

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS DE *Streptococcus pneumoniae* DE AISLAMIENTOS INVASIVOS EN NUEVO LEÓN, MÉXICO”

Por

SANDRA GABRIELA GALINDO ALVARADO

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA**

Febrero 2017

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS DE *Streptococcus pneumoniae* DE AISLAMIENTOS INVASIVOS EN NUEVO LEÓN, MÉXICO”

Aprobación de la tesis:



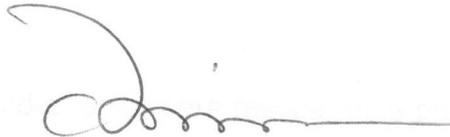
Dr. Pedro Alberto Hernández Rodríguez
Director de tesis



Dr. Antonio Alí Pérez Maya
Co- director de tesis



Dr. Med. Javier Ramos Jiménez
Jefe del Servicio de Infectología



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

A Dios, en un principio por la vida y por permitirme llegar a éste momento, por todas las adversidades y bendiciones que ha puesto en mi camino.

A mi padre y a mi madre quienes han estado ahí en todo momento para apoyarme, celebrar mis triunfos y compartir mis tristezas, por ustedes he llegado hasta aquí.

A mis hermanas Lety y Miryam que son ejemplo de perseverancia, amor y que siempre están para mí cuando las he necesitado.

A Alberto que es una parte muy importante de este proyecto y en mi vida, por su apoyo profesional y personal en todo momento, incondicional, quien me inspira a ser mejor cada día, te amo.

Al Dr. Pedro quien es un ejemplo a seguir, gracias por todo.

Al Dr. Alí por ser mi co-director para realizar este proyecto.

A mi familia, abuelos, tías, tíos y primos por estar siempre pendiente de mis avances en el ámbito profesional.

A mis amigos, especialmente a Hiram y Rey, gracias por ser parte de mi vida y compartir conmigo cada momento.

A los nuevos amigos que he encontrado en el camino, especialmente a la Dra. Verónica Bravo quien me compartió su tiempo y su experiencia, así como al Dr. Rogelio Treviño quienes me tendieron su mano y me apoyaron para culminar este proyecto.

Gracias.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I	Página
1. RESUMEN	1
Capítulo II	
2. INTRODUCCIÓN.	3
2.1 Epidemiología.	3
2.2 Factores de riesgo.	4
2.3 Patogénesis y estructura.	5
2.4 Cuadro Clínico.	7
2.5 Diagnóstico de Laboratorio.	9
2.6 Tratamiento.	12
2.7 Resistencia antimicrobiana.	12
2.7.1 Macrólidos.	13
2.7.2 Betalactámicos.	14
2.7.3 Fluoroquinolonas.	14
2.7.4 Tetraciclinas.	15
2.7.5 Rifampicina.	15
2.7.6 Cloranfenicol.	15
2.7.7 Trimetoprim/Sulfametoxazol.	16
2.7.8 Oxazolidinonas.	16
2.8 Vacunación.	16
2.8.1 Vacuna polisacárida neumocócica.	16
2.8.2 Vacuna conjugada neumocócica.	17

2.9 Efecto después de la vacunación.	19
2.10 Vacunación en México.	19
2.11 Mortalidad.	20
2.12 Futuro.	21
Capítulo III	
3. ANTECEDENTES	23
Capítulo IV	
4. OBJETIVOS	25
Capítulo V	
5. MATERIAL Y MÉTODOS	26
Capítulo VI	
6. RESULTADOS.	32
Capítulo VII	
7. DISCUSIÓN	36
Capítulo VIII	
8. CONCLUSIÓN	38
Capítulo IX	
10. BIBLIOGRAFÍA	40
Capítulo X	
11. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Características demográficas	33
2. Características moleculares y evolución de los pacientes.	35

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Susceptibilidades a antibióticos de las cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	34

LISTA DE ABREVIATURAS

ACIP: Advisory Committee on Immunization Practices

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

CO₂: dióxido de carbono

LCR: Líquido cefalorraquídeo

MIC: Concentración mínima inhibitoria

MLST: Tipificación de secuencia de Multilocus

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PCV7: Vacuna conjugada 7 valente

PCV10: Vacuna 10 valente

PCV13: Vacuna 13 valente

PPSV23: Vacuna 23 valente polisacárida

RNA: Ácido ribonucleico

rRNA: Ácido ribonucleico ribosomal

ST: Secuencia tipo

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

CAPÍTULO I

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. El *Streptococcus pneumoniae* es una bacteria Gram positiva de forma lanceolada, se observa en pares o cadenas cortas; la infección por neumococo representa una alta morbilidad y mortalidad.

La transmisión es por vía respiratoria por medio de gotas. La enfermedad neumocócica se puede dividir en invasiva y no invasiva. La enfermedad neumocócica invasiva es una infección confirmada por el aislamiento en cultivo de *Streptococcus pneumoniae* en sitios estériles. Hay varios métodos de diagnóstico, desde cultivo hasta pruebas moleculares. En el ámbito preventivo, después del inicio de la vacunación en México hubo una disminución de neumonía neumocócica y de enfermedad invasiva, así como cambio en los serotipos de neumococo que colonizan, ya que la enfermedad parte de una persona colonizada. Es importante conocer la distribución de serotipos para dirigir la vacunación en un futuro, y esto lo podemos hacer por medio de secuenciación del genoma de *Streptococcus pneumoniae* al obtener secuencias tipo de cada cepa y así analizar la epidemiología internacional.

MATERIAL Y MÉTODOS. Obtener ADN genómico bacteriano a partir de cepas que se encuentran en el cepario de Infectología, ya sea por medio de un kit de

extracción o por método manual modificado, para posteriormente realizar secuenciación del genoma de *Streptococcus pneumoniae* y de ahí obtener la secuencia tipo de cada cepa.

RESULTADOS. Se obtuvo material genético de 7 aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* a las que se les realizó secuenciación del genoma para obtener la secuencia tipo. El diagnóstico más común fue bacteriemia, el serotipo más frecuente fue el 19A. Las secuencias tipo que se obtuvieron fueron: ST2613, ST3936, ST156, ST 320 (en 3 cepas) Y ST81.

CONCLUSIONES. Se deben realizar más estudios moleculares de este tipo para analizar la epidemiología molecular de las cepas de neumococo y así desarrollar nuevas estrategias para prevención, por medio de las vacunas, así como analizar el comportamiento de las cepas y las opciones terapéuticas con las que se puede obtener un tratamiento exitoso.

CAPITULO II

INTRODUCCIÓN

El *Streptococcus pneumoniae* (neumococo) es una bacteria Gram positiva de forma lanceolada, extracelular, anaerobio facultativo que frecuentemente se observa en pares o cadenas cortas(1)(2); es una infección con alta morbi-mortalidad, con 40,000 casos de enfermedad invasiva cada año.(3)

Fue aislado por Sternberg(4) e independientemente por Pasteur en 1881(5) de la saliva de un paciente con rabia, y él mismo describió la cápsula como un halo. La primera vez que se asoció la neumonía lobar con el neumococo fue en 1883 por Friedlander y Talamon, y en 1884 se relacionó mejor con el empleo de la tinción de Gram.(1)

2.1 Epidemiología

La transmisión es por vía respiratoria por medio de gotas y por autoinoculación en personas colonizadas, (1) el neumococo existe solamente en la faringe de los humanos.(6)

Colonización es el aislamiento de *Streptococcus pneumoniae* que no desarrolle enfermedad clínica.(5)

La enfermedad neumocócica invasiva es una infección confirmada por el aislamiento de *Streptococcus pneumoniae* en sitios estériles, como meningitis o

bacteriemia; y la no invasiva es infección de sitios no estériles. Los serotipos que más frecuentemente causan enfermedad invasiva son el 1,4,5,7F, 8,12F,14,18C Y 19A.(6) Los 10 serotipos más frecuentes causan enfermedad invasiva en un 62%. (1)

