

Frecuencia y distribución de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en Santafé de Bogotá

Miguel Guzmán¹, Piedad Sánchez²

Streptococcus pneumoniae es un patógeno importante por los cuadros clínicos que causa, cuya prevención se basa en una vacuna de polisacáridos capsulares; es necesario conocer la frecuencia de serotipos en cada región, con el objeto que los más frecuentes estén representados. El presente trabajo cooperativo con el Depto. de Investigación Médica de la U. de Pennsylvania presenta los resultados de un estudio de 3 años, sobre frecuencia de serotipos en Santa Fé de Bogotá, Colombia.

Materiales y metodos

Las cepas de *S. pneumoniae* aisladas de cuadros clínicos se estudiaron por cultivo y se identificaron sobre la base de la colonia, alfa hemólisis, optoquina y solubilidad en bilis. Luego fueron tipificadas por técnica de *quellung* con sueros polivalentes y monovalentes y enviadas al centro de referencia para reconfirmación.

Resultados

97 cepas fueron identificadas y serotipificadas provenientes de 7 instituciones: Hospital Militar Central 64, Hospital Infantil 17, Hospital San José, 9, Hospital de La Misericordia 3, INS 2, Clínica David Restrepo 1, Clínica Country 1. Los cuadros clínicos de donde se aislaron fueron: sinusitis 45, meningitis 25, neumonía 13, otitis 8, laringotraqueítis 3, septicemia 1, conjuntivitis 1, artritis séptica 1. Los serotipos según la clasificación danesa fueron: 6A:12, 6B:12 (25%), 19A:1, 19F:12 (13,40%), 23F:8 (8,24%), 14:7 (7,21%), 3:6 (6,18%), 7B:1, 7C:5 (6,18%), 15A:1, 15B:1, 15C:3 (5,15%), 18A:3, 18B:1, 18F:1 (5,15%), 1:3 (3,09%), 5:3 (3,09%), 9V:3 (3,09%), 17F:3 (3,09%), 16:2 (2,6%), 35A:2 (2,06%), 10:1 (1,03%), 11:1 (1,03%), 21:1 (1,03%), 31:1 (1,03%).

Conclusión

La vacuna disponible contiene polisacáridos de 23 serotipos; 17 son frecuentes en Bogotá, 5 frecuentes no están incluidos y 9 incluidos no circulan en Bogotá.

Summary

S pneumoniae is a very important human pathogen due to the variety of acute diseases that cause in the community. The prevention of these diseases is based on the use of a vaccine of capsular polysaccharides of the most common isolate serotypes. The present work was undertaken as part of a collaborative study, in order to know what serotypes circulate in Bogotá.

¹ Profesor asociado, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.

² Asesora científica, Biobacter Ltda.

Materials and methods

Clinical isolates of *S pneumoniae* were cultured and identified on the basis of its colony appearance, alpha hemolysis, bilis solubility, optoquine sensitivity and inulin fermentation. All strains identified in such a way were serotyped by the quellung reaction with specific antisera.

Results

97 strains from 7 medical institutions fulfilled the criteria of inclusion. The most frequent serotypes encountered, according to the Danish serotyping were: 6A:12, 6B:12 (23,38%), 19A:1, 19F:12 (12,61), 23F:8 (7,76%), 14:7 (6,79%), 3:6 (5,82%), 7B:1, 7C:5 (5,82%), 15A:1, 15B:1, 15C:3 (4,85%), 18A:3, 18B:1, 18F:1 (4,85%), 1:3 (2,91%), 5:3 (2,91%), 9V:3 (2,91%), 17F:3 (2,91%), 16:2 (1,94%), 35A:2 (1,94%), 10:1 (0,97%), 11:1 (0,97%), 21:1 (0,97%), 31:1 (0,97%).

Conclusions

The actual vaccine contains polysaccharides from 23 serotypes and covers most of the serotypes isolated in Bogota.

Introducción

Streptococcus pneumoniae es un patógeno de gran importancia en patología humana, no sólo por la gran variedad de cuadros clínicos que causa en la comunidad tales como: meningitis, otitis media, sinusitis, neumonía lobar (1), sino, además, por la preocupante y cada vez mayor frecuencia de resistencia a la penicilina y otros antibióticos que hasta hace algunos años constituían la elección para el control terapéutico de las patologías por él causadas (2-6).

