

DETECCIÓN DE LOS GENES *RRGC* Y *SRTC-3* CODIFICANTES DEL PILUS TIPO 1 Y SU DISTRIBUCIÓN EN CEPAS DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* RESISTENTES A LOS ANTIMICROBIANOS AISLADAS EN NIÑOS CON ENFERMEDAD INVASIVA DE LIMA, PERÚ.

Vanessa Rigo-Grisoni¹, Beatriz Quintero Moreno^{1,2}

¹Laboratorio de Microbiología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Mérida, Edo. Mérida 5101, Venezuela. Correo electrónico: v.rg2@hotmail.com, ²Departamento de Microbiología y Parasitología Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes. Mérida, Edo. Mérida 5101, Venezuela.

Resumen.

La aparición de cepas resistentes ha dificultado el tratamiento de las enfermedades neumocócicas invasivas en niños. Las vacunas polisacárido-conjugadas han mostrado ser una solución parcial y temporal, por lo que, actualmente los estudios van dirigidos a conocer otros componentes celulares que sirvan de blanco para vacunas, tales como el pilus tipo 1. En este estudio, la detección por PCR de los genes *rrgC* y *srtC-3* fue utilizada como indicador de la presencia de pilus 1, en 41 cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a los antimicrobianos, causantes de enfermedad invasiva en niños ≤ 10 años de Lima, Perú, entre los años 2006 y 2008. La frecuencia de pilus fue de 51%, siendo similar en cepas meníngeas versus no-meníngeas ($p=0.53$); entre cepas vacunales versus no-vacunales ($p=1.00$). En algunas cepas piliadas no fue posible detectar el gen *rrgC* o el gen *srtC-3*, sugiriendo que tales cepas podrían tener secuencias diferentes de las inicialmente descritas para estos genes. Por lo que en estudios epidemiológicos sería recomendable la detección combinada de más de un gen, evitando así la falta de reconocimiento de variantes genéticas de la isla de patogenicidad *rlrA*. Además, se encontró una elevada frecuencia de pilus 1 en cepas con serotipos no-vacunales (50%). Estos resultados sugieren que la adición de proteínas relacionadas con el pilus tipo 1 a las formulaciones vacunales polisacárido-conjugadas disponibles, podría ayudar a reducir el número de infecciones invasivas y la resistencia a los antimicrobianos relacionada con cepas de *S. pneumoniae* en niños de Lima, Perú.

Palabras clave: *Streptococcus pneumoniae*, pilus tipo 1, infecciones neumocócicas, serotipos, resistencia antimicrobiana.

Abstract

Detection of *rrgC* and *srtC-3* codifiers of pilus 1 type and its distribution in *Streptococcus pneumoniae* strains resistant to antimicrobials isolated from children with invasive disease in Lima, Peru.

The development of resistant strains has hampered the treatment of pneumococcal invasive diseases in children. The polysaccharide-conjugated vaccines have shown to be a partial and temporal solution, therefore the studies are now directed to know other cellular components targets for vaccines, such as pilus 1 type. In the present study, the detection for PCR of the genes *rrgC* y *srtC-3* was used as an indicator of pilus 1 presence in 41 strains of *Streptococcus pneumoniae* resistant to antimicrobials, causing invasive diseases in children up to ten years old in Lima, Peru, from 2006 to 2008. The frequency of pilus 1 was 51%, and was similar in both meningitis strains versus non-meningitis strains ($p=0.53$) and in vaccineable versus non-vaccineable strains ($p=1.00$). In some pilus strains it was not possible to detect either the gene *rrgC* or the gene *srtC-3*, suggesting that those strains might have different sequences from the initially described for these genes. Therefore it is recommended that in epidemiological studies the combine detection of more than one gene, avoiding the lack of knowledge of genetic variants of the pathogenicity island *rlrA*. It was found a high frequency of pilus 1 in strains with serotypes non-vaccineable (50%). Those results suggest that the addition of proteins related to pilus 1 type to the available polysaccharide-conjugated vaccineable formulations could help to reduce the number of invasive infections and the resistance to the antimicrobials related to strains of *S. pneumoniae* in Lima, Peru, children.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, pilus type 1, pneumococcal infections, serotypes, antimicrobial resistance.

INTRODUCCIÓN

Streptococcus pneumoniae, también conocido como neumococo, es considerado como el principal patógeno bacteriano productor de infección respiratoria aguda en la población infantil, especialmente en niños menores de dos años (O'Brien et al. 2009). Este patógeno, además de causar infecciones respiratorias, puede producir enfermedades invasivas como neumonía asociada con bacteriemia, septicemia y meningitis (Sandgren et al. 2004, Hausdorff et al. 2005, Sjöström et al. 2007). El aumento de los pacientes inmunocomprometidos, el incremento de la población mayor de 65 años y la aparición creciente de cepas de *S. pneumoniae* resistente a los agentes antimicrobianos se han relacionado con la alta incidencia de las infecciones neumocócicas observada en los últimos años (Lynch y Zhanel 2009). En este contexto, la evolución y la amplia distribución global de los determinantes de resistencia en las bacterias han generado que los neumococos con susceptibilidad disminuida a los antibióticos β -lactámicos sea un hallazgo común, dificultando de esta manera la conducta terapéutica de las infecciones producidas por este patógeno (Gouveia et al. 2011).