2.2 Factores de riesgo

factores que incrementan el riesgo de colonización son: menores de 2 años (deficiencia IgG2)(5), hacinamiento, exposición a humo de tabaco, asistir a guarderías, la falta de lactancia e invierno. En los países en desarrollo se puede observar colonización en el primer mes de vida, por el contrario en los países desarrollados a los 2 o 3 años de edad. Solo del 5 al 10% de los adultos están colonizados.(7)

Hay condiciones que aumentan el riesgo para enfermedad invasiva, como: cáncer hematológico, VIH, asplenia funcional o anatómica, enfermedad renal, cardiopatía crónica, enfermedad pulmonar, hepatopatía, fumadores y pacientes con implante coclear, (1) hipogamaglobulinemia, deficiencia del complemento(C3b), síndrome nefrótico, diabetes, malignidades no hematológicas.(5)

En la infección por VIH se aumenta hasta 40 veces más el riesgo de enfermedad invasiva.(5)

2.3 Patogénesis y estructura

La colonización nasofaríngea es el primer paso para desarrollar enfermedad por neumococo; ésta depende de la edad, el ambiente, infecciones respiratorias y el tipo de población.(7) La inmunidad en mucosas está presente

desde los 6 meses de edad. (8)

Se ha sugerido que la disminución en la colonización de *Streptococcus pneumoniae* se asocia con un incremento en la colonización por *Staphylococcus aureus*, ya que el peróxido de hidrógeno del neumococo interfiere con el crecimiento del *Staphylococcus aureus*.(8) Frecuentemente hay más de un serotipo de neumococo colonizando la nasofaringe junto con *H. influenzae*, *M. catarrhalis* y comensales.(9)

Los componentes por los que causa enfermedad son la cápsula y la pared celular.(1) Los polisacáridos capsulares son unidades repetidas de hasta 8 residuos de sacáridos y algunas veces tienen sustituciones con O-acetilfosfolícerol y piruvil acetal. La mayoría de las cápsulas neumocócicas son aniónicas, lo cual ayuda a prevenir la limpieza de moco, presentan repulsión electrostática. Las cápsulas que no están cargadas son la 7A, 7F, 14, 33F, 33A Y 37; el serotipo 14 puede formar un hidrogel, el serotipo 1 tiene carga positiva y negativa. (4)

La cápsula es importante para la patogenicidad, así como para evadir fagocitosis, (1)(4) no produce respuesta inflamatoria. Su importancia es por la generación de anticuerpos y que su virulencia está dada por los serotipos de la capsula.(5)

La pared celular lleva a los leucocitos al sitio de infección, induce producción de citosinas y la cascada procoagulante; los cambios en las proteínas de unión a penicilina da como resultado la resistencia a β -lactámicos.(5)

Otras proteínas de superficie son la neumolisina, proteína intracelular

que es citotóxica y forma poros, además de activar la vía del complemento.(5)(10), la adhesina A para adhesión al epitelio, proteína A de unión a colina interactúa con el receptor Ig polimerico e incrementa la migración a través de la mucosa, proteasa de IgA1 que incrementa la adherencia en presencia de IgA y la neuraminidasa disminuye la viscosidad del moco.(8)

La conversión de colonización a enfermedad es por la generación de factores inflamatorios, (8)por lo que se puede requerir una infección viral previa(5), ya que hay cambios en el ambiente, disponibilidad de nutrientes, temperatura y concentraciones de iones. (11)(12)

Un serotipo es definido como la cepa de neumococo que produce un polisacárido con estructura química única; y un serogrupo agrupa a todos los serotipos que tienen características serológicas comunes, que tienen reacción cruzada. Hay dos esquemas que clasifican los serotipos, el Americano y el Danés. (4) hasta el día de hoy se han descrito 97 serotipos y 46 serogrupos(10).

La principal razón para serotipificar es desarrollar vacunas,(4) ya que se desarrollan anticuerpos para cada tipo capsular en particular, éstos junto con el complemento interactúan para opsonizar al neumococo, se puede observar reacción cruzada en los anticuerpos, (1)además que activan la vía clásica del complemento. (8) (4). Los serotipos provocan una respuesta diferente a la generación de anticuerpos, y los serotipos que son menos inmunogénicos pueden ser más virulentos.

Hay variantes del serotipo 19A que se originaron de cambios en el serotipo 19F. (13)

2.4 Cuadro clínico

Se pueden dividir en enfermedad invasiva y no invasiva o infección mucosa.(1)(14)

Enfermedad invasiva:

Neumonía: es la presentación clínica más frecuente, es la causa más común de neumonía adquirida en la comunidad. (5) El periodo de incubación es de 1 a 3 días. Sus síntomas son fiebre, dolor pleurítico, tos productiva, disnea, taquipnea, taquicardia,(1)cuando se asocia a diarrea fulminante se llama colitis croupous. Raramente causa cavitación pulmonar o infección necrozante, el serotipo 1 y 3 es más frecuente en neumonía y el 3 es el más relacionado con necrosis. (5)(6)(15)

Bacteriemia: el 25 a 39% de los pacientes con neumonía presentan bacteriemia(16); (1). Neumonía bacteriémica es la causa más común de enfermedad invasiva, llegando al 90% de los casos. (17)(18) Se ha estimado que la mortalidad en neumonía bacteriémica es de un 15 a 26% de los casos, y en adultos mayores puede llegar hasta un 60%.(19)

Síndrome de Austrian es una entidad con meningitis, neumonía y endocarditis, la destrucción valvular es el principal factor pronóstico del síndrome, y se han documentado focos metastásicos como meningitis, neumonía, artritis y compromiso ocular. (20)(21)

En México los aislamientos en sangre son 20.4% en menores de 5 años y en mayores de 50 años un 14.8%. (22)

Meningitis: el 50% de los casos de meningitis es por neumococo, sus síntomas son, cefalea, letargia, irritabilidad, fiebre, vomito, rigidez de nuca,

crisis convulsivas y coma.(1)En México el neumococo es la principal causa de meningitis después de la amplia cobertura con la vacuna para *Haemophilus influenzae* tipo B. (23) Para el diagnóstico antes de hacer una punción lumbar se realiza una tomografía de cráneo para descartar lesiones ocupativas; se diagnostica con pleocitosis, hipogluorraquia, proteínas elevadas y cultivo de líquido cefalorraquídeo positivo. Otros estudios son tinción de Gram, aglutinación en látex, prueba de antígeno por inmunocromatografía y PCR; el tratamiento es de 10 a 14 días, con riesgo de recurrencia del episodio del 5%. (24) En México se reporta un 15.7% de los aislamientos de neumococo en meningitis en menores de 5 años y un 11.1% en mayores de 50 años. En menores de 5 años el serotipo más frecuente es el 19A con una resistencia a penicilina en un 100%, y en mayores de 5 años el serotipo es el 3 y el 15B con 66% de resistencia en este último. (22)sin embargo aún falta información reciente, un registro completo así como vigilancia completa.

Los serotipos más frecuentemente relacionados con meningitis son el 6,10 y 23. (15)

Alrededor del mundo el serotipo más frecuente de enfermedad invasiva es el 14. (15)(25)

2.5 Diagnóstico de laboratorio

Se requiere el aislamiento de *Streptococcus pneumoniae* de sangre o de otros sitios normalmente estériles, además existen pruebas para detectar polisacáridos capsulares.(1)

Se deben tomar cultivos antes de iniciar antibioticoterapia, en el cultivo en agar sangre o agar chocolate crece entre 18 a 24 hrs y se observan colonias

pequeñas, grisáceas y mucoides rodeadas de una zona verde que indica la α hemolisis. Las colonias jóvenes se ven levantadas y a las 24 a 48 hrs el centro se deprime, posteriormente se realizan las pruebas de optoquina y de solubilidad en bilis, el neumococo es susceptible a ambas pruebas, para obtener mejores resultados se deberá incubar con CO₂ al 5%. (7)

En la prueba de susceptibilidad a optoquina(ethylhidrocupreína), si tienen una zona de inhibición >14mm es positivo, si está entre 9 a 13mm se realiza la prueba de solubilidad en bilis, es positivo al detectar lisis celular.(26)

