh Tam PY, Bernstein E, Ma X, Ferrieri P. Blood Culture in Evaluation of Pediatric Community-Acquired Pneumonia: A Systematic Review and Meta-analysis. Hospital Pediatrics 2015;5(6):324-36.
- Isaacman DJ, McIntosh ED, Reinert RR. Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. International Journal of Infectious Diseases 2010;14(3):197-209.
- Jefferies JM, Mohd Yusof MY, Devi Sekaran S, Clarke SC. Novel Clones of *Streptococcus pneumoniae* Causing Invasive Disease in Malaysia. PLoS ONE 2014;9(6): e97912. doi:10.1371/journal.pone.0097912.
- Kandasamy R, Gurung M, Thapa A, Ndimah S, Adhikari N, Murdoch DR, *et al.* Multi-Serotype Pneumococcal Nasopharyngeal Carriage Prevalence in Vaccine Naïve Nepalese Children, Assessed Using Molecular Serotyping. PLoS ONE. 2015;10(2): e0114286. doi:10.1371/journal.pone.0114286.
- Kaplan SL, Barson WJ, Lin PL, Stovall SH, Bradley JS, Tina Q, *et al.* Serotype 19A is the most common serotype causing invasive pneumococcal infections in children. Pediatrics 2010;125(3):429–436.
- Koon K, Sanders CM, Green J, Malone L, White H, Zayas D *et al.* Co-detection of pandemic (H1N1) 2009 virus and other respiratory pathogens. Emerg Infect Dis 2011;17(8):1475-1478.
- Kumar K.L, Ganaie F, Ashok V. Circulating Serotypes and Trends in Antibiotic Resistance of Invasive *Streptococcus pneumoniae* from Children under Five in Bangalore Journal of Clinical and Diagnostic Research 2013;7(12): 2716-2720.

- Kuttel M, Jackson G, Mafata M, Ravenscroft N. Capsular polysaccharide conformations in pneumococcal serotypes 19F and 19A. *Carbohydrate research* 2015;406:27-33.
- Klugman KP, Bentley SD, McGee L. Determinants of invasiveness beneath the capsule of the pneumococcus. *J Infect Dis* 2014;209:321.
- Kyaw MH, Lynfield R, Schaffner W, Craig A, Hadler J, Reingold A, *et al.* Effect of introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med* 2006;354(14):1455-1463.
- Li Y, Weinberger DM, Thompson CM, Trzcinski K, Lipsitch M. Surface Charge of *Streptococcus pneumoniae* Predicts Serotype Distribution. *Infect Immun* 2013;81:4519-4524.
- Linares J, Ardanuy C, Pallares R, Fenoll A. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:402-410.
- Lynch J, Zhanel G. *Streptococcus pneumoniae*: Does Antimicrobial Resistance Matter? *Semin Respir Crit Care Med* 2009;30(2):210-238.
- McFetridge R, Sobanjo-ter Meulen A, Folkerth SD, Hoekstra JA, Dallas M, Hoover PA *et al.* Safety, tolerability, and immunogenicity of 15-valent pneumococcal conjugate vaccine in healthy adults. *Vaccine* 2015;Apr 23.pii:S0264-410X(15)00478-8. Doi:10.1016/j.vaccine.2015.04.025.
- Makela PH and Butler JC. History of pneumococcal immunization In: Silber GR, Klugman KP, Makela PH, (Eds). *Pneumococcal vaccines. The impact of conjugate vaccine*. Washington, DC: ASM Press 2008;pp.19-29.
- Manning L, Laman N, Greenhill A, Michael A, Siba P, Mueller I, *et al.* Increasing chloramphenicol resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates from Papua New Guinea children with acute bacterial meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(9):4454-6.
- Marks LR, Davidson BA, Knight PR, Hakansson AP. Interkingdom signaling induces *Streptococcus pneumoniae* biofilm dispersion and transition from

- asymptomatic colonization to disease. *mBi* 2013;4(4):ce00438-13. Doi:10.1128/mBio.00438-13.
- Masia M, Padilla S, Antequera P, Ramos JM, Ruiz M, Gutierrez F. Predictors of pneumococcal co-infection for patients with pandemic (H1N1) 2009. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(8):1475-1478.
  - Mehr S y Wood N. *Streptococcus pneumoniae* a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination. *Pediatr Respir Rev* 2012;13(4):258–264.
  - Melander E, Ekdahl K, Jönsson G, Mølstad S. Frequency of penicillin-resistant pneumococci in children is correlated to community utilization of antibiotics. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19(12):1172-7.
  - Melander E, Mølstad S, Persson K, Hansson HB, Söderström M, Ekdahl K. Previous antibiotic consumption and other risk factors for carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17(12):834-8.
  - Méndez-Lage S, Losada-Castillo I, Agulla-Budiño A. *Streptococcus pneumoniae*: distribución de serotipos, sensibilidad antibiótica, factores de riesgo y mortalidad en Galicia en un periodo de 2 años. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2015;33(9):579-584.
  - Mercado E, Egoavil M, Horna S, Torres N, Velásquez R, Castillo M, *et al.* Serotipos de neumococo en niños portadores antes de la vacunación antineumocócica en el Perú *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2012;29(1):53-60.
  - Monasta L, Ronfani L, Marchetti F, Montico M, Vecchi Brumatti L, Bavcar A *et al.* Burden of disease caused by otitis media: Systematic review and global estimates. *PLoS ONE* 2012;7(4):e36226.doi:10.1371/journal.pone.0036226.
  - Moore MR, Link-Gelles R, Schaffner W, Lynfield R, Lexau C, Bennett NM, *et al.* Effect of use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children on invasive pneumococcal disease in children and adults in the USA: analysis of multisite, population-based surveillance. *Lancet Infect Dis* 2015;(3):301–309.
    - doi:10.1016/S1473-3099(14)71081-3.
  - Moore MR, Gertz RE Jr, Woodbury RL, Barkocy-Gallagher GA, Schaffner W, Lexau C, *et al.* Population snapshot of emergent *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in the United States, 2005. *J. Infect. Dis* 2008;197:1016–1027.