En Perú, la tasa de mortalidad en niños menores de cinco años, para el año 2008, fue del 15% (OMS 2010), mientras que sólo en la ciudad de Lima, la tasa general de fatalidad fue del 22.0% (Ochoa et al. 2010). La media anual estimada para las enfermedades neumocócicas invasivas en niños menores de 24 meses fue de 18.4/100000 y de 7.7/100000 en niños menores de 60 meses. Así mismo, las tasas de fatalidad por enfermedad se distribuyeron de la siguiente manera: meningitis

32.3%, neumonía 16.3% y sepsis 25.0% (Ochoa et al. 2010). Estas cifras resaltan la problemática que se vive en Perú y reflejan la necesidad de acción frente a enfermedades neumocócicas en países de condiciones similares, como lo es Venezuela.

Entre las medidas dirigidas a reducir la infección y la diseminación de neumococos resistentes, se encuentra la aplicación de vacunas proteína-polisacárido conjugadas (Gorrotategui e Iturrioz Mata 2010). Posterior al uso masivo de estas vacunas se ha apreciado una notable disminución en la frecuencia de enfermedades invasivas, diseminación de algunos serotipos y cepas de neumococos resistentes. Esto ha ocasionado el reemplazo de las cepas con serotipos vacunales, las clásicamente patógenas, por los neumococos de serotipos no incluidos en las vacunas. Este cambio del comportamiento de los neumococos ha sido estudiado tanto en los procesos de colonización como en la producción de enfermedad (Bogaert et al. 2004). En consecuencia, los avances en las investigaciones en este sentido se han dirigido a encontrar nuevos componentes celulares que funcionen como blancos para el diseño de nuevas vacunas neumocócicas (Pelton et al. 2007, Huang et al. 2009). Algunos estudios señalan que determinados grupos de proteínas, tales como las que conforman el pilus, especialmente las de tipo 1, podrían ser buenos modelos para la síntesis de nuevas vacunas (Gianfaldoni et al. 2007, Harfouche et al. 2011). Se ha reportado que este pilus tipo 1 juega un papel importante en los mecanismos de colonización, adhesión e invasión del microorganismo al hospedero humano (Barocchi et al. 2006).

En modelos experimentales de infección en ratón, se ha demostrado que las subunidades del pilus tipo 1

de *S. pneumoniae* pueden producir protección a la infección tanto por inmunización activa como pasiva. Las estructuras de este pilus están codificadas en un elemento cromosomal denominado isla de patogenicidad *rlrA*. Esta isla posee siete genes: tres estructurales, *rrgA*, *rrgB*, *rrgC* que codifican para las proteínas RrgA, RrgB y RrgC que conforman la estructura del pilus tipo 1, tres genes que codifican proteínas homólogas a las sortasas *srtC*-1,2 y tres (previamente conocidos como *srtB*, *C* y *D*, respectivamente) y un gen *rlrA*, que funciona como un probable regulador transcripcional (Mazmanian et al. 2001, Hava y Camilli 2002, Aguiar et al. 2008, LeMieux et al. 2008). Los genes *rrgC* y *srtC*-1, 2 y 3, son los mejores conservados (98-99%) entre las diferentes cepas de *S. pneumoniae* (Hava y Camilli 2002, Basset et al. 2007). Estos genes se consideran excelentes marcadores moleculares para la detección del pilus tipo 1 en estudios epidemiológicos (Moschioni et al. 2008, Muzzi et al. 2008).

No todas las cepas de *S. pneumoniae* poseen el pilus tipo 1. En general, la frecuencia de esta estructura es de un 30%, independientemente de que sean cepas que colonizan individuos asintomáticos o que causen enfermedades invasivas. Por otro lado, también se ha observado una variabilidad de la distribución del pilus tipo 1 en cepas de diferentes serotipos capsulares (Muzzi et al. 2008). La mayoría de los serotipos incluidos en la vacuna heptavalente (4, 6B, 9V, 14y 19F) y el serotipo no vacunal 19A, están frecuentemente relacionados con la presencia del pilus tipo 1. Por el contrario, los serotipos 1, 7F, 8, 12B, 18C y 23F tienen una baja incidencia de este pilus (Basset et al. 2007, Aguiar et al. 2008, Moschioni et al. 2008, Moschioni et al. 2010, Rodrigues de Aguiar 2011). El pilus tipo 1 es comúnmente detectado en cepas con resistencia a penicilina (Sjöstrom et al. 2007, Siira et al. 2009, Moschioni et al. 2010). Por ello se considera que la presencia del pilus tipo 1, podría conferir una ventaja adicional para la diseminación selectiva de cepas de *S. pneumoniae* resistentes por lo menos a los antibióticos β -lactámicos.

Es importante destacar que la escasez de estudios epidemiológicos en el nivel mundial hace difícil establecer la eficacia y cobertura potencial de una vacuna basada en proteínas del pilus tipo 1, para prevenir enfermedades neumocócicas invasivas y, por ende, disminuir la circulación de cepas con determinantes de resistencia en diferentes regiones geográficas. Por tal motivo, en este estudio se detectaron los genes *rrgC* y *srtC*-3, como indicadores de la presencia de pilus tipo 1 y se determinó la distribución en serotipos de *S. pneumoniae* resistentes a los antimicrobianos causantes de enfermedad invasiva en niños ≤ 10 años provenientes de Lima, Perú.

