

Distribución de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* aislados de infecciones invasoras en el Hospital de Niños de Santa Fe

C. MAYORAL^{1,2*}, M. R. BARONI², R. GIANI², S. VIRGOLINI¹, L. ZURBRIGGEN¹, M. REGUEIRA³

¹Sección Bacteriología. Hospital de Niños "Dr. Orlando Alassia", Mendoza 4150 (3000) Santa Fe; ²Sección Bacteriología, Práctica Profesional, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. UNL. Av. Freyre 2150 (3000) Santa Fe;

³División Bacteriología. INEI. "Dr Carlos Malbrán", Vélez Sarsfield 563 (1281) Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

*Correspondencia. E-mail: cmayoral@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN

Con la introducción de vacunas conjugadas antineumocócicas se observó, en muchos países, disminución de aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 14 y aumento de aislamientos correspondientes a serotipos no incluidos en esas vacunas. En 1993, el Hospital de Niños de Santa Fe comenzó la vigilancia de la distribución de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* invasores. En este trabajo se estudió la correlación entre serotipo y a) patología (neumonía/meningitis), b) edad (menor o mayor de dos años), y c) CIM de penicilina, para los serotipos aislados en el período 2003-2005. El serotipo predominante fue el 14, seguido del 1, 6B, 18C, 7F, 19F y 5. El serotipo 14 mostró asociación estadísticamente significativa con valores de CIM de penicilina entre 0,5 y 2 mg/l, no así con alguna patología, aunque se lo halló con mayor frecuencia en neumonías que en meningitis. Los serotipos 14 y 1 prevalecieron en niños menores y mayores de 2 años, respectivamente. La CIM de penicilina = 2 mg/l se observó más en neumonías que en meningitis. La frecuencia relativa de los diferentes serotipos hallados fue semejante a la observada en el período 1993-99; no obstante, los serotipos 18C, 4, 12F y 22F no se habían encontrado antes. La aparición de nuevos serotipos convierte en importante la vigilancia, dada la necesidad de formular vacunas que los incluyan y que efectivamente prevengan las infecciones neumocócicas más comunes.

Palabras clave: *Streptococcus pneumoniae*, distribución de serotipos, CIM de penicilina

ABSTRACT

Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from invasive infections at the Hospital de Niños of Santa Fe. The serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* varies through time. The introduction of pneumococcal conjugate vaccines showed a decreased prevalence of pneumococcal invasive isolates belonging to serotype 14 and an increase of serotypes not therein included. In 1993, the Hospital de Niños of Santa Fe began surveillance of the serotype distribution of invasive *S. pneumoniae* disease. In the period 2003 - 2005, 76 isolates were analysed by studying the correlation between serotype and pathology, age and MIC of penicillin. Serotype 14 was the most frequent followed by serotypes 1, 6B, 18C, 7F, 19 F and 5. Serotype 14 showed a statistically significant correlation with MICs of penicillin ranging from 0,5 to 2 mg/l. Although this serotype was more frequently observed in pneumonia than in meningitis, there was not a significant association with any particular pathology. Serotypes 14 and 1, were prevalent among children under and over 2 years old, respectively. Most of these isolates with MICs of penicillin = 2 mg/l, were from patients with pneumonia and not with meningitis. The serotype distribution was similar to that during the period 1993-99, with the exception of serotypes 18C, 4, 12F and 22F which had never been found before. The emergence of these serotypes makes it essential to continue surveillance to determine which conjugated vaccine formulation would be suitable to prevent the most frequent pneumococcal invasive infections.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, serotype distribution, MIC of penicillin

Los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que se presentan varían de acuerdo con la región, la edad y el transcurso de los años (1, 10).

En 1993, el grupo Sistema Regional para las Vacunas (SIREVA) de la Organización Panamericana de Salud comenzó un estudio en 6 países de América Latina (Argentina, Brasil, Colombia, Chile, Méjico y Uruguay) para identificar los serotipos y determinar el grado de resistencia a penicilina. Sólo el 58% de los serotipos aisla-

dos en estos países estuvieron representados en la primera vacuna conjugada *seven-valent vaccine* (PCV7) (3). En este estudio participaron 15 hospitales de niños de Argentina, entre ellos el de Santa Fe "Dr. O. Alassia", con resultados semejantes a los globales respecto a la distribución de serotipos, a excepción de los 23F y 18C, con muy escaso número y ausente, respectivamente (16).