- Moyo Sabrina J, Steinbakk Martin, Aboud Said, Mkopi Namala, Kasubi Mabula, Blomberg Bjorn, *et al.* Penicillin resistance and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal carrier children under 5 years of age in Dar Salaam, Tanzania. *Journal of Medical Microbiology* 2012;61, 952–959 DOI 10.1099/jmm.0.042598-0.
- Muhlemann K, Uehlinger DE, Buchi W, Gorgievski M, Aebi C. The prevalence of penicillin-non- susceptible *Streptococcus pneumoniae* among children aged <5 years correlates with the biannual epidemic activity of respiratory syncytial virus. *Clin Microbiol Infect* 2011;17(2):1840-1844.
- Mulvey MR, Simor AE. Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be? *CMAJ* 2009;180(4):408-15.
- Muñoz-Almagro C, Jordan I, Gene A, Latorre C, Garcia-Garcia J, and Pallares R. Emergence of invasive pneumococcal disease caused by non-vaccine serotypes in the era of 7-valent conjugate vaccine. *Clin Infect Dis* 2008;46:174 –182.
- Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases 6<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Elsevier Inc 2005.pp.2392-2411.
- Nair H, Simões EAF, Rudan I, Gessner BD, Azziz-Baumgartner E, Zhang JSF, *et al.* Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis. *The Lancet* 2013;381(9875):1380-90.
- Neves F, Abreu T, Alves M, dos Anjos R, de Souza G, Gomes H, *et al.* Nasopharyngeal carriage, serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* among children from Brazil before the introduction of the 10-valent conjugate vaccine. *BMC Infectious Diseases* 2013;13:318 <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/13/318>.
- O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, *et al.* Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* 2009;374:893-902.

- O'Brien K, Nohynek H, and The WHO PNEUMOCOCCAL VACCINE TRIALS CARRIAGE WORKING GROUP. Report from a WHO Working Group: standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae* *Pediatr Infect Dis J* 2003;22(2):2e1–e11.
- OMS 2014: Centro de prensa de la Organización Mundial de la Salud. Neumonía. Nota descriptiva N° 331 [homepage en Internet]. Ginebra, Suiza; Noviembre 2014 [citado 1° de Noviembre de 2014]. Disponible en <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs331/es>.
- Oviedo-Orta E, Li CKF, Rappuoli R, Perspectives on vaccine development for the elderly. *Curr Opin Immunol* 2013;25:529-534.
- Pai R, Moore MR, Pilishvili T, Gertz RE, Whitney CG, Beall B. Active Bacterial Core Surveillance Team. Postvaccine genetic structure of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A from children in the United States. *J. Infect. Dis* 2005;192 (192):1988 –1995.
- Park IH, Geno KA, Sherwood LK, Nahm MH, Beall B. Population-based analysis of invasive nontypeable pneumococci reveals that most have defective capsule synthesis genes. *PLoS ONE* 2014;9:e97825. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0097825>.
- Park IH, Kim KH, Andrade AL, Briles DE, McDaniel LS, Nahm MH. Nontypeable pneumococci can be divided into multiple cps types, including one type expressing the novel gene *pspK*. *mBio* 2012;3(3):e00035-00012. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00035-12>.
- Paton JC, Boslego JW. Protein vaccines. In: Silber GR, Klugman KP, Makela PH (eds). *Pneumococcal vaccines: The impact of conjugate vaccine*. Washington D.C.: ASM Press 2008;p.421-435.
- Pérez GM, Parra A, Casimir L, Mastroianni A, Reijtman V, Lopardo H, Bologna R. Infecciones invasivas por *Streptococcus pneumoniae* en un hospital pediátrico de tercer nivel antes de la introducción de la vacuna conjugada. Características clínicas y serotipos involucrados *Arch Argent Pediatr* 2013;111(3):202-205 / 202.
- Perilla MJ, Ajello G, Bopp C, Elliott J, Facklam R, Knapp J, *et al*. *Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los*