METODOLOGÍA.

Cepas bacterianas. De un total de 108 cepas provenientes de niños entre 3 meses y 10 años con enfermedad invasiva, que fueron atendidos en el Hospital Nacional "Cayetano Heredia" de Lima, Perú, durante el período abril 2006 a Junio 2008, se seleccionaron 41 cepas *S. pneumoniae* que presentaron por lo menos un marcador de resistencia. El promedio de edad de los pacientes atendidos fue de 2 años y 11 meses y se caracterizaron por no haber sido inmunizados con la vacuna conjugada heptavalente PCV-7 (Prevnam[®]; Wyeth). Estas cepas fueron enviadas para su estudio y análisis molecular al Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Reactivación de las cepas. Las cepas fueron preservadas en viales con 1 ml de leche descremada al 20% y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento. La reactivación se realizó inoculando 100 μ l de cada vial en tubos con 3 ml de caldo Todd Hewitt (OXOID[®]). Los tubos se colocaron en microaerofilia y se incubaron a 37°C. Luego de 48 horas, se tomaron 30 μ l de cada caldo Todd Hewitt y se colocaron en placas de agar Trypticase Soya (OXOID[®]) suplementado con 5% de sangre de carnero. Las placas se incubaron en microaerofilia a 37°C por 24 a 48 horas. Se utilizó el taxo de optoquina (5 μ g) (BBLTM) como prueba preliminar para asegurar la presencia del microorganismo en estudio.

Estudio microbiológico. El aislamiento y la identificación inicial de las cepas se realizó siguiendo los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud (2004) por el Grupo Peruano de Investigación en Neumococo (GPIN), Lima, Perú. Los serotipos capsulares se determinaron mediante la reacción de Quellung, utilizando los antiseros del Statens Serum Institute de Copenhagen, Dinamarca. Se consideraron serotipos vacunales aquellos incluidos en la formulación de la vacuna heptavalente: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F.

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. La susceptibilidad a los agentes antimicrobianos se determinó mediante la prueba de difusión en disco para los siguientes antibióticos: clindamicina, tetraciclina, vancomicina y rifampicina. La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) en caldo fue determinada para penicilina, eritromicina, ceftriaxona, cloranfenicol y trimetoprim/sulfametoxazol. En todas las pruebas de susceptibilidad se utilizó la cepa control *S. pneumoniae* ATCC 49619, así como las recomendaciones y puntos de corte sugeridos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2012). Se consideró como fenotipos de multirresistencia todas aquellas cepas que

presentaron resistencia por lo menos a tres antibióticos de grupos diferentes.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en el presente estudio.

Gen	Tamaño Amplicón	Oligonucleótido original	Secuencia 5min- 3min	Referencias
lytA	319 pb	681-701 999-978	CAACCGTACAGAATGAAGCGG TTATTCGTGCAATACTCGTGCG	Nagai et al., 2001
rrgC	360 pb	pQE30C5 pQE30C3	ATCAGGATCCGCTCTGTGTTTTTCTCTTGTATGG ATCCGCATGCATCAATCCGTGGTCGCTTGTTATTTTA	Basset et al. 2007
srtC-3	469 pb	TTM301	ACTTGTTGATGTTGGTAGCCTGTT	

Tabla 2. Distribución de serotipos capsulares de las cepas de *S. pneumoniae* productoras o no de infección meningea. NT: No Tipificable

Serotipos <i>S. pneumoniae</i>	Cepas meningea		Cepas no meningea		Total cepas	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
6A	-	-	2	10	2	4.88
6B	3	14.28	5	25	8	19.51
14	6	28.57	2	10	8	19.51
19A	2	9.52	2	10	4	9.75
19F	5	23.81	4	20	9	21.95
23F	3	14.28	3	15	6	14.63
34	1	4.76	-	-	1	2.44
NT	1	4.76	2	10	3	7.32
TOTAL	21	100	20	100	41	100

Tabla 3. Frecuencia de resistencia a los antimicrobianos en cepas de *S. pneumoniae* causantes de enfermedad neumocócica invasiva.

Antibióticos	Cepas de <i>S. pneumoniae</i>						<i>p</i> *
	Meningeas (n=21)		No meníngneas (n=20)		Total cepas		
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Trimetoprim/Sulfa metoxazol	20	54	17	45	37	90	0.34
Tetraciclina	11	42	15	58	26	62	0.20
Eritromicina	10	40	15	60	25	59	0.11
Penicilina	18	78	5	22	23	56	0.0001
Clindamicina	6	43	8	57	14	33	0.52
Ceftriaxona	10	77	3	23	13	31	0.04
Cloranfenicol	4	40	6	60	10	24	0.48
Multirresistencia	14	56	10	44	24	59	0.35

* Nivel de significancia $p \leq 0.05$

Estudios Moleculares.

Extracción de ADN genómico. Cada cepa fue inoculada en una placa de agar tripticasa soya con 5% de sangre de carnero que se incubó en microaerofilia a 37 °C. Luego de 24 horas, se

recolectó el crecimiento de toda la placa, se suspendió en 100µl de agua destilada estéril en un tubo eppendorf estéril y se sometió a ebullición por 20 minutos. Se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos y posteriormente se colocó el sobrenadante, que contenía el ADN bacteriano, en dos tubos eppendorf estériles que se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento.