La vacuna PCV7 confiere inmunización contra infecciones invasoras causadas por los serotipos 4, 6B, 9V,

14, 18C, 19F y 23F. La misma protege a los menores de 2 años contra ellas con una eficacia del 89-93% en la población estadounidense y del 71 al 86% en la europea (11).

Datos epidemiológicos muestran diferencias entre los serotipos encontrados en los países desarrollados de aquellos en vía de desarrollo, observándose, además, diferencias entre los que predominan en los países latinoamericanos (3).

El estudio de la prevalencia de los serotipos de *S. pneumoniae* de acuerdo con la edad de los pacientes ha sido ampliamente analizado. Existen datos en donde se demuestran diferencias entre los serotipos encontrados en adultos y niños (1) y en este último caso, entre los que se encuentran presentes en niños menores o mayores de 2 años (16).

Respecto a los cambios producidos con el transcurso de los años, se ha observado que durante las últimas cinco décadas ha habido una disminución gradual de infecciones producidas por los serotipos 1, 2 y 3, predominantes antes del advenimiento de los antibióticos.

En estudios realizados en Estados Unidos, se ha demostrado que cerca del 70% de las infecciones neumocócicas bacteriémicas son causadas por algunos serotipos (14). Esto indicaría que no todos serían igualmente invasores. El hecho de que los serotipos de *S. pneumoniae* presenten diferencias en su patogenicidad, hace importante su serotipificación.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se determinó la distribución de serotipos en los aislamientos obtenidos a partir de muestras biológicas provenientes de niños de 3 meses a 5 años afectados de neumonía o meningitis, atendidos en el Hospital de Niños "Dr. O. Alassia" en el período 2003-2005. De estos pacientes se estudiaron retrospectivamente las siguientes variables: edad (menor y mayor de 2 años), patología (neumonía y meningitis) y, para los aislamientos, se determinaron las CIM de penicilina (menor y mayor de 0,06 mg/l). Obtenidos estos datos, se analizaron la relación entre serotipos según patología y resistencia a penicilina; serotipos y edad; serotipos y CIM de penicilina; patología y CIM de penicilina.

Se estudiaron 76 aislamientos de *S. pneumoniae*, provenientes de cultivos de sangre (n=48), sangre y líquido pleural (n=6), sangre y líquido cefalorraquídeo (n=11), líquido cefalorraquídeo (n= 8) y líquido pleural (n=3), de pacientes pediátricos internados en el Hospital "Dr. Orlando Alassia" por neumonía (n=57), y meningitis (n=19). Se excluyeron aquellos aislamientos recuperados de otras patologías y de niños mayores de 6 años. Los aislamientos fueron serotipificados con la técnica de Quellung aplicando el esquema de Skov Sorensen (17).

Las CIM de penicilina fueron realizadas por el método de dilución en agar en laboratorios del INEI-ANLIS "Dr. C. Malbrán" según normas de CLSI y por E-test (AB

Biodisk, Suecia) en el laboratorio del Hospital "Dr. O. Alassia", siguiendo las instrucciones del fabricante.

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa EPIINFO 3.3.2. Para las variables cualitativas se utilizó prueba de chi-cuadrado con corrección de Yates. Como medida de asociación se usó Riesgo Relativo (RR) con un intervalo de confianza (IC) de 95%.

Los 76 aislamientos correspondieron a 17 serotipos diferentes. El predominante fue el 14, seguido del 1, 6B, 18C, 7F, 19 F, y 5. Algunos serotipos han sido encontrados en un solo año de estudio, como ocurre con 12F, 19A, 33, 4, 22F, y 9V.

En la Tabla 1 se muestra la distribución de serotipos, según la patología (neumonía y meningitis) y la resistencia a penicilina. Para clasificar los aislamientos por su resistencia a este antibiótico, en el caso de los obtenidos de cuadros de neumonía se aplicó el criterio correspondiente al Drug Resistance *Streptococcus pneumoniae* Working Group (DRSPWG) (8); y para los aislados de meningitis se aplicó el criterio del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (4).