- Antimicrobianos de patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo; 2003. WHO/CDC/CSR/RMD/2003.6. Atlanta.
- Pías L. Enfermedad invasiva por *Streptococcus pneumoniae*: serotipos y evolución de la resistencia antimicrobiana, Cuba, 2007-2011. Tesis para optar por el título de Médico Especialista de Primer Grado en Microbiología. IPK 2012.
  - Pilishvili T, Bennett NM. Pneumococcal disease prevention among adults: Strategies for the use of pneumococcal vaccines. *Vaccine* 2015; 33, Supplement 4:D60-D5.
  - Pilishvili T, Lexau C, Farley MM, Hadler J, Bennett NM *et al.* Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *J Infect Dis* 2010;201:32-41.
  - Phongsamart W, Srifeungfung S, Chatsuwat T, Nunthapisud P, Treerathaweeraphong V, Rungnobbhakun P, Sricharoenchai S and Chokephaibulkit K. Changing trends in serotype distribution and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive diseases in Central Thailand, 2009–2012, *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2014;10:7, 1866-1873, DOI: 10.4161/hv.28675.
  - Restrepo MI, Mortensen EM, Velez JA, Frei C, Anzueto A. A comparative study of community-acquired pneumonia patients admitted to the ward and the ICU. *Chest* 2008;133:610-617.
  - Richter SS, Diekema DJ, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F and Doern GV. Changes in pneumococcal serotypes and antimicrobial resistance after introduction of the 13-valent conjugate vaccine in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:6484-6489.
  - Riedel S, Beekmann SE, Heilmann KP, Richter SS, Garcia de Lomas J, Ferech M *et al.* Antimicrobial use in Europe and antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26(7):485-490.
  - Ronald N, Jones RN, Jacobs MR, Sadler HS. Evolving trends in *Streptococcus pneumoniae* resistance: implications for therapy of community-acquired bacterial pneumonia. *J Antimicrob Agents* 2010;36:197-204.

- Said MA, Johnson HL, Nonyane BAS, Deloria-Knoll M, O'Brien KL, Andreo F *et al.* Estimating the burden of pneumococcal pneumonia among adults: a systematic review and meta-analysis of diagnostic techniques. *PLoS ONE* 2013;8:e60273.
- Sa-Leao R, Nunes S, Brito-Avo A, Frazao N, Simoes AS, Crisostomo MI, Paulo AC, Saldanha J, Santos-Sanches I, de Lencastre H. Changes in pneumococcal serotypes and antibiotypes carried by vaccinated and unvaccinated day-care centre attendees in Portugal, a country with widespread use of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:1002–1007.
  - <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02775.x>.
- Simell B, Lahdenkari M, Reananen A, Kayhty H, Vakevaiinen M. Effects of ageing and gender on naturally acquired antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides and virulence-associated proteins. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15(9):1391-1397.
- Sobanjo-ter Meulen A, Vesikari T, Malacaman EA, Shapiro SA, Dallas MJ, Hoover PA, *et al.* Safety, tolerability and immunogenicity of 15-valent pneumococcal conjugate vaccine in toddlers previously vaccinated with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2015;34(2):186-94. Doi:10.1097/INF.0000000000000516.
- Solórzano-Santos F, Ortiz-Ocampo LA, Miranda-Novales MG, Echániz-Avilés G, Soto-Noguerón A, Guiscafré-Gallardo H. Serotipos prevalentes de *Streptococcus pneumoniae* colonizadores de nasofaringe, en niños del Distrito Federal. *Salud Púb Méx* 2005;47:276-81.
- Song JH. Advances in pneumococcal antibiotic resistance. *Expert Rev Respir Med* 2013;7(5):491-498.
- Song JH, Jung SI, Ko KS. High prevalence of antimicrobial resistance among clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asia (an ANSORP study). *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2101–2107.
- Scott JR, Hinds J, Gould KA, Millar EV, Reid R, Santosham M, O'Brien KL, Hanage WP. Nontypeable pneumococcal isolates among Navajo and White Mountain Apache communities: are these really a cause of invasive disease? *J Infect Dis* 2012;206:73–80. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jis307>.

- Shak JR, Vidal JE, Klugman KP. Influence of bacterial interactions on pneumococcal colonization of the nasopharynx. *Trends Microbiol* 2013; 21(3):129-135. Doi 10.1016/j.tim.2012.11.005.
- Shibl AM, Memish ZA, Al-Kattan KM. Antibiotic resistance and serotype distribution of invasive pneumococcal diseases before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine in the Kingdom of Saudi Arabia (KSA). *Vaccine* 2012;30(6):G32-6; PMID:23228355; <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.07.030>.
- Shivshankar P. Modulation of bacterial pathogenesis by oppressive aging factors: insights into host-pneumococcal interaction strategies. *ISRN Inflammation* Volume 2012, Article ID 267101. Doi:10.5402/2012/267101
- Short KR, Habets MN, Hermans PW, Diavatopoulos DA. Interactions between *Streptococcus pneumoniae* and influenza virus a mutually beneficial relationship. *Future Microbiol* 2012;7:609-624.
- Stacevičienė I, Petraitiienė S, Vaičiūnienė D, Alasevičius T, Kiršlienė J, Usonis V. Antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae*, isolated from nasopharynx of preschool children with acute respiratory tract infection in Lithuania. *BMC Infectious Diseases* 2016;16:216 DOI 10.1186/s12879-016-1544-9.
- Talukdar S, Zutshi S, Prashanth KS, Saikia KK, Kumar P. Identification of potential vaccine candidates against *Streptococcus pneumoniae* by reverse vaccinology approach. *Appl Biotechnol* 2014;172:3026-3041. Doi:10.1007/s12010-014-0749-x.
- Tamargo I, Llanes R, Toraño G, Hernández I, Pérez M, Llop A, *et al.* Informe Regional Sireva II, 2006: Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*, en procesos invasores. *Tecnologías Esenciales de Salud*. THS/EV- 2008/001. OPS.
- Tamargo I, Llanes R, Toraño G, Hernández I, Pérez M, Llop A, *et al.* Informe Regional Sireva II: Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria*