Identificación genética de *S. pneumoniae*. Antes de iniciar los estudios genéticos fue necesario corroborar la identificación microbiológica de todas las cepas en estudio. Para ello se determinó por amplificación de PCR el gen *lytA*. Los iniciadores, mezcla y condiciones de amplificación se llevaron a cabo según lo descrito por Nagai et al. (2001) (Tabla 1). En esta prueba se utilizó como control positivo el ADN de la cepa *S. pneumoniae* ATCC₄₉₆₁₉ y como controles negativos, la mezcla de reacción sin ADN y el ADN de la cepa *E. coli* ATCC₂₅₉₂₂. Estos ensayos permitieron determinar la calidad de ADN obtenido para los siguientes ensayos.

Detección de los genes *rrgC* y *srtC-3* codificantes del pilus tipo 1. La presencia del pilus tipo 1 en las cepas estudiadas fue determinada mediante la amplificación por PCR de los genes *rrgC* y *srtC-3*. Los iniciadores se describen en la tabla 1 y las condiciones de amplificación utilizadas fueron las descritas por Basset et al. (2007). La detección de uno o ambos genes se consideró como una prueba positiva para la presencia del pilus tipo 1. La cepa I-248 (pilus 1+) fue utilizada como control positivo y como controles negativos, la mezcla sin ADN y la cepa I-2 (pilus 1-).

Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System2400 y la visualización de los amplicones se realizó mediante corridas electroforéticas en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (Sigma)) 0.5 mg/ ml y fotografiados a través del

sistema UVP Biodoc-It System. Como marcador del tamaño molecular se utilizó una escalera de 1 kb (BIONEER).

Análisis estadístico. El procesamiento estadístico se realizó utilizando el Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 15.0. Los resultados fueron analizados mediante la aplicación del Chi-Cuadrado (X^2) y las variables fueron consideradas con significancia estadística cuando la $p \leq 0,05$.

RESULTADOS.

Las 41 cepas de *S. pneumoniae* estudiadas se aislaron de niños con enfermedad neumocócica invasiva. De estos casos, 51% (21/41) tuvieron diagnóstico de meningitis y 49% (20/41) presentaron enfermedades no meníngeas (Tabla 2); de estas, 14 cepas se aislaron de niños con neumonía bacteriémica, 4 con peritonitis y 2 con sepsis (datos no mostrados).

La distribución de los serotipos capsulares entre las 41 cepas de *S. pneumoniae* estudiadas fue: 19F, 21.95% (9); 6B, 19.51% (8); 14, 19.51% (8); 23F 14.63% (6); 19A, 9.75% (4); 6A, 4.88% (2) y 34, 2.44% (1). Tres cepas a las que no se les pudo identificar el serotipo con los antisueros disponibles, se clasificaron como no tipificables (NT) (Tabla 2). El 76% (31/41) de las cepas presentó algunos de los serotipos vacunales: 6B, 14, 19F y 23F. No hubo distinción en la distribución de los serotipos entre las cepas causantes o no de enfermedad meníngea, excepto en el caso donde el serotipo 6A no se detectó entre el grupo de cepas causantes de meningitis y el serotipo 34 en las productoras de enfermedad no meníngea.

La frecuencia de resistencia a los antimicrobianos fue la siguiente: penicilina 56% (23/41), ceftriaxona 31% (13/41), eritromicina 59% (25/41), clindamicina 33%

(14/41), tetraciclina 62% (26/41), trimetoprim/sulfametoxazol 90% (37/41) y cloranfenicol 24% (10/41). Todas las cepas fueron sensibles a rifampicina y vancomicina (datos no mostrados). La multirresistencia se observó en el 59% (24/41) de las cepas (Tabla 3). En general, la frecuencia de resistencia a los distintos antimicrobianos fue similar entre los pacientes con meningitis y con enfermedad no meníngea (rango: $p=0.11-0.52$). No obstante, la resistencia a penicilina y ceftriaxona fue mayor en niños con enfermedad meníngea ($p=0.0001$ y $p=0.04$, respectivamente) que en niños con enfermedad no meníngea. La frecuencia de resistencia a los antimicrobianos fue similar entre los serotipos vacunales y no vacunales ($p=1.00$) (datos no mostrados).

La presencia de los genes *rrgC* y *srtC-3* codificantes del pilus tipo 1 se pudo verificar mediante amplificaciones de PCR en las que se obtuvo bandas del tamaño correspondiente a cada gen: 360 pb para el gen *rrgC* y 469 pb para el gen *srtC-3*. La distribución de la detección de los genes *rrgC* y *srtC-3* codificantes del pilus tipo 1 fue: 51% de las cepas (21/41) presentó pilus tipo 1, dado por la detección de los dos genes *rrgC* y *srtC-3* o por la presencia de uno de ellos. De este grupo, a 11 cepas (26.82%) se les detectaron ambos genes *rrgC* y *srtC-3*, mientras que la presencia individual de estos, se determinó en 5 cepas para cada gen (24.38%).

La detección negativa de pilus tipo 1 correspondió a la ausencia de ambos genes y fue observado en 49% de las cepas estudiadas (20/41). La distribución de la presencia de pilus tipo 1 de acuerdo con los serotipos de *S. pneumoniae* y cepas meníngeas y no meníngeas se muestran en la tabla 4. En 11 cepas se detectaron ambos genes, en 5 cepas pertenecientes a los serotipos 6A, 6B, y 23F se

Tabla 4. Distribución de los genes *rrgC* y *srtC-3* codificantes del pilus tipo i de acuerdo con serotipos de *S. pneumoniae* y cepas invasivas meníngeas y no meníngeas.