En las neumonías se recuperó con mayor frecuencia el serotipo 14 (37%), seguido del 1 (19%), del 6B (7%) y 19 F (7%). En meningitis, no se observó el predominio de ningún serotipo. El serotipo 14 se recuperó en el 37% de neumonías y en el 16% de las meningitis, siendo esta diferencia estadísticamente no significativa ($p > 0,05$). Al analizar serotipos correspondientes a muestras provenientes de niños menores de 2 años, se observó una prevalencia del 14, seguido del 6B, 1, 5, 7F, 23F, 19A, 33F y 19F. En los mayores de esa edad prevaleció el 1, seguido, en orden decreciente, por los serotipos: 14, 6B, 5, 33F, y 3.

Trece de los 24 aislamientos del serotipo 14 (54%) presentaron CIM de penicilina, entre 0,5 y 1mg/l y diez (42%) CIM=2 mg/l y el restante aislamiento, menor a 0,06 mg/l.

Se encontró asociación significativa entre el serotipo 14 y CIM de penicilina $> 0,06$ mg/l ($p < 0,0000001$). Sus CIM fueron significativamente mayores que las observadas en los otros serotipos [RR= 6,23 (3,28 < RR < 11,85)]. Ningún serotipo mostró CIM de penicilina mayor de 2 mg/l. Los que presentaron CIM =2 mg/l, fueron el 14 y el 23F. Los serotipos 1, 18C, 5 y 3, fueron sensibles a penicilina, con CIM menores a 0,06 mg/l.

Hubo un 100% de concordancia entre los valores de CIM de penicilina obtenidos por el método de dilución en agar y por E-test.

De los 21 aislamientos del serotipo 14 provenientes de neumonía, 12 presentaron CIM=0,5 ó 1 mg/l y 9 CIM=2 mg/l. Valores que corresponden a las categorías de sensible e intermedio, respectivamente, según criterios de interpretación del DRSPWG (ver Tabla 1). Los 3 aislamientos serotipo 14, provenientes de meningitis, presen-

Tabla 1. Distribución de los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* según patologías y la resistencia a penicilina

Serotipos/ Serogrupos	Neumonía			Meningitis			Nº total		
	Número de aislamientos	Resistencia a penicilina (DRSPWG) ⁽²⁾			Número de aislamientos	Resistencia a penicilina (CLSI)			
		R	I	S		R		I	S
14	21		9	12	3	1	1	1	24
1	11			11	3			3	14
6B	4		4		2		2		6
18C	3			3	3			3	6
7F	2			2	3			3	5
19F	4			4					4
5	3			3					3
3	1			1	1			1	2
6A	1			1				1	2
15B	1			1			1		2
23F	1			1	1				2
12F	1			1					1
19A					1		1		1
33F	1			1					1
4	1			1					1
22F	1			1					1
9B	1			1					1
Total	57				19				76

taron CIM de 2, 1 y 0,06 mg/l. Valores que corresponden a las categorías de resistente, intermedio y sensible, respectivamente, según criterios de interpretación de CLSI (ver Tabla 1).

Diversos estudios han mostrado que la introducción de la vacuna PCV7 ha disminuido significativamente el número de infecciones invasoras neumocócicas causadas por serotipos contenidos en la misma, entre niños menores de 24 meses de edad (9). La mayor disminución se observó entre los aislamientos del serotipo 14. En cambio, aumentó el número de aislamientos de los serotipos no incluidos en la vacuna. Dentro de estos serotipos, el 15 y el 33 tuvieron el mayor incremento (6, 9).

En nuestro país no se ha observado una disminución importante del serotipo 14, una de las razones podría ser que la vacuna PCV7 es poco utilizable por su costo. Poehling KA *et al.* justifican la disminución de infecciones invasoras, al mostrar evidencias que la vacunación de los lactantes con PCV7 ha conducido a cambios de los serotipos de *S. pneumoniae* colonizantes de sus fauces (15). También Hanage *et al.* comunicaron que, en respuesta a la presión selectiva ejercida por la vacuna neumocócica conjugada, aumentó la portación de serotipos no incluidos en la vacuna, con sensibilidad disminuida a penicilina (7).