- meningitidis*, en procesos invasores, 2000-2005. Tecnologías Esenciales de Salud. THS/EV – 2007/002. OPS.
- Tarahomjoo S. Recent approaches in vaccine development against *Streptococcus pneumoniae*. J Mol Microbiol Botechnol 2014;24:215-227. doi:10.1159/000365052.
  - Tan T. Pneumococcal Conjugate Vaccines in the United States in the Era of pneumococcal conjugate vaccines. Clin. Microbiol. Rev. 2012, 25(3):409.
  - Toledo ME, Casanova M, Linares-Pérez N, García-Rivera D, Toraño G, Barcos I, Montes de Oca M, et al. Prevalence of Pneumococcal nasopharyngeal carriage among children 2-18 months old: baseline study pre-introduction of pneumococcal vaccination in Cuba. Accepted in Pediatr Infect Dis J April, 21th, 2016.
  - Toraño G, Pías L, Capote M, Rodríguez M, Dickinson F, Varcárcel M. Serotipos y resistencia antimicrobiana de aislamientos meníngeos de *Streptococcus pneumoniae*. Cuba, 2007-2012. VacciMonitor 2014;23(3):117-123.
  - Toraño G, Llanes R, Pías L, Abreu M, Varcárcel M. Serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en Cuba y progresión de la resistencia a la penicilina. Rev Cubana Med Trop 2010;62(2):157-160.
  - Ubukata K, Chiba N, Hanada S, Morozumi M, Wajima T, Shouji M, Iwata S; Invasive Pneumococcal Diseases Surveillance Study Group. Serotype Changes and Drug Resistance in Invasive Pneumococcal Diseases in Adults after Vaccinations in Children, Japan, 2010–2013 Emerging Infectious Diseases 2015;Vol.21,No.11.Doi:http://dx.doi.org/10.3201/eid2111.142029.
  - Usonis V, Stacevičienė I, Petraitiienė S, Vaičiūnienė D, Alasevičius T, Kiršlienė J. *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal colonization in children aged under six years with acute respiratory tract infection in Lithuania, February 2012 to March 2013. Euro Surveill 2015;20(13):pii=21079. Available online: <http://www.eurosurveillance.org>
  - Vakevainen M, Eklund C, Eskola J, Kayhty H. Cross-reactivity of antibodies to type 6B and 6A polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*, evoked by pneumococcal conjugate vaccines in infants. J Infect Dis 2001;184(6):789-93.
  - van den Bergh MN, Biesbroek G, Rossen JWA, de Steenhuijsen Piters WAA, Bosch AATM, van Glis EJM et al. Associations between pathogens in the upper

- respiratory tract of young children: interplay between viruses and bacteria. PLoS ONE .2012;7(10):e47711.doi:10.1371/journal.pone.0047711.
- van der Poll T and Opal. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. Lancet 2009;374:1543-56 110.
  - van der Windt D, Bootsma H, Burghout P, van der Gaast-de Jongh C, Hermans P, van der Flier M. Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* resists extracellular human neutrophil elastase- and cathepsin G-mediated killing. FEMS Immunol Med Microbiol 2012;66:445–448.
  - Van Deursen AMM, van Mens SP, Sanders EAM, Vlaminckx BJM, de Melker HE, Schouls LM *et al.* Invasive pneumococcal disease and 7-valent pneumococcal conjugate vaccine, the Netherlands. Emerg Infect Dis 2012; 18(11);1729-1737.
  - Van Effelterre T, Moore MR, Fierens F, Whitney CG, White L, Pelton SI, *et al.* A dynamic model of pneumococcal infection in the United States: implications for prevention through vaccination. Vaccine 2010;28(21):3650 –3660.
  - Vergison A, Dagan R, Arguedas A, Bonhoeffer J, Cohen R, Dhooge I, *et al.* Otitis media and its consequences: beyond the earache. Lancet Infect Dis 2010; 10;195-203.
  - Verkaik Nj, Nguyen DT, de Vogel CP, Moll HA, Verbrugh HA, Jaddoe VWV *et al.* *Streptococcus pneumoniae* exposure is associated with human metapneumovirus seroconversion and increased susceptibility to in vitro HMPV infection. Clin Microbiol Infect 2011;17(2):1840-1844.
  - Vila-Corcoles A, Ochoa-Gondar O. Preventing pneumococcal disease in the elderly. Recent advances in vaccines and implications for clinical practice. Drugs Aging 2013;30:263-276.
  - Vila M. y Bello S. Vacuna antineumococica: Indicaciones, momento y resultados. Arch. Bronconeumol 2004;40(3): 43-50.
  - von Gottberg A, de Gouveia L, Tempia S, Quan V, Meiring S, von Mollendorf C, *et al.* Effects of vaccination on invasive pneumococcal disease in South Africa. N Engl J Med 2014;371(20):1889-1899.
  - Waight PA, Andrews NJ, Ladhani SN, Sheppard CL, Slack MPE, Miller E. Effect of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on invasive pneumococcal disease