Serotipo	Cepas de <i>S. pneumoniae</i> meníngeas				Cepas de <i>S. pneumoniae</i> no meníngeas			
	Presencia de pilus tipo 1		Ausencia		Presencia de pilus tipo 1		Ausencia	
	<i>rrgC</i>	<i>srtC-3</i>	n/N (%)	n/N (%)	<i>rrgC</i>	<i>srtC-3</i>	n/N (%)	n/N (%)
6A	-	-	-	-	1	0	1/2 (50.0)	1/2 (50.0)
6B	1	0	1/8 (12.5)	2/8 (25.0)	2	0	2/8 (25.0)	3/8 (37.5)
14	4	5	5/8 (62.5)	1/8 (12.5)	0	1	1/8 (12.5)	1/8 (12.5)
19A	0	0	0/4 (0.0)	2/4 (50.0)	2	2	2/4 (50.0)	0/4 (0.0)
19F	2	3	3/9 (33.3)	2/9 (22.2)	0	1	1/9 (11.1)	3/9 (33.3)
23F	2	1	2/6 (33.3)	1/6 (16.7)	0	1	1/6 (16.7)	2/6 (33.3)
34	0	0	0/1 (0.0)	1/1 (100.0)	-	-	-	-
NT	1	1	1/3 (33.3)	0/3 (0)	1	1	1/3 (33.3)	1/3 (33.3)
TOTAL	10	10	12/41 (29.2)	9/41 (21.9)	6	6	9/41 (21.9)	11/41 (26.8)

Tabla 5. Distribución de los genes *rrgC* y *srtc-3* codificantes del pilus tipo 1 en cepas de *S. pneumoniae* de acuerdo a los patrones de resistencia.

Nº de marcadores de resistencia	n/N (%)	Perfil de resistencia	Genes <i>rrgC</i> y <i>srtc-3</i> codificantes del pilus tipo 1	
			Presencia n/N (%)	Ausencia n/N (%)
Un antibiótico	3/41 (7.32)	TET	1/41 (2.44)	2/41 (4.88)
Dos antibióticos	10/41 (24.39)	PEN-SXT	2/41 (4.88)	1/41 (2.44)
		SXT-TET	3/41 (7.32)	1/41 (2.44)
		ERY-SXT	1/41 (2.44)	2/41 (4.88)
Tres antibióticos	9/41 (21.96)	PEN-ERY-SXT	1/41 (2.44)	0 (0.0)
		PEN-CRO-SXT	2/41 (4.88)	3/41 (7.32)
		ERY-CHL-SXT	1/41 (2.44)	0 (0.0)
		ERY-SXT-TET	1/41 (2.44)	1/41 (2.44)
Cuatro antibióticos	5/41 (12.20)	ERY-CHL-CLI-TET	0 (0.0)	1/41 (2.44)
		ERY-SXT-CLI-TET	0 (0.0)	2 /41 (4.88)
		PEN-CRO-CHL-SXT	0 (0.0)	1/41 (2.44)
		PEN-CRO-ERY-SXT	1/41 (2.44)	0 (0.0)
Cinco antibióticos	8/41 (19.51)	PEN-ERY-SXT-CLI-TET	4/41 (9.75)	0 (0.0)
		ERY-CHL-SXT-CLI-TET	1/41 (2.44)	1/41 (2.44)
		PEN-CRO-ERY-SXT-TET	0 (0.0)	1/41 (2.44)
		PEN-ERY-CHL-SXT-TET	0 (0.0)	1/41 (2.44)
Seis antibióticos	5/41 (12.22)	PEN-CRO-ERY-CHL-SXT-TET	0 (0.0)	1/41 (2.44)
		PEN-CRO-ERY-SXT-CLI-TET	3/41 (7.32)	0 (0.0)
		PEN-ERY-CHL-SXT-CLI-TET	0 (0.0)	1/41 (2.44)
Siete antibióticos	1 /41 (2.44)	PEN-CRO-ERY-CHL-SXT-CLI-TET	1/41 (2.44)	0 (0.0)

PEN: penicilina, CRO: ceftriaxona; ERY: eritromicina; CHL: cloranfenicol; CLI: clindamicina; SXT: Trimetoprim/sulfametoxazol; TET: tetraciclina.

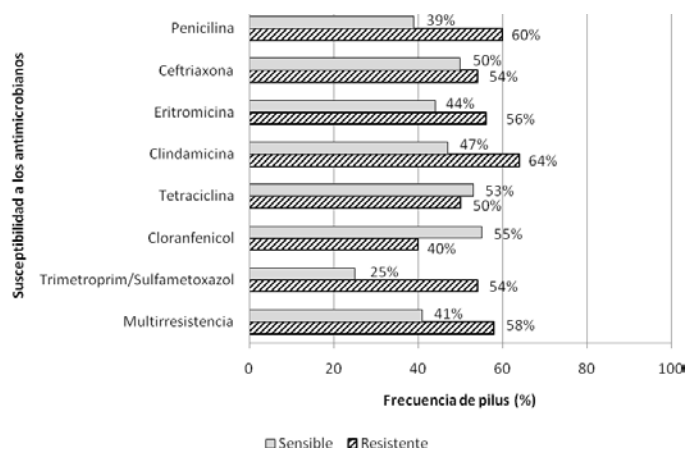


Fig. 1. Frecuencia de los genes *rrgC* y *srtc-3* codificantes del pilus tipo 1 en cepas de *S. pneumoniae* de acuerdo a sus perfiles de resistencia a los antimicrobianos.

encontró solamente el gen *rrgC* y en otras 5 cepas pertenecientes a los serotipos 14, 19F y 23F se detectó solamente el gen *srtc-3*.