La reacción de Quellung se describió en 1902 por Neufeld (4), y consiste en la reacción que se produce al unirse un anticuerpo tipo específico al polisacárido capsular del neumococo, causando un cambio en el índice refractivo. Las cepas se tiñen con azul de metileno rodeadas de un halo que representa el borde externo de la cápsula.(26)

Al realizar las pruebas de susceptibilidad en aislamientos no-meningitis una concentración mínima inhibitoria (MIC) de <0.06 μ g/ml (o zona de oxacilina \geq 20mm) son susceptibles a beta lactámicos. (27)

La composición de la superficie de la bacteria tiene 2 fases, la opaca y la transparente. La opacidad de las colonias de neumococo alteran su habilidad para colonizar, al aumentar el polisacárido capsular,(28) la fase opaca predomina en las bacteriemias, ya que producen más biopelícula y son más invasivas para pulmón y cerebro; (29)(2) con la formación de biopelícula se puede evadir la respuesta inmune y favorece la diseminación del neumococo.(11)

La sensibilidad del cultivo de expectoración es de 40-50%, si se obtiene una buena muestra hasta un 93%. Y se solicitan en la neumonía adquirida en la comunidad cuando están en UCI o que fallan al tratamiento.(5)

En líquido cefalorraquídeo la sensibilidad de la tinción de Gram es de 90%,(24)y del PCR es de 79 a 100%, la desventaja de PCR es que no se tienen datos de susceptibilidad ni del subtipo bacteriano.

La sensibilidad de la aglutinación en látex es de 59-100%. En la prueba de antígeno por inmunocromografía es sensible de un 95-100%, con especificidad del 100%, aunque tiene falsos positivos.(24)Los hemocultivos pueden ser positivos en meningitis en un 75% si se realiza antes del inicio de antibióticos, si ya se iniciaron disminuye un 20%. (24)

Hay otras pruebas que se pueden realizar como prueba rápida de antígeno ya sea aglutinación en latex o inmunoensayo enzimático; así como antígeno inmunocromatográfico urinario del cual su blanco es el polisacárido C del *Streptococcus pneumoniae*, y tiene una sensibilidad del 70.5%. (5)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método utilizado en neumonías con una sensibilidad en muestra de sangre del 29 al 100%, y en meningitis la identificación en líquido cefalorraquídeo (LCR) de 92 a 100 %. (7)

En pruebas moleculares se utilizan algunos blancos como el gen de la autolisina, el gen de adhesión a la superficie, y el fragmento del gen spn9802. Puede aumentar la sensibilidad hasta el 62% en hemocultivos. (30)

Hay algunos métodos moleculares que históricamente han sido importantes en la epidemiología de la enfermedad como el tipificación de secuencia de multilocus (MLST en inglés) en el cual se secuencian 7 genes

como variación genómica y se usan para definir la secuencia tipo (ST en inglés)(31)(32), utilizando el MLST se mostró el grado de recombinación que es 10 veces más alto que el grado de mutación(33); otro método es el gel de electroforesis de campos pulsados lo cual distingue la base de restricción de la digestión de su DNA genómico.(32)(34)

2.6 Tratamiento

En neumonía se utilizan antibióticos beta lactámicos por sus altas concentraciones en pulmón , amoxicilina es uno de los antibióticos de primera elección; si tiene cavitación neumatocele o empiema requiere ceftriaxona y vancomicina.(7)

En meningitis el tratamiento se debe administrar intravenoso para alcanzar concentraciones adecuadas en suero y LCR, en las guías internacionales de manejo de esta patología(24) se inicia vancomicina y ceftriaxona o cefotaxima, esto debido a las altas tasas de resistencia, al inicio se necesitan altas dosis de vancomicina 70mg/kg/día (por su pobre penetración) , además de dexametasona en una dosis de 0.15mg/kg cada 6 horas por 2 a 4 días, aplicada 10 a 20 minutos antes de la primera dosis de antibiótico. (7)los esteroides pueden aumentar la resistencia porque disminuyen la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica a vancomicina, (5)sin embargo los ajustes se realizan con el resultado de cultivo y sus sensibilidades.

2.7 Resistencia antimicrobiana

Se observaron en 1912, infecciones por neumococo resistente a optoquina en el laboratorio y 5 años después en humanos. Posteriormente en 1932 resistente a sulfonamidas; hasta 1965 se observó resistencia a penicilinas;

(13)el primer caso de resistencia a penicilina se detectó en Australia y Nueva Guinea. (5)

Neumococo multidrogoresistente es definido como cepas resistentes a tres o más clases de antibióticos. (13)

En Europa se han descrito aislamientos con neumococo multidrogoresistente en las cepas 19A, 14, 1, 19F y 23 F; mientras que en Estados Unidos los serotipos son 15A, 15B, 15C, 6C, 23A y 35B. Los aislamientos de 19A tienen MICs más altos para beta-lactámicos, macrólidos, lincosamidas, tetraciclinas y trimetoprim-sulfametoxazol.(13)

En enero del 2008 se hicieron cambios en los puntos de corte para susceptibilidad a penicilina, ya que se dividieron las infecciones en meningitis y no meningitis.(13)

Existen factores de riesgo asociados a infecciones resistentes que son: la edad (<5 años y adultos mayores de 65 años) , hospitalizaciones, género femenino, trabajar en guarderías, inmunosupresión, serotipos pediátricos, uso previo de antibióticos (especialmente betalactámicos); y en VIH se agrega la estancia hospitalaria en el último año y tratamiento para tuberculosis. (13)

2.7.1 Macrólidos

Los macrólidos inhiben la producción de factores de virulencia del neumococo y tienen propiedades antiinflamatorias, mediado por neutrófilos así como inhibir la producción de superóxido. Son microbiostáticos al unirse al 23S rRNA de la subunidad ribosomal 50S; la resistencia es mediada por la modificación del blanco y del flujo externo. La modificación del blanco se lleva a cabo por la metilación del 23S rRNA que es codificado por el gen *erm(B)*; y las

bombas de flujo externo las cuales son mediadas por los genes *mef(A)*, *mef(E)*, *mef(I)* (13)

2.7.2 Betalactámicos

En 1967 se detectó por primera vez resistencia a betalactámicos. La resistencia es debido a combinaciones de proteínas de unión a penicilina alteradas que disminuyen la afinidad por este antibiótico. De 1979 a 1987 se aislaron cepas resistentes en un 5% y en 1999 se aislaron 25.1%. (13)

En neumococo se han reportado 6 proteínas de unión a penicilina(PBP): 1a,1b, 2x, 2a, 2b y 3(35). La resistencia está dada por una alteración en la proteínas de unión a penicilina: PBP2b, PBP2x, PBP1a,; esto sucede al afectarse la polaridad, la distribución de cargas y la disminución de la afinidad de la penicilina al sitio activo. Otros mecanismos de resistencia es la inactivación del gen *murM*.

2.7.3 Fluoroquinolonas

Es el antibiótico de primera elección en la neumonía adquirida en la comunidad, se han reportado bajas tasas de resistencia. El blanco de las fluoroquinolonas son la DNA girasa y la topoisomerasa IV(36); su mecanismo de resistencia es por alteración del blanco y bomba de flujo externo. La resistencia mediada por la alteración del blanco es por mutaciones en la región determinante de resistencias de quinolonas del *gyr(A)*, y la DNA topoisomerasa IV con el gen *par(C)*; la bomba de flujo externo se observa más frecuentemente en moléculas pequeñas como ciprofloxacino, y se ha ligado a los genes *patA* y *patB*.(13) los factores de riesgo relacionados a resistencia son el uso previo de fluoroquinolonas, ser adulto mayor y dependiendo del área geográfica. (5)

2.7.4 Tetraciclinas

Son bacteriostáticos, la resistencia ocurre al proteger a la subunidad ribosomal bacteriana 30S, por medio de los genes *tet(M)* y *tet(O)* principalmente, (13) sin embargo también se relacionan el *tet(K)* y *tet(L)* en menor proporción(37).