En la era preantibiótica, la mortalidad debida a este Gram positivo fue muy elevada y constituyó durante la primera y segunda guerra mundial una de las mayores preocupaciones de la medicina en los frentes de batalla (7). De la necesidad de dar alguna solución a este severo problema de salud, surgió la posibilidad de desarrollar una vacuna dirigida contra los polisacáridos capsulares del microorganismo. En aquel entonces se conocía ya que *S. pneumoniae* virulento poseía una cápsula de polisacárido cuya estructura química permitía diferenciar, al menos, cuatro tipos distintos reconocidos como tipos I, II, V y VII y que los sueros dirigidos contra éstos permitían identificarlos y, además, constituían una posibilidad de control terapéutico, por lo cual, era necesario en todo cuadro

clínico aislar el microorganismo y tipificarlo con el objeto de administrar el antisuero específico. Sobre la base de estos conocimientos Macleod, Hodges, Heidelberger y Bernard (8) postularon la posibilidad de desarrollar una vacuna utilizando como antígeno una mezcla de los polisacáridos capsulares de los 4 serotipos conocidos y en 1945 lo lograron experimentalmente. Con el advenimiento de los antibióticos y dada la gran sensibilidad de *S. pneumoniae* a la penicilina, la serotipificación con fines terapéuticos perdió todo interés; sin embargo, en las últimas décadas debido a la importancia de la patología causada por este patógeno y al surgimiento de cepas resistentes a la penicilina (2), Austrian insistió en la necesidad de volver sobre la vacuna de polisacáridos, integrando en ella los serotipos más frecuentes de los 83 hasta hoy conocidos; en 1977, una nueva vacuna constituida por 14 serotipos fue licenciada en los Estados Unidos (9).

Esta vacuna mostró su efectividad y demostró también fallas ante las infecciones por serotipos no contenidos en ella. Esto indujo a Austrian a buscar una vacuna que incluyera una más amplia variedad de serotipos y a incluir sobretodo aquéllos que despertaran una reacción cruzada, para lo cual, promovió un estudio mundial de serotipificación de *S. pneumoniae* aislado de cuadros clínicos

específicos (10). El trabajo aquí presentado se realizó como parte integral de esa encuesta mundial para conocer los serotipos más comúnmente aislados en la ciudad de Bogotá. El estudio se llevó a cabo en colaboración con el Departamento de Investigación Médica de la Escuela de Medicina de la Universidad de Pennsylvania y los Centros para Control de Enfermedades, CDC, de los Estados Unidos en Atlanta, Georgia.

Materiales y métodos

Cepas: las cepas incluidas fueron referidas por los centros de atención médica que aceptaron colaborar en el estudio y que llenaron los requisitos de inclusión del protocolo, tales como: proceder de un caso clínico con un cuadro específico, ser niños menores de 5 años y haberse hecho el aislamiento a partir de una muestra representativa.

Medios de cultivo: los medios de cultivo para el estudio fueron los convencionales para este tipo de trabajo bacteriológico, básicamente se utilizó agar sangre de carnero, agar nutritivo y BHI; para pruebas complementarias se utilizaron sales biliares para demostrar la solubilidad, discos diferenciales de hidroxipireína, optoquina e inulina para demostrar su fermentación (11) -

Sueros tipificadores: para tipificar las cepas se utilizaron sueros polivalentes "Omniserum", sueros de grupo y sueros monoespecíficos. Dos tipos de preparaciones fueron utilizados: uno según la clasificación americana y otro según la danesa. Ambos tipos de preparaciones fueron provistos por la Oficina Sanitaria Panamericana a través del Dr. Robert Austrian, director del programa en la Universidad de Pennsylvania.

Toda cepa referida fue reestudiada para confirmar su identificación como *S. pneumoniae*; para ello cada cepa fue sembrada sobre agar sangre de carnero e incubada a 37° C en atmósfera de 3% de CO₂ por 18 horas; luego de la incubación las colonias que presentaban una apariencia compatible con *S. pneumoniae* y un halo de alfa hemólisis y que estaban constituidas por típicos diplococos Gram positivos se les realizó las pruebas de solubilidad a las sales biliares, la fermentación de la inulina y la sensibilidad a la optoquina; las cepas que finalmente fueron identificadas como *S. pneumoniae*, fueron resembradas en agar nutritivo para ser posteriormente serotipificadas mediante