Aunque la frecuencia del pilus tipo 1 fue mayor en niños con meningitis que en niños con enfermedades no meníngeas (57% y 45% respectivamente) esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.537$). La frecuencia del pilus tipo 1 fue similar entre los serotipos vacunales con un 52% (16/31) y no vacunales con un 50% (5/10) ($p=1.00$).

La frecuencia del pilus tipo 1 entre las cepas de *S. pneumoniae* varió dependiendo de su resistencia a los antimicrobianos (Fig. 1). La presencia de pilus tipo 1 fue considerablemente mayor en las cepas con resistencia a clindamicina (64%), penicilina (60%), eritromicina (56%), ceftriaxona y trimetoprim/sulfametoxazol (ambas con 54%), mientras que en las cepas susceptibles a estos antibióticos, el pilus tipo 1 se determinó en una frecuencia que osciló entre un 39% y 50%. En los *S. pneumoniae* con fenotipo multirresistente, la distribución del pilus tipo 1 superó en un 17% lo observado en las cepas sensibles. En ninguno de los casos se encontró significancia estadística ($p=0.214$).

1.000). Es importante destacar que las cepas estudiadas se distribuyeron con mayor proporción en perfiles de resistencia que comprendieron entre 2 y 6 marcadores diferentes. Además, en todos estos perfiles, excepto en la combinación de cuatro resistencias, se determinó la presencia de pilus tipo 1 en la mayoría de las cepas (tabla 5).

DISCUSIÓN.

La introducción y uso masivo de la vacuna neumocócica heptavalente en varias regiones del mundo, ha traído como consecuencia el predominio de los serotipos no vacunales, que expuestos a la presión selectiva ejercida por los agentes antimicrobianos, han desarrollado diversos mecanismos de resistencia. Este hecho redujo el impacto preventivo de la vacunación y provocó la circulación cada vez más frecuente de cepas resistentes capaces de producir enfermedades neumocócicas invasivas, en especial la meningitis (Bogaert et al. 2004, Sandgren et al. 2004, Klugman y Welsh 2005).

Debido a las altas tasas de secuelas y mortalidad, los niños con meningitis neumocócica deben tratarse rápidamente con una terapéutica empírica adecuada. En los países en desarrollo, la penicilina y la ceftriaxona se encuentran entre los antimicrobianos más utilizados en este tipo de infección (Gouveia et al. 2011). En el presente estudio se encontró un predominio de cepas resistentes a tales antimicrobianos, especialmente las meníngeas con serotipos incluidos o no en la vacuna heptavalente. Además, la mayoría de las cepas estudiadas presentaron fenotipos de resistencia complejos donde la asociación de marcadores involucró más de tres tipos de antibióticos diferentes. Este hecho hace suponer una mayor incidencia de fracasos de la terapéutica antimicrobiana inicial, así como destaca la necesidad de mejorar o ampliar la prevención proporcionada por la vacuna neumocócica basada en polisacáridos, de manera que se pueda reducir efectivamente la morbilidad y las posibles secuelas causadas por esta enfermedad.

Las investigaciones apuntan hacia la búsqueda de posibles blancos bacterianos para el diseño de nuevas vacunas neumocócicas. Barocchi et al. (2006) propusieron que las proteínas del pilus tipo 1 podían representar un blanco novedoso para el desarrollo de vacunas antineumocócicas efectivas. En estudios posteriores, Moschioni et al. (2008) y Muzzi et al. (2008) señalaron que en la isla de patogenicidad *rlrA* se encuentran los genes *rrgC* y *srtC-3*, los cuales se consideran los mejor conservados (98-99%) entre las diferentes cepas de *S. pneumoniae*, los que podrían ser utilizados como marcadores moleculares ideales para conocer la frecuencia y distribución del pilus tipo 1 en estudios epidemiológicos, además de

señalar a estos genes como el punto de partida para el diseño y desarrollo de nuevas vacunas (Muzzi et al. 2008).

En este estudio la frecuencia de pilus tipo 1, establecida como la detección cualquiera de los dos genes *rrgC* y/o *srtC-3* fue de 51%, mucho más alta que la obtenida por la detección separada de cualquiera de los dos genes (39%) y cerca del doble de la frecuencia reportada en estudios previos (20.5% a 30.6%) (Basset et al. 2007, Aguiar et al. 2008, Moschioni et al. 2010, Rodrigues de Aguiar 2011). Las características de las cepas reportadas hasta ahora son diferentes puesto que incluyen cepas colonizadoras y cepas susceptibles a los antimicrobianos, mientras que la colección de cepas de Perú proviene de niños con enfermedades invasivas y con, al menos, un marcador de resistencia. Esta diferencia en la producción de enfermedad y en la capacidad de resistencia podría explicar la elevada frecuencia obtenida.