- in England and Wales 4 years after its introduction: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 2015. doi:10.1016/S1473-3099(15)70085-X.
- Walker CL, Rudan I, Liu L, Nair H, Theodoratou E, Bhutta ZA, *et al.* Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *Lancet* 2013;381(9875):1405-16.
  - Weinberger DM, Grant LR, Steiner CA, Weatherholtz R, Santoshem M, Vidouc C, *et al.* Seasonal drivers of pneumococcal disease incidence: impact of bacterial carriage and viral activity. *Clin Infect Dis* 2014;58(2):188-94. doi:10.1093/cid/cit721.
  - Weinberger DM, Bruden DT, Grant LR, Lipsitch M, O'Brien KL, Pelton SI, *et al.* Using pneumococcal carriage data to monitor postvaccination changes in invasive disease. *American Journal of Epidemiology* 2013;178(9):1488-95.
  - Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet* 2011;378(9807):1962–1973.
  - Weirner KED, Juneau RA, Murrah KA, Pang B, Ambruster CE, Richardson SH *et al.* Divergent mechanisms for passive pneumococcal resistance to B-lactam antibiotics in the presence of Haemophilus influenza. *J Infect Dis* 2011; 203(4):549-555. doi:10.1093/infdis/jiq087.
  - Welte T, Torres A, Nathwani D. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax* 2012;67;71-79.
  - Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison H, Lexau C, Reingold A *et al.* Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Eng J Med* 2000;343:1917-24.
  - WHO. Pneumococcal vaccines WHO position paper –2012–recommendations. *Vaccine* 2012;30(32):4717-8.
  - Wyres KL, Lambertsen LM, Croucher NJ, McGee L, von Gottberg A, Linares J *et al.* Pneumococcal capsular switching a historical perspective. *J Infect Dis* 2013;207(3):439-49.
  - Wolter N, Tempia S, Cohen C, Madhi SA, Venter M, Moyes J *et al.* High nasopharyngeal pneumococcal density, increased by viral coinfection, is associated with invasive pneumococcal pneumonia. *J. Infect Dis* 2014;210:10:1649-1657.

- Ziane H, Manageiro V, Ferreira E, Moura IB, Bektache S, Tazir M and Caniça M. Serotypes and Antibiotic Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Invasive Pneumococcal Disease and Asymptomatic Carriage in a Pre-vaccination Period, in Algeria. *Front. Microbiol* 2016;7:803. doi: 10.3389/fmicb.2016.00803.
- Zhou J, Isaacson-Schmid M, Utterson E, Todd E, McFarland M, Sivapalan J *et al.* Prevalence of nasopharyngeal pneumococcal colonization in children and antimicrobial susceptibility profiles of carriage isolates. *International Journal of Infectious Diseases* 2015;39 50–52.

*Anexos*

## ANEXO 1

## Acápite 3.1



**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL  
"PEDRO KOURÍ"**  
Ministerio de Salud Pública

**Centro Auspiciado por la UNESCO  
Centro Colaborador de la OMS/OPS**

Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica  
y control biológico de Vectores y huéspedes intermediarios  
Para el estudio de las Enfermedades Viricas  
En Tuberculosis y Micobacterias



**INSTITUTO  
Pedro Kourí**

**COMITÉ DE ETICA INSTITUCIONAL**

**PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CEI-IPK 32-15**

**" Serotipos y susceptibilidad a antimicrobianos de aislamientos nasofaríngeos e invasivos de  
*Streptococcus pneumoniae*, Cuba 2015"**

INVESTIGADOR PRINCIPAL

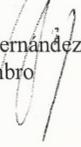
**Lic. Daniela Suárez Apaza**

Después de realizada la valoración y análisis correspondiente al presente proyecto de investigación por los integrantes del Comité de Ética de la institución, siguiendo las guías internacionales de trabajo de estas comisiones de la Organización Mundial de la Salud, emitimos el siguiente:

**DICTAMEN**

1. El documento presentado se ajusta a los principios establecidos por la Declaración de Helsinki así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba.
2. En el proyecto aparece reflejado de forma clara la forma de protección de los derechos y beneficios de los sujetos participantes en la investigación.
3. Se aprueba el proyecto presentado

Dado, en el IPK, Ciudad de La Habana, a los 3 días del mes de diciembre del año 2015

<p> DrC. Daniel González Rubio Presidente (PSR)</p> <p> DrC. Iliana Valdés Hernández Secretaria</p> <p> DrC. Ana Margarita Montalvo Alvarez Miembro</p>		<p> DrC. María C. Montalvo Villalva Miembro</p> <p> Dr. Roberto Fernández Llanes Miembro</p>
--	---	--

Teléfono (537) 202 0430 al 40 (pizarra) Teléfono (537) 202 0633; Fax: (537) 204 6051 Telex: 51 1902 CUIPK y 51 2341 CUIPK  
E-mail: ciipk@ipk.sld.cu, Dirección: Autopista Novia del Mediodía Km. 6 ½, Ciudad Habana, Cuba, P.O. Box: 601 Marianao 13



**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL  
"PEDRO KOURÍ"**

Ministerio de Salud Pública

**Centro Auspiciado por la UNESCO  
Centro Colaborador de la OMS/OPS**

Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica  
y control biológico de Vectores y huéspedes intermediarios  
Para el estudio de las Enfermedades Viricas  
En Tuberculosis y Micobacterias