2.7.5 Rifampicina

El uso de rifampicina mas beta lactámicos o vancomicina está recomendado para el tratamiento de *Streptotoccus pneumoniae* multidrogoresistente, los aislamientos resistentes se reportan hasta en 1.5%. La resistencia es debido a alteraciones en el gen *rpoB* que codifica a la subunidad β de la polimerasa de RNA. (13)(38)

2.7.6 Cloranfenicol

La resistencia se da por la inactivación enzimática por la producción de acetiltransferasa de cloranfenicol, codificada en el gen *cat*.(13).Hay dos tipos de *cat*, el tipo A y el B, el A codifica para *catQ*. (39)

2.7.7 Trimetoprim/sulfametoxazol

La resistencia a trimetoprim es el resultado de una sustitución del aminoácido Ile100 por LEU, en la proteína Dihidrofolato reductasa codificada por *folA*; y la resistencia a sulfonamidas es por mutaciones de inserción de los codones en el gen *folP* que codifica para la Dihidropteroato sintasa. (13)(38)(40)(41)

2.7.8 Oxazolidinonas

Linezolid bloquea la síntesis proteica al unirse a la subunidad 50S, las resistencias son raras, y son por las deleciones en el gen *rplD*.(13)

Se ha descrito la tolerancia a antibióticos, es descrita como la habilidad de una bacteria para sobrevivir, pero no se observa el crecimiento al contar con antibiótico, y esto se traduce en falla al tratamiento.(13)

2.8 Vacunación

El desarrollo de vacunas inició en 1911,(1) al realizarse un estudio en jóvenes sudafricanos que trabajaban en una mina de oro, esta vacuna de células enteras disminuía la incidencia de neumonía de un 25 a 50%.(4)

2.8.1 Vacuna polisacárida neumocócica

Se produjeron dos vacunas hexavalentes en 1946 pero se suspendieron al observar el éxito con antibióticos.

La primer vacuna autorizada fue en 1977 en Estados Unidos, contenía el antígeno polisacárido capsular purificado de 14 diferentes serotipos; en 1983 se autoriza la vacuna 23 valente polisacárida (PPSV23), llamada así por la cantidad de serotipos que contiene y que causan del 60 al 76% de enfermedad invasiva. El desarrollo de anticuerpos es de 80% en adultos sanos, y entre 2 a 3 semanas después de la vacunación. (1) la PPSV23 tiene limitaciones, como la poca inmunogenicidad en menores de 2 años y la pobre efectividad en la neumonía no bacteriémica, en enfermedad invasiva en enfermos crónicos y mayores de 75 años, además de que no prevenía la colonización ni infecciones en mucosas, las concentraciones de anticuerpos son bajas en las dosis subsecuentes(4);tiene un 80% de eficacia en bacteremias en mayores de 65años a los 3 años(42).

2.8.2 Vacuna conjugada neumocócica

La primera conjugada es la 7 valente (PCV7) fue autorizada en el 2000; esta vacuna contiene polisacárido capsular purificado de 7 serotipos de neumococo (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F Y 23F) conjugada con una toxina variante de difteria no tóxica (CRM197).PCV7 redujo la enfermedad invasiva de los serotipos contenidos en la vacuna en un 97%. (1)Es más inmunogénica.(5)

En la vacuna 10 valente (PCV10) cada serotipo se conjuga con una de tres proteínas transportadoras, (18C al toxoide tetánico, 19F a toxoide diftérico, y el resto a proteína D (Haemophilus influenzae no tipificable)), esta vacuna no se autorizó en Estados Unidos.

Posteriormente, en el 2010 se autoriza la 13 valente (PCV13) que contiene los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F Y 23F, con indicación en niños de 2 a 59 meses, en 3 dosis rutinariamente a los 2, 4 y 6 meses de edad , un booster es recomendado a los 12 a 15 meses de edad; en 2011 la PCV13 fue aprobada con una dosis para la prevención de neumonía y enfermedad invasiva en mayores de 50 años, ya que 20-25% de los casos de enfermedad invasiva son potencialmente prevenibles. (1)

Los serotipos que no están incluidos en la vacuna PCV13 tienen un bajo potencial para desarrollar enfermedad invasiva. Hay un estudio de España acerca de vacunación con PCV13 en el que se refuerza la necesidad de introducir la vacuna de forma universal.(43)

Se han realizado estudios en donde se observó la eficacia de la vacuna PCV13 en adultos mayores de 65 años para neumonía adquirida en la comunidad y neumonía bacteriémica.(44)

Según la ACIP (Advisory Committee on Immunization Practices) actualmente se recomienda una dosis de PCV13 seguida de una dosis de PPSV23 en todos los adultos ≥ 65 años quien no ha recibido vacuna o en personas ≥ 2 años de edad con alto riesgo; y el intervalo entre cada vacuna es: en ≥ 65 años inmunocompetentes es de ≥ 1 año, en ≥ 65 años inmunocomprometidos es después de 8 semanas, los pacientes ≥ 65 años que hayan recibido primero PPSV23 se deben esperar ≥ 1 año y aplicarse la PCV13. (45)

En 2014 la vacuna contra neumococo fue introducida en 117 países, 14 países más que en 2013. La cobertura global se encontraba en 31%, el porcentaje de cobertura es de 83% en América, 50% África y 2% en la región Oeste del pacífico. (46)

2.9 Efecto después de la vacunación

Después de la introducción de PCV7 la incidencia de los serotipos que no están incluidos en la vacuna aumentó, tales como el 3, 6C, 7F, 15B/15C y 19A.

PCV13 tuvo baja efectividad con el serotipo 3. Hubo una disminución de neumonía neumocócica y de enfermedad invasiva no solo en niños si no en adultos, ya que los no vacunados fueron protegidos por la reducción de colonización en niños. Se observa el efecto de reemplazos de serotipos al aplicar la PCV13 que no se observa con la PSSV23.(4)

LA CDC reportó que en 2001, se disminuyó el número de casos e promedio de 24.3 por 100,000 personas a 17.3 por 100,000 personas después de la vacunación. (7)

Es por eso que el personal de salud juega un rol importante para incentivar a la población, y esto solo se puede hacer teniendo información actualizada y teniendo la actitud para identificar a individuos con factores de riesgo(47).

2.10 Vacunación en México

México fue el primer país en Latinoamérica en introducir la PCV7(48) en el 2006 en 58 municipios(49), por lo que se considera que fue en el 2007. (23)(50), sin embargo fue incluida en el programa de vacunación universal en el 2008, y en abril del 2011 es sustituida por la PCV13(49) Los estudios de prevalencia se han realizado principalmente en niños en nuestro país, y lo que se observó en 2014 es que se incrementó la frecuencia del serotipo 19A después de la introducción de PCV7 y aumento en la resistencia bacteriana, es importante tomar en cuenta que los cambios en la distribución de los serotipos se observan al año de introducir la vacuna (49)

La enfermedad invasiva fue evaluada en un hospital pediátrico por 6 años y se obtuvieron 156 aislamientos , se encontraron 27 serotipos, y los más frecuentes fueron 23F, 6A, 19F, 6B, 14, 9V, 19A, 5 y 11D, un 59% están incluidos en PCV7, 68.6% en PCV10 y 81.4% en PCV13; se ha observado la protección por la vacuna que incrementa de 40% con PCV7 a 88% con PCV13(51).

Se realizó un estudio en mayores de 50 años en México, y se observó que PCV13 es segura y en inmunocompetentes se obtuvo una muy alta respuesta inmune.(52)

En cuanto a colonización la PCV7 no disminuye el porcentaje de colonización para todos los serotipos, pero hay un reemplazo de serotipos(53).

2.11 Mortalidad

La mortalidad asociada a enfermedad invasiva neumocócica es del 5% al 35%(54)(55); en neumonía es del 5 al 7%, en bacteriemias del 20 hasta el 60% y en meningitis es de un 8% en niños y de un 22% a 44.2% en adultos, (1)(5) aun con tratamiento los pacientes fallecen por complicaciones.(56)

2.12 Futuro

Durante muchos años se han buscado datos acerca de la epidemiología tanto local como internacional de patógenos relacionados con enfermedades de gran importancia, para entender su comportamiento y las características del patógeno en cuestión (57); el neumococo es una de las bacterias que se ha estudiado por medio de técnicas moleculares para identificar grupos clonales y establecer así su epidemiología(58).