Los tres serotipos más frecuentemente hallados (14, 1, 6B), coincidieron con los más frecuentes del período 93-99, [ya publicado (12)] y con los comunicados por paí-

ses latinoamericanos (3). A partir del cuarto lugar en la distribución, hubo algunas variaciones en los dos períodos. El serotipo 18C, junto al 4 y 22F, aparecieron en el año 2003 por primera vez y no se hallaron los serotipos 9N, 13, 18B, 27 y 15, encontrados en el período 93-99. El serotipo 23F, generalmente asociado con penicilina resistencia y correspondiente a un clon que se extendió desde España hacia Francia y a los Estados Unidos, fue escasamente encontrado (2,1%) en nuestro país durante el período 1993-97 (14) y en dos de los 76 aislamientos estudiados.

Los cambios de serotipos observados en el presente estudio, durante el transcurso del tiempo, también fueron observados por otros autores. En España, Latorre comunicó nuevos serotipos: 4, 10, 18, 22 y 31 en un período comparado con otro anterior (10).

Si bien el serotipo 14 no mostró asociación estadísticamente significativa con alguna patología, prevaleció en niños afectados de neumonía. Este serotipo, con excepción de España y Pakistán, ocupa uno de los primeros lugares en la prevalencia mundial. Contrariamente, el serotipo 1 y fundamentalmente el 5, que en nuestro estudio ocupan el segundo y séptimo lugar, respectivamente, son excepcionalmente encontrados en Estados Unidos y en España (5). En Colombia, el serotipo 14 también ocupa el primer lugar pero el 1 fue mucho menos frecuente que en Argentina, ocupando el cuarto lugar (1). El 96% de los aislamientos del serotipo 14 presentaron

CIM de penicilina entre 0,5 y 2 mg/l. La CIM de penicilina igual a 2 mg/l se observó más en aislamientos provenientes de neumonías que en aquellos provenientes de meningitis.

El 74% de los aislamientos que presentaron CIM de penicilina mayor a 0,06 mg/l, correspondieron al serotipo 14, lo que muestra una asociación significativa con este valor de CIM. Esto coincide con el período antes estudiado (12) y con datos de Uruguay (13) y Brasil (2).

Respecto al RR hallado cuando se analizó la relación entre serotipo 14 y CIM de penicilina > 0,06 mg/l, se infiere que la probabilidad de encontrar CIM de penicilina > 0,06 mg/l en el serotipo 14 es 6 veces mayor que en otros serotipos, lo que implica que las neumonías o meningitis producidas por este serotipo constituyen un factor de riesgo para el paciente.

Antes del 2004, los 21 aislamientos del serotipo 14 provenientes de neumonía hubieran sido considerados resistentes a penicilina según los criterios de CLSI, pero actualmente son considerados sensibles según normas del DRSPWG. Con estos nuevos puntos de corte para neumonía, se observa una mejor correlación entre la evolución clínica del paciente tratado con ampicilina y la interpretación de resultados de las CIM a penicilina. En el Hospital de Niños "Dr. O. Alassia", la ampicilina sigue siendo, con algunas excepciones, el antimicrobiano de elección en el tratamiento empírico de la neumonía.

Las vacunas antineumocócicas son cada vez más utilizadas para prevenir las enfermedades invasoras. La formulación de la primera vacuna conjugada antineumocócica "heptavalente", no protege contra los serotipos 1, 7F, 5, 3 y 12F, los tres primeros muy frecuentes en nuestra región.