INSTITUTO  
PEDRO KOURÍ

**CERTIFICACIÓN DE SEGURIDAD**

El que firma certifica que todas las actividades de investigación de esta solicitud, que involucra humanos, fueron examinados y aprobadas por el Comité de Ética del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", que se reunió en:

La Habana, Instituto Pedro Kourí, 3 de diciembre de 2015

(lugar y fecha)

El Comité de Ética estuvo formado por los siguientes miembros:

Nombre y Apellidos	Profesión	Cargo actual/ institución
DrC. Daniel González Rubio (Presidente PSR)	Médico (Clínico)	Invest. Auxiliar/IPK
DrC. Iliana Valdés Hernández (Secretaria)	Lic. Microbiología	Invest. Auxiliar/IPK
DrC. Ana Margarita Montalvo Alvarez	Lic Biología	Invest. Titular/IPK
DrC. María C. Montalvo Villalva	Médico (Inmunóloga)	Invest. Agregado/IPK
Dr. Roberto Fernández Llanes	Médico (Microbiólogo)	Invest. Auxiliar/IPK

Presidente del Comité de Ética Institucional (PSR)

Dr. Daniel González Rubio

Firma

Fecha

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

## ANEXO 2

## Acápites 3.1

1-Nombre(es)		Primer Apellido:		Segundo Apellido:		2-Carné de Identidad:		No.	
3- Dirección Particular:				4-Municipio:		5-Provincia:		6-Hist. Clínica:	
7-Edad:	8-Sexo: Masc. <input type="checkbox"/> Fem. <input type="checkbox"/>		9-Ocupación		10-Color de la piel: Blanca <input type="checkbox"/> Negra <input type="checkbox"/> Amarilla <input type="checkbox"/> Mestiza <input type="checkbox"/>			11-Días de ingreso	
12-Centro que Remite:			13-Sala	14-Municipio:		15-Provincia:		16-Fecha: Dia Mes Año	
17-Diagnóstico Clínico: _____					18-Tipo de Muestra colectada:			19-APP:	
20-Fecha de comienzo de los Síntomas: _____ Dia Mes Año					Suero <input type="checkbox"/> Sangre <input type="checkbox"/>			Enfermedad similar en la familia o comunidad:	
<u>21-GENERALES:</u>					LCR <input type="checkbox"/> Humor acuoso <input type="checkbox"/>			SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	
Fiebre <input type="checkbox"/> Mialgia <input type="checkbox"/> Cefalea <input type="checkbox"/> Linfadenopatía <input type="checkbox"/> Malestar General <input type="checkbox"/> Vómitos <input type="checkbox"/> Rash <input type="checkbox"/> Petequias <input type="checkbox"/>					Orina <input type="checkbox"/> Líquido amniótico <input type="checkbox"/>			Historia de viajes al exterior: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	
Diarreas <input type="checkbox"/> Artralgia <input type="checkbox"/> Esplenomegalia <input type="checkbox"/>					Gargarismo <input type="checkbox"/> Espujo <input type="checkbox"/>			País: _____	
Anorexia <input type="checkbox"/> Ictero <input type="checkbox"/> Hepatomegalia <input type="checkbox"/>					Heces <input type="checkbox"/>			Fecha llegada al país: _____	
Astenia <input type="checkbox"/> Escalofríos <input type="checkbox"/> Sangramiento <input type="checkbox"/>					Exudado <input type="checkbox"/> Cual _____			Dia Mes Año	
Dolor abdominal <input type="checkbox"/> Aumento de volumen de parótida <input type="checkbox"/>					Tejido <input type="checkbox"/> Cual _____			Tratamiento Previo: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	
<u>IRA:</u>					**Lámina de: _____			Cuál(es): _____	
Tos <input type="checkbox"/> Disnea <input type="checkbox"/> Expectorcación <input type="checkbox"/>					Cepa de: _____			Antecedente de vacunación PRS	
Laringitis <input type="checkbox"/> Faringitis <input type="checkbox"/> Rinorrea <input type="checkbox"/>					Fecha colecta muestra: _____			SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	
Otitis <input type="checkbox"/> Coqueluche <input type="checkbox"/> Amigdalitis <input type="checkbox"/>					Dia Mes Año			Fecha : _____	
Laringotraqueobronquitis <input type="checkbox"/> Estornudos <input type="checkbox"/>					22-Estudio solicitado: Diagnóstico <input type="checkbox"/>			Dia Mes Año	
Vacunación anti-Influenza <input type="checkbox"/>					Referencia <input type="checkbox"/>			Dia Mes Año	
<u>SNC:</u>					23-SUEROS PAREADOS				
Desorientación <input type="checkbox"/> Rigidez mucal <input type="checkbox"/> Convulsiones <input type="checkbox"/> Pérdida de conciencia <input type="checkbox"/> Trastornos de conducta <input type="checkbox"/> Dificultad en la marcha <input type="checkbox"/>					Fecha de colecta:				
<u>ITS:</u>					1 <sup>o</sup> Suero _____				
Secreción Genital <input type="checkbox"/> Lesión Genital <input type="checkbox"/>					Dia Mes Año				
<u>SEPSIS URINARIA:</u> Disuria <input type="checkbox"/>					2 <sup>o</sup> Suero _____				
Otros: _____					Dia Mes Año				
					Confirmatorio <input type="checkbox"/>				
					(Dengue)				
					Referencia <input type="checkbox"/>				
24- Nombre del Facultativo:									
25- RESULTADOS									

\*Para el envío de cepas solo se requieren los datos correspondientes a los acápites: 1, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 22, 24, 25.