Dentro de la tecnología más actual encontramos la tipificación de secuencia de multilocus (*MLST*), las variaciones en los diferentes *locus* se detectan de forma directa por secuenciación del ADN en fragmentos de genes seleccionados (siete es el número de genes en los que se basa el esquema de *MLST* para las diferentes especies bacterianas en las que se ha desarrollado) permitiendo la identificación de grupos de microorganismos con genotipos

idénticos (clones) o altamente relacionados (líneas clonales). El proceso de selección de genes debe ser realizado para cada especie bacteriana.(57)

En el caso de neumococo se han descrito clonas que se relacionan con enfermedad invasiva, además de tener importancia por su asociación con resistencia a antibióticos.(57)

Enright et al son de los primeros en identificar en 1998 el MLST para *Streptococcus pneumoniae* y su asociación con enfermedad invasiva. (31)

Y debido a que en México no se cuenta con epidemiología molecular mediante secuencia tipo de *Streptococcus pneumoniae* es por lo que se decide hacer un trabajo de investigación para obtener dicha información.

CAPÍTULO III

ANTECEDENTES

En 2001 se publicaron estudios en donde se reporta el genoma completo de *Streptococcus pneumoniae*, en donde se observaron 258 genes. Se han realizado publicaciones de secuencias de genoma completo de diferentes aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* con enfermedad invasiva principalmente. (59)

Se han reportado algunas secuencias de genoma completo de algunas cepas, desde infecciones por neumococo no invasivo con multidrogoresistencia(60), hasta cepas invasivas, sin embargo es frecuente observar solo el análisis de una cepa.

Un estudio en Canadá evaluó las cepas por sospecha de un brote, utilizando técnicas moleculares con MLST.(61)

En México en el 2016 se publicó un trabajo reportando la secuencia del genoma completo de *Streptococcus pneumoniae* de un aislamiento clínico en sangre de un paciente de 43 años con diagnóstico de púrpura fulminans, con serotipo 19A, con secuencia tipo 320, es el trabajo más reciente que se ha publicado en México acerca del tema.(62)

CAPÍTULO IV

OBJETIVOS

Objetivo principal:

Aislar ADN genómico a partir de cepas invasivas de *Streptococcus pneumoniae*.

Objetivo particular:

Genotipificar las cepas seleccionadas de *Streptococcus pneumoniae* y determinar la secuencia tipo de cada una.

CAPÍTULO V

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

Para la realización de este estudio se necesitaron los siguientes materiales:

Material utilizado

- Placas de agar sangre de cordero al 5%
- Asa bacteriológica
- Cepas de *Streptococcus pneumoniae* contenidas en el cepario
- Caldo Todd Hewitt+ suero de conejo al 5% (para preservar muestras congeladas)

- Aceite mineral (para preservar muestras congeladas)
- Tubos eppendorf de 1.5ml y 2 ml
- Agua estéril
- Pipetas y micropipetas
- Microcentrifuga
- Tubo de Mc Farland 1.0
- Vórtex
- Thermomixer
- Gradillas
- EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps Kit, Bacteria
- Congelador -20°C
- Nano Drop
- Reactivos y Soluciones
- Etanol 70%
- Solución de lisis enzimática (25mM Tris-HCl, pH8.0, 2.5mM EDTA, 1%Triton X-100)
- Lisozima
- TE1X/SDS1% (1gramo de SDS en 100ml de TE1X)
- Proteinasa K (2mg/200µL)
- NaCl 5M
- CTAb/NaCl (4.1 gramos de NaCl en 80 ml de agua destilada y agregar 10 gramos de CTAB a 65°C)
- SEVAG (cloroformo + alcohol isoamílico 24:1)
- Fenol saturado

- TE1X
- Isopropanol 100%
- Acetato de sodio 3M pH=5.2±2
- Agua miliQ estéril

Métodos

Para iniciar el protocolo se descongelaron muestras de cepas de *Streptococcus pneumoniae* que se tenían congeladas del cepario de Infectología, se dividieron las muestras en invasivas y no invasivas, las cuales ya están identificadas además de realizarse previamente serotipificación, solo se tomaron las muestras invasivas para sembrarlas en placas agar sangre de cordero al 5%, se dejaron incubar a 37°C y se observó el crecimiento de 24 a 48 hrs, se realiza un segundo aislamiento de la primera placa para evitar contaminación, de éste segundo cultivo se vigiló el crecimiento de las 24 a 48 horas y de ahí se procedió a obtener colonias jóvenes de *Streptococcus pneumoniae* y suspenderlas en un tubo eppendorf de 1.5ml con 1 ml de agua estéril hasta tener una turbidez de 1 de McFarland, con cuidado de no extraer agar.

El siguiente procedimiento es la extracción de ADN bacteriano, ya sea por medio de un kit de extracción de ADN (EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps Kit, Bacteria) o por un método de extracción modificado debido a las características del neumococo.

Dicho método se modificó por la dificultad de obtener suficiente ADN bacteriano y tomando en cuenta la cápsula del neumococo se adaptó el método

manual para extracción de ADN de *Candida* y de hongos filamentosos, en el que se realizan lavados con etanol al 70% previo a iniciar el protocolo de extracción de ADN, este procedimiento se detalla a continuación:

LAVADOS CON ETANOL

- 1.- Se coloca un cultivo joven de *Streptococcus pneumoniae* en 1 ml de agua estéril hasta alcanzar una turbidez de 1McFarland.
- 2.- Se centrifuga a 14,000 rpm por 8 min y se retira el sobrenadante.
- 3.- Se realiza lavado de etanol al 70% (1 ml).
- 4.- Se mezcla con vórtex durante 10 segundos
- 5.- Se centrifuga a 14,000 rpm por 8 min y se retira el sobrenadante.
- 6.- Se repite paso 3,4 y 5.
- 7.- Se incuba a 55°C por 15 min.
- 8.- Se deja secando durante una noche.

EXTRACCIÓN

- 1.- Re-suspender masa bacteriana en 200µL de solución de lisis enzimática en un tubo Eppendorf de 2 ml, de manera que quede una suspensión lechosa, más no espesa.
- 2.- Mezclar en vórtex para homogenizar lo más posible.
- 3.- Agregar un poco de lisozima. (Con un aplicador de madera)
- 4.- Mezclar e incubar a 37°C 800 rpm por 2 hrs.
- 5.- Agregar 390µL de TE1X/SDS 1%.
- 6.- Agregar 4µL proteinasa K

- 7.- Incubar a 55°C por 1 hora.
- 8.- Agregar 100µL de NaCl 5M y mezclar por inversión.
- 9.- Agregar 80µL de CTAB/NaCl y mezclar por inversión.
- 10.- Incubar a 65°C por 10 min.
- 11.- Agregar 300µL de SEVAGE.
- 12.- Agregar 250µL de fenol saturado.
- 13.- Agregar 100µL de TE1X.
- 14.- Mezclar y centrifugar a 14,000 rpm por 8 min.
- 15.- Transferir 900µL de la fase acuosa a un tubo Eppendorf 2ml.
- 16.- Repetir pasos del 11 al 15.
- 17.- Agregar 900µL de isopropanol 100%.
- 18.- Agregar 240µL de acetato de sodio 3M pH=5.2±2.
- 19.- Invertir.
- 20.- Incubar a -20°C por 1 hora.
- 21.- Centrifugar a 14,000 rpm por 8 minutos y desechar sobrenadante.
- 22.- Agregar 1 ml de etanol 70%.
- 23.- Centrifugar a 14,000 rpm por 8 min y desechar el sobrenadante.
- 24.- Repetir pasos 22 y 23.
- 25.- Secar a temperatura ambiente.
- 26.- Re-suspender pastilla en 25 a 50 µL de agua miliQ estéril.
- 27.- Incubar a 65°C por 15 minutos.
- 28.- Almacenar a -20°C.