la prueba del hinchamiento de la cápsula o prueba de quellung (12); para ello, cada cepa cultivada en agar nutritivo fue revisada y luego de comprobarse un buen crecimiento se tomó con el asa bacteriológica un número aproximado de 5 colonias y sobre un portaobjeto limpio este material fue suspendido en una gota de solución salina buffer; una vez que la suspensión fue homogénea, se le adicionó una gota de suero polivalente ligeramente coloreado con azul de metileno para facilitar la visualización microscópica de la reacción, posteriormente, se colocó una laminilla y se observó al microscopio con un objetivo seco 40X; aquellas cepas que presentaron un claro hinchamiento de la cápsula fueron confirmadas como *S. pneumoniae* y sometidas al mismo procedimiento, con antisuero para serogrupo y, posteriormente con antisueros monoespecíficos de serotipo; en tal forma quedó establecida la identificación de género, especie, serogrupo y tipo.

Resultados

Un total de 7 instituciones de atención médica colaboraron en el estudio y un total de 97 cepas de aquellas que cumplieron los criterios de inclusión fueron finalmente identificadas como *Streptococcus pneumoniae*. En el cuadro No. 1 puede observarse la distribución de cepas por institución de origen. En el cuadro No. 2 se observa la distribución de cepas por cuadro clínico de donde la cepa fue originalmente aislada. Debido a que la clasificación danesa es la más universalmente aceptada, los resultados de la serotipificación se dan en términos de dicha clasificación; como puede verse en el cuadro No. 3 las cepas aisladas cubren 19 serogrupos con una distribución en porcentaje dominada por el serogrupo 6 con 24,74%. En el cuadro No. 4 se puede ver la frecuencia de los distintos serotipos que conforman serogrupos con reacción cruzada. Los cuadros No. 5, 6, 7, 8 muestran la distribución de serotipos de acuerdo a las distintas entidades clínicas; es interesante destacar cómo los cuadros de neumonía son causados más frecuentemente por los serotipos 14, 6B, 6A, 5 y 7C, a su vez que la sinusitis es causada más frecuentemente por los serotipos 6A, 19F, 6B, 3 y 23F. En estos resultados es interesante destacar una cepa del serotipo 18F que según Austrian (13) constituye el primer aislamiento de *S. pneumoniae* de este serotipo en el hemisferio occidental.

CUADRO N° 1

Frecuencia y Distribución de Serotipos de S. pneumoniae en Santafé de Bogotá
Origen de las Cepas según Institución

| Institución | N° cepas | Porcentaje (%) |
|------------------------|-----------|----------------|
| Hosp. Militar Central | 64 | 66 |
| Hospital Infantil | 17 | 17.52 |
| Hospital San José | | 9.2 |
| Hosp. Misericordia | | 3.9 |
| Inst. Nal. de Salud | 2 | 2.06 |
| Clínica David Restrepo | 1 | 1.03 |
| Clinica delCountry | 1 | 1.03 |
| Total | 97 | 100% |

CUADRO N° 4

Frecuencia y Distribución de Serotipos de S. pneumoniae en Santafé de Bogotá
Distribución de Serogrupos y Serotipos mas Frecuentes

| Serogrupo | Serotipo | N° |
|-----------|----------|----|
| 6 | A | 12 |
| 6 | B | 12 |
| 19 | A | 1 |
| 19 | F | 12 |
| 23 | F | 8 |
| 15 | A | 1 |
| 15 | B | 1 |
| 15 | C | 3 |
| 7 | B | 1 |
| 7 | C | 5 |
| 18 | A | 3 |
| 18 | B | 1 |
| 18 | F | 1 |
| 17 | F | 3 |
| 1 | A | 1 |
| 35 | A | 2 |

CUADRO N° 2

Frecuencia y Distribución de Serotipos de S. pneumoniae en Santafé de Bogotá
Origen de las Cepas según Entidad Clínica

| Entidad Clínica | Número | Porcentaje (%) |
|--------------------|-----------|----------------|
| Sinusitis | 45 | 46.9 |
| Meningitis | 25 | 25.7 |
| Neumonia | 13 | 13.40 |
| Otitis | 8 | 8.24 |
| Laringo-traqueitis | 3 | 3.09 |
| Septicemia | 1 | 1.03 |
| Conjuntivitis | 1 | 1.03 |
| Artritis Séptica | 1 | 1.03 |
| Total | 97 | 100 |