## ANEXO 3

## Acápites 3.4

Factores requeridos para subtipificar los aislamientos de *S. pneumoniae* que pertenecen a los grupos más frecuentes y patrón de reactividad esperado.

## PNEUMOCOCCUS

## Key to pneumococcal factor antisera

Type <sup>1</sup>	Reactions in Factor serum				Antigenic form	Type <sup>1</sup>	Reactions in Factor serum				Antigenic form
6A	+	-	-	-	6a, 6b	19F	+	-	-	-	19a, 19b, 19d
6B	-	+	-	-	6a, 6c	19A	-	+	-	-	19a, 19c, 19d
6C	-	-	+	-	6a, 6d	19B	-	-	-	+	19a, 19c <sup>2</sup> , 19e, 7h
						19C	-	-	+	+	19a, 19c <sup>2</sup> , 19f, 7h
7F	+	-	-	-	7a, 7b	22F	+	-	-	-	22a, 22b
7A	+	+	-	-	7a, 7b, 7c	22A	-	+	-	-	22a, 22c
7B	-	-	+	-	7a, 7d, 7e, 7h						
7C	-	-	-	+	7a, 7d, 7f, 7g, 7h						
9A	-	+	-	-	9a, 9c, 9d	23F	+	-	-	-	23a, 23b, 18b
9L	+	-	-	-	9a, 9b, 9c, 9f	23A	-	+	-	-	23a, 23c, 15a
9N	+	-	+	-	9a, 9b, 9e	23B	-	-	+	-	23a, 23b <sup>f</sup> , 23d
9V	-	+	-	+	9a, 9c, 9d, 9g						
10F	+	-	-	-	10a, 10b	24F	-	+	-	-	24a, 24b, 24d, 7h
10A	-	+	-	-	10a, 10c, 10d	24A	+	+	-	-	24a, 24c, 24d
10B	+	+	-	-	10a, 10b, 10c, 10d, 10e	24B	-	-	+	-	24a, 24b, 24e, 7h
10C	+	-	+	-	10a, 10b, 10c, 10f						
11F	+	-	-	+	11a, 11b, 11e, 11g	25F	+	-	-	-	25a, 25b
11A	-	+	-	-	11a, 11c, 11d, 11e	25A	-	+	-	-	25a, 25c, 38a
11B	+	-	+	+	11a, 11b, 11f, 11g						
11C	+	+	+	-	11a, 11b, 11c, 11d, 11f						
11D	+	+	-	-	11a, 11b, 11c, 11e						
12F	+	-	-	-	12a, 12b, 12d	28F	+	-	-	-	28a, 28b, 16b, 23d
12A	-	+	-	-	12a, 12c, 12d	28A	-	+	-	-	28a, 28c, 23d
12B	+	+	+	-	12a, 12b, 12c, 12e						
15F	+	+	-	-	15a, 15b, 15c, 15f	32F	+	-	-	-	32a, 27b
15A	-	+	-	-	15a, 15c, 15d, 15g	32A	+	+	-	-	32a, 32b, 27b
15B	+	-	+	+	15a, 15b, 15d, 15e, 15h						
15C	-	-	+	-	15a, 15d, 15e						
16F	+	-	-	-	16a, 16b, 11d	33F	+	-	-	-	33a, 33b, 33d
16A	-	+	-	-	16a, 16c	33A	+	-	-	+	33a, 33b, 33d, 20b
						33B	-	-	+	-	33a, 33c, 33d, 33f
						33C	-	+	-	-	33a, 33c, 33e
						33D	-	-	+	+	33a, 33c, 33d, 33f, 6a
						35A	+	+	-	-	35a, 35b, 34b
17F	+	-	-	-	17a, 17b	35A	+	-	+	-	35a, 35c, 20b
17A	-	+	-	-	17a, 17c	35B	+	-	+	+	35a, 35c, 29b
						35C	+	-	+	+	35a, 35c, 20b, 42a
						41A	+	+	-	-	41a, 41b
18F	+	-	+	+	18a, 18b, 18c, 18e, 18f	41A	+	-	-	-	41a
18A	-	+	-	-	18a, 18b, 18d						
18B	-	-	+	-	18a, 18b, 18e, 18g						
18C	+	-	+	-	18a, 18b, 18c, 18c						
						47A	+	+	-	-	47a, 35a, 35b
						47A	+	+	-	-	47a, 43b

Vaccine types are indicated by boldface.

<sup>1</sup> *Streptococcus pneumoniae* type.

<sup>2</sup> Factor positive with some sera, but do not react with the currently distributed sera.

(+) Weak positive reaction.