Posterior a almacenar a -20°C se procede a realizar la secuenciación completa del genoma del *Streptococcus pneumoniae* utilizando Illumina MiSeq

platform el cual genera 487,316 lecturas totales (483,492 lecturas después del recorte) con un promedio de longitud de 250 x 2 nucleótidos, proporcionando 25 veces la cobertura del genoma. El ensamblaje de Novo se realiza utilizando SPAdes genome assembler version 3.5.0 software.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS

De un total de 144 cepas, 84 de ellas eran invasivas, y de ellas después de sembrar las placas solo se obtuvieron 28 aislamientos, de los que se obtuvieron solo 7 aislamientos a los que se les realizó la extracción de ADN y posteriormente la secuenciación del genoma completo.

Para la extracción de ADN bacteriano en un inicio se realizó por medio de un kit de extracción de ADN (EZ-10 Spin Column Genomic DNA

Minipreps Kit, Bacteria) sin embargo al hacer pruebas para la extracción de DNA se obtuvo poco material genético <5ng/μl, por lo que se consideró utilizar el método manual al cual se le hicieron modificaciones para obtener suficiente ADN con buena calidad (A260/280 =2) e integridad.

Las muestras que se obtuvieron incluyen del año 2009 al 2014, un total de 7 muestras de pacientes con un rango de edad de 7 meses a 43 años con una media de 15.9 años de edad, con un 71.4% pacientes de sexo masculino; la procedencia de los pacientes fue de Monterrey y su área metropolitana, con un 28.6% del hospital infantil y un 71.4% del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

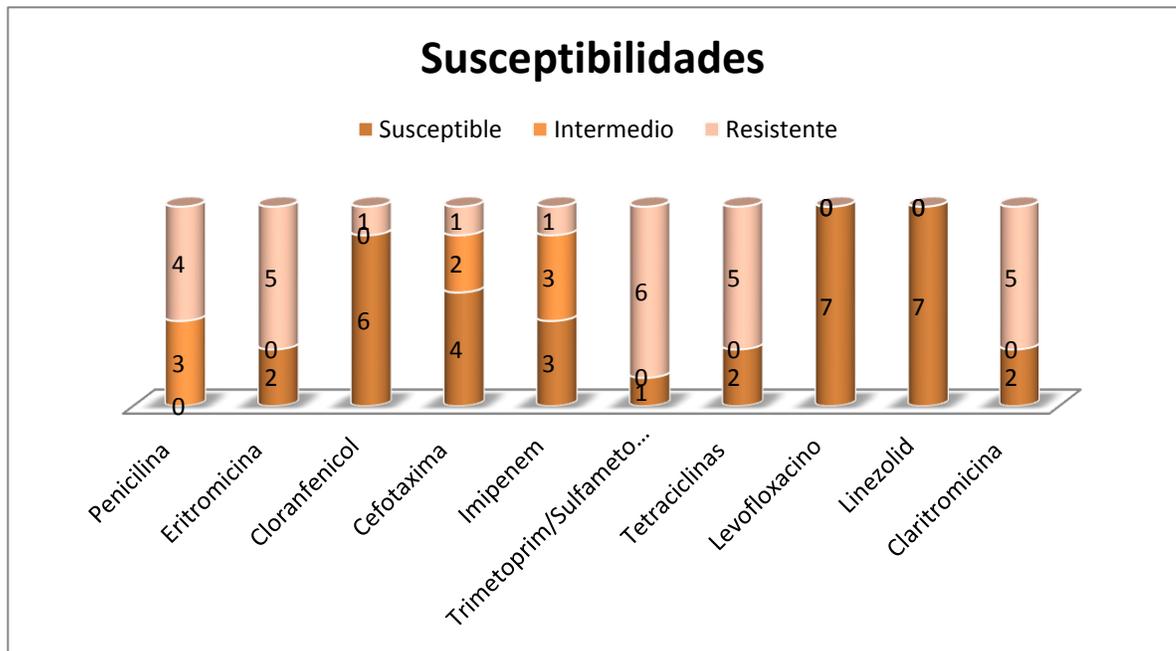
Los diagnósticos de los pacientes con estos aislamientos fueron un 57.1% con bacteriemias, 14.3% con meningitis y 28.6% con derrame pleural.

Cuadro 1. Características demográficas

Año de recolección de la muestra	N	%
2009	1	14.3%
2010	0	0.0%
2011	1	14.3%
2012	1	14.3%
2013	1	14.3%
2014	3	42.8%

Sexo		
Femenino	2	28.6%
Masculino	5	71.4%
Hospital de procedencia		
Hospital Universitario	5	71.4%
Hospital Infantil	2	28.6%
Diagnóstico		
Bacteriemia	3	42.8%
Meningitis	1	14.3%
Derrame pleural	2	28.6%
Neumonía + Bacteriemia	1	14.3%

Figura 1. Susceptibilidades a antibióticos de las cepas de *Streptococcus pneumoniae*



Se establecieron las susceptibilidades a diferentes antibióticos de las cepas en estudio encontrando lo siguiente: resistencia a penicilina en un 57.1%, resistencia a eritromicina en un 71.4%, resistencia a cloranfenicol, imipenem y cefotaxima de un 14.3%, resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol 85.7%, resistencia a tetraciclinas de un 71.4%, sin resistencia a levofloxacino y linezolid y resistencia a claritromicina de 71.4%.

Los días de estancia hospitalaria fueron desde 1 hasta 28 días con una media de 10.1 días. Se observó una mortalidad del 28.6%.

Se identificó que de los 7 serotipos evaluados un 57.1% eran serotipo 19A, 14.3% serotipo 9V, 14.3% de serotipos 15A/F y 14.3% de serotipo 19F.

Obtuvimos un 42.85% de aislamientos con secuencia tipo ST320, 14.3% con ST81, 14.3% con secuencia tipo ST3936 y 14.3% con ST2613.

De los pacientes en los que se reportó mortalidad fue con el diagnóstico de meningitis y neumonía bacteriémica con serotipos 19A y 15A/F, que corresponden a las secuencias tipo ST3936 y ST320, respectivamente.

Cuadro 2. Características moleculares y evolución de los pacientes

Diagnóstico	Días de		Serotipo	Secuencia
	estancia	Muerte		Tipo
Bacteriemia	4	No	19A	ST2613
Meningitis	1	Si	19A	ST3936
Bacteriemia	9	No	9V	ST156
Derrame Pleural	1	No	19A	ST320
Derrame Pleural	18	No	19A	ST320
Neumonía+Bacteriemia	10	Si	15A/F	ST320
Bacteriemia	28	No	19F	ST81

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN

Aislamos 7 cepas de *Streptococcus pneumoniae* de los años 2009 al 2014, dichos aislamientos son en su mayoría pacientes con bacteriemia 42.8%. En los 2 pacientes que se documentó derrame pleural tuvieron el mismo serotipo (19A) y la misma secuencia tipo ST320.

Se encontraron diferentes secuencias tipo aún y con que los pacientes tenían el mismo serotipo, se encontraron la ST2613, ST3936, ST320 (2 aislamientos), éstas secuencias tipo corresponden a los serotipos 19A.

La estancia intrahospitalaria varió de 1 día a 28 días, los pacientes que tuvieron una estancia intrahospitalaria más corta fué de 1 día y se asoció al mismo serotipo 19A, sin embargo a una secuencia tipo diferente, ST3936 y ST320, y solo uno de ellos falleció.

En relación a la metodología para realizar la extracción de ADN es importante mencionar que aun con que se utilizó un kit para extracción, éste no fue el método ideal para extraer la cantidad suficiente de ADN para la secuenciación completa del genoma. Se siguió la metodología que sugiere el proveedor, sin embargo no se obtuvieron resultados adecuados, por lo que se decidió agregarle un paso previo a la extracción de ADN, dicho paso incluía realizar lavados con etanol así como agregarle lisozima al proceso, sin embargo los resultados no se modificaron, por lo que decidimos adaptar por medio de un método manual la extracción, combinando metodologías para extracción de ADN de hongos filamentosos y extracción de ADN de *Candida spp.*, todo esto basados en que la cápsula de *Streptococcus pneumoniae* es gruesa como la cápsula de *Cryptococcus spp.*

En México solo se ha reportado recientemente un artículo en donde se describe la secuencia completa del genoma de *Streptococcus pneumoniae* de un paciente del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" con diagnóstico de púrpura fulminans, sin embargo esto fue descrito solo de un

aislamiento; no se han realizado estudios o reportes de caso en México con más de una cepa.