Es importante destacar que si bien la detección de *rrgC* y/o *srtC-3* no se observó uniformemente en todas las cepas analizadas, es probable que las cepas piliadas pudieran tener secuencias para estos genes puntualmente diferentes a las inicialmente descritas y con las cuales se elaboraron los oligonucleótidos utilizados. Esta posible diversidad de secuencias en los genes *rrgC* y/o *srtC-3* podrían ser consecuencia de los fenómenos de recombinación genética intra e interespecies que ocurren frecuentemente en *S. pneumoniae* y que le confieren una amplia diversidad genética a este género bacteriano. De manera que no es de sorprender que en el grupo de 5 cepas pertenecientes a los serotipos 6A, 6B, y 23F se detectara el gen *rrgC*, pero no el gen *srtC-3*. Lo mismo fue observado en otras 5 cepas con serotipos 14, 19F y 23F en las que se encontró el gen el gen *srtC-3*, pero no el gen *rrgC*. Estos hallazgos permiten recomendar la detección combinada de más de un gen codificante del pilus tipo 1, con el objeto de evitar la falta de reconocimiento de variantes genéticas de la isla de patogenicidad *rlrA*.

La confirmación de las posibles variantes genéticas de los genes *rrgC* y *srtC-3*, requiere de estudios de secuenciación y análisis molecular. Esto ofrecería la posibilidad de diseñar nuevos oligonucleótidos que proporcionarían una mayor cobertura para la detección de cepas piliadas en poblaciones de *Streptococcus* con alta diversidad clonal.

En esta investigación se obtuvo una frecuencia del pilus tipo 1 del 50% en los serotipos no vacunales. En la actualidad, existe soporte científico sobre el potencial efecto protector del pilus tipo 1 durante el proceso de infección (Gianfaldoni et al. 2007, Harfouche et al. 2011). Por lo tanto, la creación de una vacuna que incluya el pilus de tipo 1 añadido a los serotipos aislados con mayor frecuencia podría

prevenir cerca del 50% de los casos de enfermedad neumocócica invasiva por serotipos aun no cubiertos por ninguna vacuna.

En general, la frecuencia del pilus tipo 1 en cepas de *S. pneumoniae* colonizadoras es similar a la frecuencia encontrada en cepas invasivas y varía entre 20.5% y 30.6% (Basset et al. 2007, Aguiar et al. 2008, Moschioni et al. 2010, Rodrigues de Aguiar 2011). Las cepas analizadas en este estudio provenían de pacientes solo con enfermedad invasiva, estas mostraron una gran variedad de fenotipos de resistencia que incluyeron desde un marcador de resistencia hasta resistencia a casi todos los antibióticos probados. Esta característica se observó en cepas con detección positiva al pilus tipo 1, lo que explicaría la alta frecuencia encontrada (51%). Estudios previos coinciden con los hallazgos obtenidos en esta investigación en relación con el pilus tipo 1 y su frecuencia en cepas con resistencia a los antimicrobianos. Así por ejemplo, Moschioni et al. (2008) reportaron una mayor frecuencia de pilus tipo 1 entre cepas resistentes a penicilina (51%) eritromicina (53%) y tetraciclina (41%) que en las cepas susceptibles a esos antimicrobianos (21%, 23% y 32% respectivamente).

En conclusión, este es el primer estudio, a nuestro conocimiento, en documentar la presencia y distribución de los genes *rrgC* y *srtC-3* codificantes del pilus tipo 1 en cepas de *S. pneumoniae* causantes de enfermedad invasiva en Perú y Latinoamérica. Los resultados obtenidos demostraron que la detección combinada de más de un gen codificante del pilus tipo 1 podría evitar la falta de reconocimiento de variantes genéticas de la isla de patogenicidad *rlrA*. A su vez, se encontró una elevada frecuencia de pilus tipo 1 en cepas con serotipos no vacunales (50%) y resistentes a los antimicrobianos (51%). Por lo tanto, la adición de proteínas relacionadas con el pilus tipo 1 a las formulaciones vacunales polisacárido-conjugadas disponibles, podría ayudar a reducir el número de infecciones invasivas y a la circulación de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a los antimicrobianos en la población infantil de alto riesgo, especialmente en países con recursos limitados como Perú y otros que comparten similitudes socio-económicas y epidemiológicas como Venezuela.

REFERENCIAS.

Aguiar SI, Serrano I, Pinto FR et al. 2008. The presence of the pilus locus is a clonal property among pneumococcal invasive isolates. *BMC Microbiology*, 8: 1 - 11.

Barocchi MA, Ries J, Zogaj X et al. 2006. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *PNAS*, 103: 2857 - 2862.

Basset A, Trzcinski K, Hermos C et al. 2007. Association of the pneumococcal pilus with certain capsular serotypes but not with increased virulence. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 1684 - 1689.

Bogaert D, de Groot R, Hermans P. 2004. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 4: 144 - 154.

CLSI. 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. *CLSI documento M100-S22*, 32: 1 - 188.

Gianfaldoni C, Censini S, Hillerlingmann M et al. 2007. *Streptococcus pneumoniae* pilus subunits protect mice against lethal challenge. *Infection and Immunity*, 75: 1059 - 1062.