2013 edition, June 2009 - 18/05/14



STATENS  
SERUM  
INSTITUT

prevents and controls  
infectious diseases,  
biological elements and  
congenital disorders

PNEUMOCOCCAL ANTISERA  
FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

Statens Serum Institut  
59 Diagnostic  
2 Hørsdalvej  
2450 Hillerød  
Denmark

Tel: +45 4820 9178  
Fax: +45 4820 9179  
serology@ssi.ssi.dk  
www.ssi.dk

Disponible en:

[http://www.ssi.dk/English/SSI%20Diagnostica/Products%20from%20SSI%20Diagnostica/Antisera\\_antibodies/Pneumococcus%20antiser/~media/Admin/Diagnostica%20Downloads/Downloads%20UK/Brochures/BrochurePneumococcus%20keys%206983018057.ashx](http://www.ssi.dk/English/SSI%20Diagnostica/Products%20from%20SSI%20Diagnostica/Antisera_antibodies/Pneumococcus%20antiser/~media/Admin/Diagnostica%20Downloads/Downloads%20UK/Brochures/BrochurePneumococcus%20keys%206983018057.ashx)

Statens Serum Institut, Copenhagen, Dinamarca

## ANEXO 4

## Acápite 3.5

**Procedimiento general de preparación de las placas de microdilución para la determinación de la CMI para todas las drogas, excepto la penicilina.**

**Vancomicina**

25 mL de la solución madre en agua destilada estéril a una concentración de 1280 µg/mL, partiendo de una droga con 101 µg/mg de potencia (110.1%).

$$1280 \mu\text{g/mL} \times V_1 = 16 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 125 \text{ mL}$$

Vancomicina (µg/mL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,007	CC
A												
B												
C												
D												
E	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
F												
G												
H												

CMI para la cepa patrón *S. pneumoniae* ATCC 49619: 0125 – 0,5 µg/mL

**Eritromicina**

25 mL de la solución madre a una concentración de 1280 µg/mL, partiendo de una droga con 670 µg/mg de potencia (67%), utilizando Etanol 95% como solvente y agua destilada estéril como diluyente.

$$1280 \mu\text{g/mL} \times V_1 = 16 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 125 \text{ mL}$$

Eritromicina (µg/mL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0.06	0.03	0.015	0.007	CC
A												
B												
C												
D												
E												
F	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
G												
H												

CMI para la cepa patrón *S. pneumoniae* ATCC 49619: 0,03 – 0,125 µg/mL

**Trimetoprim/Sulfametoxazol**

**Trimetoprim:** 25 mL de la solución madre a una concentración de 1 280 µg/mL, partiendo de una droga con 980 µg/mg de potencia (98%), utilizando ácido láctico 0.05 mol/L (cuidando no exceder el 10% del volumen final) como solvente y agua destilada estéril como diluyente.

$$1\ 280\ \mu\text{g/mL} \times V_1 = 64\ \mu\text{g/mL} \times 10\ \text{mL}$$

$$V_1 = 500\ \mu\text{L}$$

**Sulfametoxazol:** 25 mL de la solución madre a una concentración de 24 320 µg/mL, partiendo de una droga con 1 000 µg/mg de potencia (100%), utilizando medio volumen de agua destilada estéril con algunas gotas de NaOH 2,5 mol/L como solvente y agua destilada estéril como diluyente.

$$24\ 320\ \mu\text{g/mL} \times V_1 = 1\ 216\ \mu\text{g/mL} \times 10\ \text{mL}$$

$$V_1 = 500\ \mu\text{L}$$

Trimetoprim/Sulfametoxazol (µg/mL)

	1 32/ 608	2 16/ 304	3 8/ 152	4 4/ 76	5 2/ 38	6 1/ 19	7 0,5/ 9,5	8 0,25/ 4,75	9 0,125/ 2,3	10 0,06/ 1,1	11 0,03/ 0,55	12 CC
A	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
B	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
C	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
D	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
E	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
F	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
G												
H												

CMI para la cepa patrón *S. pneumoniae* ATCC 49619: 0,125/2,3 – 1//19 µg/mL

**Cloranfenicol**

25 mL de la solución madre a una concentración de 1 280 µg/mL, partiendo de una droga con 1 000 µg/mg de potencia (100%), utilizando Etanol 95% como solvente y agua destilada estéril como diluyente.

$$1\ 280\ \mu\text{g/mL} \times V_1 = 32\ \mu\text{g/mL} \times 10\ \text{mL}$$

$$V_1 = 250\ \mu\text{L}$$

	1 <b>16</b>	2 <b>8</b>	3 <b>4</b>	4 <b>2</b>	5 <b>1</b>	6 <b>0.5</b>	7 <b>0.25</b>	8 <b>0.125</b>	9 <b>0.06</b>	10 <b>0.03</b>	11 <b>0.015</b>	12 <b>CC</b>
A												
B												
C												
D												
E												
F	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
G												
H												

CMI para la cepa patrón *S. pneumoniae* ATCC 492619: 2 – 8 µg/mL

**Ceftriaxona**

25 mL de la solución madre en agua destilada estéril a una concentración de 1280 µg/mL, partiendo de una droga con 1 000 µg/mg de potencia (100 %).

$$1\ 280\ \mu\text{g/mL} \times V_1 = 8\ \mu\text{g/mL} \times 10\ \text{mL}$$

$$V_1 = 62,5\ \mu\text{L}$$

	1 4	2 2	3 1	4 0,5	5 0,25	6 0,125	7 0,06	8 0,03	9 0,015	10 0,007	11 0,003	12 CC
A												
B												
C												
D												
E												
F	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
G												
H												

CMI para la cepa patrón *S. aureus* ATCC 49619: 0,06 – 0,25 µg/mL