Se sabe que es un número pequeño de aislamientos, y que solo nos dan datos epidemiológicos del Noreste de México, no de su totalidad, sin embargo es un buen inicio para que se sigan haciendo estudios para analizar la epidemiología molecular de nuestro entorno.

Una limitante es que la mayoría de los casos son de un mismo centro, pero es importante remarcar que dicho centro es una unidad de referencia del Noreste de México y concentra población significativa de dicha zona.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIÓN

Este trabajo se hizo ya que se tiene la necesidad de analizar datos epidemiológicos pero no solamente con pruebas bioquímicas, si no ir más allá y evaluar a partir de un método molecular la conformación de nuestra epidemiología para así posteriormente compararla con la epidemiología internacional.

Es momento para realizar estudios moleculares para llevar una vigilancia más estrecha del comportamiento de las cepas que se encuentran en nuestra región, así como para investigar más datos acerca de virulencia, patogenicidad

y de modificación de vacunas, así como la implementación de programas de vacunación.

Se realizaron grandes esfuerzos para secuenciar el genoma completo de *Streptococcus pneumoniae*, sin embargo hay mucho más trabajo por hacer, más datos a nivel molecular que esclarecer para comprender el comportamiento de las cepas, su resistencia a antibióticos y la adaptación que tienen a su ambiente.

En México no hay un reporte completo de la epidemiología a nivel molecular y es algo que debe tomarse en consideración para los próximos años en el campo de la investigación y de la vigilancia epidemiológica.

CAPÍTULO IX

BIBLIOGRAFÍA

1. Centers for Disease Control and Prevention. Pneumococcal Disease. *Epidemiol Prev Vaccine-Preventable Dis.* 2015;279–96.
2. Henriques-Normark B, Tuomanen EI. The pneumococcus: Epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(7).
3. File TM. Pneumococcal Vaccination Remains a High Priority. 2016;24(1):2015–6.
4. Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C, et al. Pneumococcal capsules and their types: Past, present, and future. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):871–99.
5. Ash SY, Sheffield JVL. Pneumococcus. *Med Clin North Am* [Internet]. 2013;97(4):647–66, x – xi. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23809718>
6. Song JY, Nahm MH, Moseley MA. Clinical implications of pneumococcal serotypes: Invasive disease potential, clinical presentations, and antibiotic resistance. Vol. 28, *Journal of Korean Medical Science.* 2013. p. 4–15.
7. Yildirim I, Shea KM, Pelton SI. Pneumococcal Disease in the Era of

- Pneumococcal Conjugate Vaccine. Vol. 29, Infectious Disease Clinics of North America. 2015. p. 679–97.
8. Bogaert D, De Groot R, Hermans PWM. Streptococcus pneumoniae colonisation: The key to pneumococcal disease. Vol. 4, Lancet Infectious Diseases. 2004. p. 144–54.
 9. Dunne EM, Smith-Vaughan HC, Robins-Browne RM, Mulholland EK, Satzke C. Nasopharyngeal microbial interactions in the era of pneumococcal conjugate vaccination. Vaccine [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;31(19):2333–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.03.024>
 10. Cillóniz, Catia; Amaro RTA. Pneumococcal vaccination. Curr Opin [Internet]. 2016;29(2):187–96. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L602472108> <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2015.64> <http://findit.library.jhu.edu/resolve?sid=EMBASE&issn=15383598&id=doi:10.1001/jama.2015.64&atitle=Pneumococcal+vaccination&stitle=>
 11. Chao Y, Marks LR, Pettigrew MM, Hakansson AP. Streptococcus pneumoniae biofilm formation and dispersion during colonization and disease. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2015;4(January):194. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4292784&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 12. Marks LR, Davidson BA, Knight PR, Hakansson AP. Interkingdom signaling induces Streptococcus pneumoniae biofilm dispersion and

- transition from asymptomatic colonization to disease. *MBio*. 2013;4(4):1–13.
13. Kim L, McGee L, Tomczyk S, Beall B. Biological and epidemiological features of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in pre- and post-conjugate vaccine eras: A United States perspective. Vol. 29, *Clinical Microbiology Reviews*. 2016. p. 525–52.
 14. Aliberti S, Mantero M, Mirsaeidi M, Blasi F. The role of vaccination in preventing pneumococcal disease in adults. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. European Society of Clinical Infectious Diseases; 2014;20(S5):52–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12518>
 15. Mirsaeidi M, Schraufnagel DE. Pneumococcal vaccines: understanding centers for disease control and prevention recommendations. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11(6):980–5.
 16. Amaro R, Liapikou A, Cilloniz C, Gabarrus A, Marco F, Sellares J, et al. Predictive and prognostic factors in patients with blood-culture-positive community-acquired pneumococcal pneumonia. *Eur Respir J* [Internet]. 2016;1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27174880>
 17. Moberley S, Holden J, Tatham DP, Andrews RM. Vaccines for preventing pneumococcal infection in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;1(1):CD000422.
 18. Fedson DS, Liss C. Precise answers to the wrong question: Prospective clinical trials and the meta-analyses of pneumococcal vaccine in elderly and high-risk adults. *Vaccine*. 2004;22(8):927–46.
 19. Cillóniz C, Torres A. Understanding mortality in bacteremic pneumococcal

- pneumonia. *J Bras Pneumol*. 2012;38(12):419–21.
20. Wilbring M, Tugtekin SM, Matschke K, Kappert U. Austrian syndrome in the context of a fulminant pneumococcal native valve endocarditis. *Brazilian J Infect Dis* [Internet]. Elsevier Editora Ltda; 2012;16(5):486–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.003>
 21. Echeverri D, Vargas M de los Á, Matta L, Rosso F, Segura JD. Infección invasiva por *Streptococcus pneumoniae*: reporte de caso de un paciente con síndrome de Austrian. *Biomédica* [Internet]. 2014;35(1):16–20. Available from: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2065/2686>
 22. Brandileone MC. Informe Regional de SIREVA II ,2012 [Internet]. OPAS/OMS Report. 2012. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=22372&Itemid=270&lang=es
 23. Gutierrez Brito M, Thompson A, Girgenti D, Giardina PC, Sarkozy DA, Gruber WC, et al. Immunogenicity and safety of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in Mexico. *Rev Panam Salud Publica*. 2013;33(6):414–21.
 24. van de Beek D, Cabellos C, Dzunpova O, Esposito S, Klein M, Kloek AT, et al. ESCMID guideline: diagnosis and treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2016;1–26. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X16000203>
 25. Hausdorff WP, Bryant J, Kloek C, Paradiso PR, Siber GR. The

- contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations: implications for conjugate vaccine formulation and use, part II. *Clin Infect Dis*. 2000;30:122–40.
26. Mindy 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 Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad. 2004;410.
 27. Testing S, CLSI. M100-S23 Performance Standards for Antimicrobial. 2015.
 28. Gillespie SH, Balakrishnan I. Pathogenesis of pneumococcal infection. *J Med Microbiol*. 2000;49(12):1057–67.
 29. Trappetti C, Ogunniyi AD, Oggioni MR, Paton JC. Extracellular matrix formation enhances the ability of streptococcus pneumoniae to cause invasive disease. *PLoS One*. 2011;6(5).
 30. Blaschke AJ. Interpreting assays for the detection of streptococcus pneumoniae. *Clin Infect Dis*. 2011;52(SUPPL. 4):331–7.
 31. Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: Identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*. 1998;144(11):3049–60.
 32. Andam CP, Hanage WP. Mechanisms of genome evolution of *Streptococcus*. *Infect Genet Evol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;33:334–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.11.007>
 33. Donkor ES. Understanding the pneumococcus: transmission and evolution. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2013;3(March):7. Available

from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3590460&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

34. Lefevre JC, Faucon G, Sicard AM, Gasc AM. DNA fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 1993;31(10):2724–8.
35. Reinert RR. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. European Society of Clinical Infectious Diseases; 2009;15(SUPPL. 3):7–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02724.x>
36. Kargar M, Moein Jahromi F, Doosti A, Handali S. Molecular Investigation of Quinolone Resistance of Quinolone Resistance-Determining Region in *Streptococcus pneumoniae* Strains Isolated from Iran Using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Method. *Osong Public Heal Res Perspect* [Internet]. Elsevier Korea LLC; 2014;5(5):245–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrp.2014.08.010>
37. Doherty N, Trzcinski K, Pickerill P, Zawadzki P, Dowson CG. Genetic diversity of the tet(M) gene in tetracycline-resistant clonal lineages of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(11):2979–84.
38. Alekshun MN, Levy SB. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell*. 2007;128(6):1037–50.
39. Mingoia M, Morici E, Brenciani A, Giovanetti E, Varaldo PE. Genetic basis

of the association of resistance genes *mef(I)* (macrolides) and *catQ* (chloramphenicol) in streptococci. *Front Microbiol.* 2015;6(JAN):1–5.