Gorrotxategui Gorrotxategui P, Iturrioz Mata A. 2010. Vacuna conjugada contra el neumococo. ¿Es una prevención universal adecuada de la enfermedad neumocócica? *Revista Pediatría de Atención Primaria*, 12: 443 - 455.

Gouveia EL, Reis JN, Flannery B et al. 2011. Clinical outcome of pneumococcal meningitis during the emergence of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: an observational study. *BMC Infectious Diseases*, 11: 323 - 333.

Harfouche C, Filippini S, Gianfaldoni C et al. 2012. RrgB321, a Fusion Protein of the Three Variants of the Pneumococcal Pilus Backbone RrgB, Is Protective In Vivo and Elicits Opsonic Antibodies. *Infection and Immunity*, 80: 451 - 460.

Hausdorff WP, Felkin DR, Klugman KP. 2005. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect Dis*, 5: 83 - 93.

Hava DL, Camilli A. 2002. Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Molecular Microbiology*, 45: 1389 - 1405.

Huang SS, Hinrichsen VL, Stevenson AE et al. 2009. Continued impact of pneumococcal conjugate vaccine on carriage in young children. *Pediatrics*, 124: e1 - e11.

Klugman KP, Welsh KJ. 2005. Nasopharyngeal carriage of pneumococcal pediatric serotypes: a risk for acute and recurrent otitis media in children and for invasive disease in susceptible adults. *The Journal of Infectious Diseases*, 191: 1790 - 1792.

LeMieux J, Woody S, Camilli A. 2008. Roles of the Sortases of *Streptococcus pneumoniae* in Assembly of the RlrA Pilus. *Journal of Bacteriology*, 190: 6002 - 6013.

Lynch JP, Zhanel GG. 2009. *Streptococcus pneumoniae*: does antimicrobial resistance matter? *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 30: 210 - 238.

Mazmanian SK, Ton-That H, Schneewind O. 2001. Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 40: 1049 - 1057.

- Rigo-Grisoni et al. 2014. *Streptococcus pneumoniae*, infecciones neumocócicas, niños con enfermedad invasiva. *MedULA* 23: 9-17.
- Moschioni M, Donati C, Muzzi A et al. 2008. *Streptococcus pneumoniae* contains 3 rlrA pilus variants that are clonally related. *The Journal of Infectious Diseases*, 197: 888 - 896.
- Moschioni M, Emolo C, Biagini M et al. 2010. The two variants of *Streptococcus pneumoniae* pilus-1 RrgA adhesin retain the same function and elicit cross-protection in vivo. *Infection and Immunity*, 78: 5033 - 5042.
- Muzzi A, Moschioni M, Covacci A et al. 2008. Pilus operon evolution in *Streptococcus pneumoniae* is driven by positive selection and recombination. *PLoS ONE*, 3: e3660 - e3670.
- Nagai K, Shibasaki Y, Hasegawa K et al. 2001. Evaluation of PCR primers to screen for *Streptococcus pneumoniae* isolates and B-lactam resistance, and to detect common macrolide resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48: 915-918.
- O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP et al. 2009. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *The Lancet*, 374 (9693): 893 - 902.
- Ochoa T J, Egoavil M, Castillo M E et al. 2010. Invasive pneumococcal diseases among hospitalized children un Lima, Peru. *Revista Panamericana Salud Pública*, 28: 121 - 127.
- Organización Mundial de la Salud. 2004. *Programa de vigilancia de los serotipos y resistencia antimicrobiana de Streptococcus pneumoniae y Haemophilus influenzae* (4 ed.). Colombia.
- Organización Mundial de la Salud. 2010. *Estadísticas Sanitarias Mundiales*. Organización Mundial de la Salud.
- Pelton SI, Huot H, Finkelstein JA et al. 2007. Emergence of 19A as virulent and multidrug resistant pneumococcus in Massachusetts following universal immunization of infants with pneumococcal conjugate vaccine. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 26: 468 - 472.
- Rodrigues De Aguiar SI. 2011. *Molecular epidemiology of Streptococcus pneumoniae: impact of the PCV7 in the pneumococcal population responsible for invasive pediatric infections*. Tesis Doctoral, Universidad de Lisboa, Facultad de Medicina, Lisboa.
- Sandgren A, Sjöström K, Olsson-Liljequist B et al. 2004. Effect of clonal and serotype-specific properties on the invasive capacity of *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Infectious Diseases*, 189: 785 - 796.
- Siira L, Rantala M, Jalava J et al. 2009. Temporal trends of antimicrobial resistance and clonality of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Finland, 2002 to 2006. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53: 2066 - 2073.
- Sjöström K, Blomberg C, Fernebro J et al. 2007. Clonal success of pilated penicillin nonsusceptible pneumococci. *PNAS*, 104: 12907 - 12912.

Recibido: 12 enero 2013 Aceptado: 15 julio 2014

MedULA en Internet

Usted puede acceder y descargar todos los contenidos de la revista **MedULA**, a texto completo con figuras a todo color, desde algunas de las siguientes páginas de la Web, entre otras: www.saber.ula.ve/medula; www.latindex.org; www.periodica.org; www.doaj.org; www.freemedicaljournals.com; www.fj4d.com; <http://dialnet.unirioja.es/servlet/extrev?codigo=7642>; www.portalesmedicos.com; <http://web5.infotrac.galegroup.com>; www.ebsco.com; www.monografias.com; www.imbiomed.com; www.indexcopernicus.co