La aparición de nuevos serotipos, en el período en estudio demuestra la importancia de la vigilancia para detectar la emergencia de resistencia. La formulación de las nuevas vacunas debería incluir los serotipos prevalentes en el país, para prevenir las infecciones neumocócicas más frecuentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agudelo C, Moreno J, Sanabria O, Ovalle M, Di Fabio J, Castaneda E, Grupo Colombiano de Trabajo en *Streptococcus pneumoniae*. *Streptococcus pneumoniae*: serotype evolution and patterns of antimicrobial susceptibility in invasive isolates from 11 years surveillance (1994 -2004) in Colombia. *Biomedica* 2006; 26: 234-49.
2. Brandileone M, Vieira V, Casagrande S, Zanella R, Guerra M, Bokermann S, *et al*. Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from Brazilian children with invasive infections. Pneumococcal Study Group in Brazil for the SIREVA Project. Regional System for Vaccines in Latin America. *Microb Drug Resist* 1997; 3: 141-6.
3. Camargos P, Fischer G, Mocelin H, Dias C, Ruvinsky R. Penicillin resistance and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* in Latin America. *Paediatr Respir Rev* 2006; 7: 209-14.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Streptococcus pneumoniae*. Performance standards for dilution antimicrobial susceptibility testing, 2007; M7- S17. Wayne, Pa, USA.
5. Fenoll A, Bourgon C, Muiloz R, Vicioso D, Casal J. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Spain, 1979-1989. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 56-60.
6. Gonzalez B, Hulten K, Lamberth L, Kaplan S, Mason E Jr, and the U.S. Pediatric Multicenter Pneumococcal Surveillance Group. *Streptococcus pneumoniae* serogroups 15 and 33: an increasing cause of pneumococcal infections in children in the United States after the introduction of the pneumococcal 7-valent conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25: 301-5.
7. Hanage W, Huang S, Lipsitch M, Bishop C, Godoy D, Pelton S, *et al*. Diversity and antibiotic resistance among non-vaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* carriage isolates in the post-heptavalent conjugate vaccine era. *J Infect Dis* 2007; 195: 347-52.
8. Heffelfinger JD, Dowell SF, Jorgensen JH, Klugman KP, Mabry LR, Musher DM, *et al*. Management of Community-Acquired Pneumonia in the Era of Pneumococcal Resistance: A Report From the Drug-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Therapeutic Working Group. *Arch Intern Med* 2000; 160: 1399-408.
9. Kaplan S, Mason E Jr, Wald E, Schutze G, Bradley J, Tan T, *et al*. Decrease of invasive pneumococcal infections in children among 8 children's hospitals in the United States after the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics* 2004; 113: 617-8.
10. Latorre C. *Streptococcus pneumoniae* isolated from a paediatric population: changes in 10 years. *Acta Paediatr* 1998; 87: 940-4.
11. Luque Moreno A, Bergada Maso A, Sin Opi J, Liarte Guillen A, Mayol L, Macia J. Nonvaccine *Streptococcus pneumoniae* serotypes causing acute bacterial meningitis. *An Pediatr* 2006; 64: 170-2.
12. Mayoral C, Rossi A, Regueira M, Corso A, Pace J, Beltramino J, *et al*. Resistencia antimicrobiana y distribución de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* aislados de infecciones invasivas en el Hospital de Niños de Santa Fe. *Infect Microb Clin* 2000; 12: 104-9.
13. Mogdasy M, Camou T, Fajardo C, Hortal M. Twenty-two points, plus triple-word-score, plus fifty points for using all my letters. Colonizing and invasive strains of *Streptococcus pneumoniae* in Uruguayan children: Type distribution and patterns of antibiotic resistance. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11: 648-52.
14. Mufson MA. Enfermedades Infecciosas. En: Mandell G, Douglas R, Bennett J, Dolin R, editores. Principios y Prácticas. Buenos Aires, Argentina, Ed. Médica Panamericana, 1991, p. 1625-30.
15. Poehling K, Talbot T, Griffin M, Craig A, Whitney C, Zell E, *et al*. Invasive pneumococcal disease among infants before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *JAMA* 2006; 295: 1668-74.
16. Rossi A, Ruvinsky R, Regueira M, Corso A, Pace J, Gentile A, and the *Streptococcus pneumoniae* Working group. Distribution of capsular types and penicillin-resistance of strains of *S. pneumoniae* causing systemic infections in Argentinean children under 5 years of age. *Microb Drug Res* 1997; 3: 135-40.
17. Sorensen U. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2097-100.