40. Wilen M, Buwembo W, Sendagire H, Kironde F, Swedberg G, Wilén M. Cotrimoxazole resistance of *Streptococcus pneumoniae* and commensal streptococci from Kampala, Uganda. *Scand J Infect Dis* [Internet]. 2009;41(2):113–21. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/00365540802651889> \n <http://www.ajtmh.org/content/75/3/375.short> \n <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163445307008365> \n http://journals.lww.com/pidj/Abstract/2005/11000/Source_of_Infection_in_Househ
41. Cornick JE, Harris SR, Parry CM, Moore MJ, Jassi C, Kamng'ona A, et al. Genomic identification of a novel co-trimoxazole resistance genotype and its prevalence amongst *Streptococcus pneumoniae* in Malawi. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(2):368–74.
42. Mangtani P. Efficacy of polysaccharide pneumococcal vaccine in adults in more developed countries: the state of the evidence. *Lancet Infect Dis.* 2003;3(February):71–8.
43. Del Amo E, Brotons P, Monsonis M, Triviño M, Iñigo M, Selva L, et al. High invasiveness of pneumococcal serotypes included in the new generation of conjugate vaccines. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(7):684–9.
44. Bonten MJM, Huijts SM, Bolkenbaas M, Webber C, Patterson S, Gault S, et al. Polysaccharide Conjugate Vaccine against Pneumococcal Pneumonia in Adults. *N Engl J Med* [Internet]. 2015;372(12):1114–25. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1408544>
http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1408544?query=featured_home
<http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa1408544>

45. Kobayashi M, Bennett NM, Gierke R, Almendares O, Moore MR, Whitney CG, et al. Intervals Between PCV13 and PPSV23 Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2015;64(34):944–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26334788>
46. WHO/UNICEF. Global Immunization Data. WHO [Internet]. 2015;(july). Available from: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/Global_Immunization_Data.pdf?ua=1
47. Thomas M FJ, Michael D. H, Kristin.L. N, William S. Update on preventing pneumococcal disease in adults. *Infect Dis Clin Pract* [Internet]. 2012;20(1):3–9. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed10&NEWS=N&AN=2012013293>
48. Chacon-Cruz E, Velazco-Mendez Y, Navarro-Alvarez S, Rivas-Landeros RM, Volker ML, Lopez-Espinoza G. Pneumococcal disease: Emergence of serotypes 19A and 7F following conjugate pneumococcal vaccination in a Mexican hospital. *J Infect Dev Ctries*. 2012;6(6):516–20.
49. Echániz-Avilés G, Román-Álvarez LS, Sánchez-Alemán M, Carnalla-Barajas MN, Soto-Noguerón A. Prevalencia de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19A antes y después de la introducción de la

- vacuna conjugada heptavalente en México. *Salud Publica Mex.* 2014;56(3):266–71.
50. Talbird SE, Taylor TN, Caporale J, Ismaila AS, Gomez J. Residual economic burden of *Streptococcus pneumoniae*- and nontypeable *Haemophilus influenzae*- associated disease following vaccination with PCV-7: A multicountry analysis. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;28(SUPPL. 6):G14–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.06.080>
 51. Gomez-Barreto D, Espinosa-Monteros LE, Lopez-Enriquez C, Jimenez-Rojas V, Rodriguez-Suarez R. Invasive pneumococcal disease in a third level pediatric hospital in Mexico City: epidemiology and mortality risk factors. *Salud Publica Mex.* 2010;52(5):391–7.
 52. Tinoco JC, Juergens C, Ruiz Palacios GM, Vazquez-Narvaez J, Enkerlin-Pauwells HL, Sundaraiyer V, et al. Open-label trial of immunogenicity and safety of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in adults ≥ 50 years of age in Mexico. *Clin Vaccine Immunol* [Internet]. 2015;22(2):185–92. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84921959844&partnerID=tZOtx3y1>
 53. Espinosa-de los Monteros LE, Aguilar-Ituarte F, Jiménez-Juárez RN, Rodríguez-Suárez RS, Gómez-Barreto D. Reemplazo de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en niños con vacuna conjugada antineumocócica 7V en México. *Salud Publica Mex.* 2010;52(1):4–13.
 54. Musher DM. Infectious disease caused by *Streptococcus pneumoniae*: Clinical Spectrum, Immunity and Treatment. *Clin Infect Dis.* 1992;14:801–

- 9.
55. Imöhl M, Reinert RRR, van der Linden M. Antibiotic susceptibility rates of invasive pneumococci before and after the introduction of pneumococcal conjugate vaccination in Germany. *Int J Med Microbiol* [Internet]. Elsevier GmbH.; 2015;305(7):776–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.08.031>
56. Kastenbauer S, Pfister HW. Pneumococcal meningitis in adults: Spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases. *Brain*. 2003;126(5):1015–25.
57. Vázquez J a, Berrón S. Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22(2):113–20.
58. Duarte C, Sanabria O, Moreno J. Molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 invasive isolates in Colombia. *Rev Panam Salud Publica* [Internet]. 2013;33(6):422–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23939367>
59. Tettelin H, Nelson KE, Paulsen IT, Eisen JA, Timothy D, Peterson S, et al. Complete Genome Sequence of a Virulent Isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* (80-). 2001;
60. Li G, Hu FZ, Yang X, Cui Y, Yang J, Qu F, et al. Complete genome sequence of *Streptococcus pneumoniae* strain ST556, a Multidrug-resistant isolate from an otitis media patient. *J Bacteriol*. 2012;194(12):3294–5.
61. Miller RR, Langille MGI, Montoya V, Crisan A, Stefanovic A, Martin I, et al.

Genomic Analysis of a Serotype 5 *Streptococcus pneumoniae* Outbreak in British Columbia, Canada, 2005–2009. Can J Infect Dis Med Microbiol [Internet]. 2016;2016:1–7. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/cjidmm/2016/5381871/>

62. Perez-Maya AA, Hinojosa-Robles RM, Barcenas-Walls JR, Vignau-Cantu A, Barrera-Saldana HA, Ortiz-Lopez R. Complete Genome Sequence of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 19A, a Blood Clinical Isolate from Northeast Mexico. Genome Announc [Internet]. 2016;4(2):16–7. Available from: <http://genomea.asm.org/content/4/2/e00195-16.full.pdf>

CAPITULO X

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Sandra Gabriela Galindo Alvarado

Candidato para el Grado

de Sub-Especialista en Infectología

Tesis: “Caracterización molecular de las cepas de *Streptococcus pneumoniae* de aislamientos invasivos en Nuevo León, México”

Campo de estudio: Ciencias de la salud

Biografía:

Datos personales: Nacida en Monterrey Nuevo León México el día 16 de Octubre de 1986, hija de Gerardo Galindo Chávez y Crescencia Alvarado Aguilar.

Educación:

Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en el año 2010, con mención honorífica, sexto lugar de generación.

Egresada de la especialidad de Medicina Interna del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León en el año 2015

Experiencia Profesional: Residente de Infectología en el Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León.