CUADRO N° 5

Frecuencia y Distribución de Serotipos de S. pneumoniae en Santafé de Bogotá
Distribución de Serotipos según Entidad Clínica

| Entidad | Serotipo | N° | Porcentaje (%) |
|--------------|----------|-----------|----------------|
| Meningitis | 14 | 4 | 16 |
| | 6B | 4 | 16 |
| | 6A | 3 | 12 |
| | 5 | 3 | 12 |
| | 7C | 3 | 12 |
| | 15 | 1 | 4 |
| | 15C | 1 | 4 |
| | 17F | 1 | 4 |
| | 18A | 1 | 4 |
| | 9V | 1 | 4 |
| | 19F | 1 | 4 |
| | 8 | 1 | 4 |
| Total | | 25 | 100 |

CUADRO N° 3

Frecuencia y Distribución de Serotipos de S. pneumoniae en Santafé de Bogotá
Distribución de Serogrupos según Denominación Danesa

| Serogrupos | N° cepas | Porcentaje (%) |
|--------------|-----------|----------------|
| 6 | 24 | 24.74 |
| 19 | 13 | 13.40 |
| 23 | 8 | 8.24 |
| 14 | 7 | 7.21 |
| 3 | 6 | 6.18 |
| 7 | 6 | 6.18 |
| 15 | 5 | 5.15 |
| 18 | 5 | 5.15 |
| 1 | 3 | 3.09 |
| 5 | 3 | 3.09 |
| 8 | 3 | 3.09 |
| 9 | 3 | 3.09 |
| 17 | 3 | 3.09 |
| 16 | 2 | 2.06 |
| 35 | 2 | 2.06 |
| 10 | 1 | 1.03 |
| 11 | 1 | 1.03 |
| 21 | 1 | 1.03 |
| 31 | 1 | 1.03 |
| Total | 97 | 100 |

CUADRO N° 6

Frecuencia y Distribución de Serotipos de S. pneumoniae en Santafé de Bogotá

Distribución de Serotipos según Entidad Clínica

| Entidad | Serotipo | N° | % |
|--------------|----------|-----------|------------|
| Neumonía | 1 | 3 | 23 |
| | 19F | 2 | 15.4 |
| | 8 | 2 | 15.4 |
| | 31 | 1 | 7.6 |
| | 6B | 1 | 7.6 |
| | 3 | 1 | 7.6 |
| | 23F | 1 | 7.6 |
| | 15C | 1 | 7.6 |
| 9V | 1 | 7.6 | |
| Total | | 13 | 100 |

CUADRO N° 7

Frecuencia y Distribución de Serotipos de S. pneumoniae en Santafé de Bogotá

Distribución de Serotipos según Entidad

| | | Número | Porcentaje% |
|--------------|-----------------|----------|-------------|
| | | 2 | 25 |
| | | 2 | 25 |
| | | 2 | 25 |
| | 18B | 1 | 12.5 |
| | 23F | 1 | 12.5 |
| Total | Serotipo | 8 | 100% |
| Otitis | 6B | | |
| | 6A | | |
| | 3 | | |
| | 18B | | |
| | 23F | | |
| Total | | | |

Distribución de Serotipos según Entidad Clínica

| Entidad | Serotipo | Número | Porcentaje% |
|--------------|----------|-----------|-------------|
| Sinusitis | 6A | 9 | 20 |
| | 19F | 8 | 17.77 |
| | 6B | 4 | 8.88 |
| | 3 | 3 | 6.66 |
| | 23F | 3 | 6.66 |
| | 7C | 2 | 4.44 |
| | 17 F | 2 | 4.44 |
| | 16 | 2 | 4.44 |
| | 18A | 2 | 4.44 |
| | 35A | 2 | 4.44 |
| | 9V | 1 | 2.22 |
| | 15A | 1 | 2.22 |
| | 15B | 1 | 2.22 |
| | 19A | 1 | 2.22 |
| | 7B | 1 | 2.22 |
| | 21 | 1 | 2.22 |
| | 10A | 1 | 2.22 |
| 11A | 1 | 2.22 | |
| Total | | 45 | 100 |

Discusión

La base de la clasificación de S. pneumoniae es la diversidad antigénica del polisacárido de la cápsula que permite reconocer por lo menos 83 serotipos diferentes con una distribución geográfica diferente; básicamente existen dos tipos de clasificación, la americana y la danesa, siendo esta última la más universalmente utilizada. En la actualidad la serotipificación de S. pneumoniae no tiene la importancia que tuvo en el pasado, cuando era indispensable para la aplicación terapéutica de sueros monoespecíficos. Sin embargo, los estudios de serotipificación tienen gran importancia epidemiológica con el objeto de determinar la distribución geográfica de los mismos. Al conocer

la distribución geográfica mundial de los serotipos circulantes se puede entonces deducir la vacuna puesto que ésta no es más que una mezcla de los polisacáridos de S. pneumoniae que más frecuentemente circulan. Sobre la base de estos estudios de los cuales participó Colombia, con el trabajo aquí discutido, Austrian (9) propuso el desarrollo de una vacuna polivalente con 23 de los serotipos más frecuentes, aquellos serotipos que por reacción cruzada estimulan la síntesis de anticuerpos contra serotipos antigénicamente relacionados, como lo muestra el cuadro No. 9. La vacuna desarrollada por Austrian cubre un alto porcentaje de los serotipos que circulan en Santafé de Bogotá, bien por estar directamente incluidos o porque la reacción cruzada del serotipo incluido cubre al serotipo no incluido tal como ocurre por ejemplo, con el serotipo 6B cuya reacción cruzada cubre al 6A; esto permite afirmar que la vacuna actual de 23 serotipos es efectiva en la prevención de infecciones por S. pneumoniae en nuestro medio ya que contiene los serotipos que más frecuentemente circulan en Bogotá. En la actualidad una serotipificación mundial está en curso para permitir, posiblemente, incluir nuevos serotipos en la vacuna.

CUADRO N° 9

Frecuencia y Distribución de Serotipos de S. pneumoniae en Santafé de Bogotá

| Vacuna Disponible | Serotipos Incluidos | Serotipos No incluidos | Serotipos Incluidos |
|-------------------|---------------------|------------------------|-------------------------|
| Serotipos | Colombianos | Colombianos | No circulan en Colombia |
| 1-2-3-4- | 1-3-5-6B | *6A-*7C | 2-4-7F-9N |
| 5-6B-7F-8 | 8-9V-10A | 7B-16-15A | 12F-18C |
| 9N-9V-10A | 11A-14-15B | *18A -18B | 20-22F |
| 11A-12F-14 | 17F-19A | 18F-21-*15C | 33F |
| 15B-17F-18C | 19F-23F | 31-*35A | |
| 19A-19F-20 | | *Reacción | |
| 22F-23F-33F | | cruzada | |

Agradecimientos

Queremos expresar nuestros agradecimientos al Dr. Robert Austrian por su permanente asesoría y por la confirmación de nuestros hallazgos, así como al Dr. Robert Facklam del CDC por su colaboración.

Referencias

1. Klein JO. The epidemiology of pneumococcal disease in infants and children. *Rev Infect Dis* 1981; 3:246-253.
2. Hansman D, Andrews G. A resistant Pneumococcus. *Lancet* 1967; 2:264-265.
3. Klugman KF. Pneumococcal resistant to antibiotics. *Clin Microbiol Rev*, 1990; 3:171-190.
4. Spika JS, Facklam RR, Brian D, et al. Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *J Infect Dis* 1991; 163:1273-1278.
5. Breiman RF, Butler JC, Tenover FC et al. Emergency of drug resistance pneumococcal infections in the United States. *JAMA* 1994; 271: 1831-1835.
6. McDougal LK, Facklam RR, Reeves M et al. Analysis of multiply resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the United States. *Antimicrob Agents Chem* 1992; 36:2176-2184.
7. McCarty M. El principio transformador. Editorial Reverté Barcelona 1988.
8. Macleod CM, Hodges RG, Heidelberger M, Bernard WG. Prevention of pneumococcal pneumoniae by immunization with specific capsular polysaccharides. *J Exp Med* 1945; 82:445-465.
9. Spika JS, Fedson DS, Facklam RR. Pneumococcal vaccination. controversies and opportunities. *Infect Dis Clin North Amer* 1990; 4:11-25.
10. Robbins JB, Austrian R, Lec CJ et al. Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. *J Infect Dis* 1983; 148: 1136-1159.
11. Facklam RR, Washington II JA. Chapter 29 in Balows A, Hausler Jr. WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ Eds. *Manual of Clinical Microbiology* pg 238-257. Amer Soc Microbiol. Fifth Ed Washington 1991.
12. Austrian R. The quellung reaction, a neglected microbiologic technique. *Mount Sinai J Med* 1976; 43:699-703.
13. Austrian R. Comunicacion personal.