

Serotipos y susceptibilidad a los antibacterianos de *S. pneumoniae* aislados de poblaciones infantiles (1987-1990)

Dres. María Hortal, Claudia Fajardo, Teresa Camou, Rosario Palacio, Carlos Pallas y Cristina Mogdasy

Resumen

Cepas de *S. pneumoniae* aisladas entre 1987 y 1990, de niños con neumonía, otitis media aguda o ambos, de la nasofaringe de pacientes con esas patologías y de controles sanos, fueron tipificadas y estudiada su susceptibilidad a la penicilina y cotrimoxazol.

Se determinó la presencia y frecuencia de los 83 serotipos de *S. pneumoniae* en las cepas invasivas ($n = 70$), en las que producían infecciones localizadas ($n = 12$) y en las que colonizaban la orofaringe ($n = 98$).

El serotipo 14 predominó entre las cepas invasivas (34.3%). Conjuntamente con los tipos 9V, 1, 3 y 5 constituyeron la mayoría (75.7%). En escaso número de pacientes, los serotipos de cepas aisladas de la sangre o de derrame pleural, coincidieron con los resultados de los cultivos de la orofaringe.

La resistencia a la penicilina fue baja en el total de cepas tipificadas (4.6%) y menor aún en las cepas invasivas (2.6%). Sólo 68.7% de las cepas fueron sensibles al cotrimoxazol. Las cepas resistentes a los fármacos mencionados no se asociaron a ningún serotipo en especial.

Se concluye que son pocos los serotipos que se asocian a las neumonías del niño, y que la resistencia a la penicilina, hasta el momento, no constituye una limitación para su uso.

Palabras clave: Neumonía. Infecciones neumocócicas. Infecciones del tracto respiratorio. *Streptococcus pneumoniae*. Otitis media.

Dra. María Hortal
Jefe Unidad de Microbiología e Investigador Principal Programas IRA.
Dra. Claudia Fajardo, Dra. Teresa Camou,
Dra. Rosario Palacio, Dr. Carlos Pallas
Asistentes de laboratorio por el Programa IRA.
Dra. Cristina Mogdasy
Jefe del Laboratorio Clínico de la Sociedad Española 1ª de Socorros Mutuos y colaboradora del Programa IRA.

Introducción

Aun hoy *S. pneumoniae*, continúa siendo uno de los principales patógenos bacterianos, responsable de meningitis y neumonías. La neumonía neumocócica cons-

tituye una seria amenaza para la vida de los niños en los países en desarrollo, y persiste como una importante causa de morbilidad en los países industrializados (1). También tiene relevante participación en la otitis media aguda del lactante y preescolar.

En algunos países, como Sudáfrica y España, se ha observado un aumento notorio de la multiresistencia de las cepas aisladas en los últimos años (2). Sin embargo, la circulación de esas cepas que pertenecen al serotipo 23F, tienen una distribución regional y su difusión a otras áreas, cuando se produce, es hasta ahora restringida.

Trabajo realizado en el Dpto. Laboratorios S. Pública, Div. Epidemiología, Ministerio de Salud Pública.
Correspondencia: Dra. M. Hortal
Avda. 8 de Octubre 2720
CP 11.600, Montevideo.
Recibido 8/V/92
Aceptado 30/7/92

Teniendo en cuenta esta peculiar situación epidemiológica, resulta oportuno revisar los resultados obtenidos en un estudio realizado en los últimos cuatro años, que cubrió diferentes grupos de niños, colonizados por *S. pneumoniae* o con procesos respiratorios agudos por este mismo agente.

En Montevideo, estudios prospectivos llevados a cabo entre 1987 y 1990, permitieron reconocer la distribución y frecuencia de serotipos de *S. pneumoniae* como agente etiológico de neumonías del niño menor de 5 años (3), su participación en la otitis media aguda (resultados no publicados), y su presencia colonizando el tracto respiratorio superior de pacientes con las patologías antes mencionadas y de niños sanos (4). El mismo estudio permitió, además, monitorear el comportamiento de las cepas aisladas frente a los antibacterianos y relacionarlo con los diferentes serotipos.

Material y método

Entre 1987 y 1990 se aislaron 275 cepas de *S. pneumoniae* como parte de estudios prospectivos realizados en diferentes poblaciones de niños. Las técnicas de identificación fueron las habituales (5): comportamiento frente a la optoquina con un halo ≥ 15 mm (Difco, 3/8"), e inmuno-diagnóstico mediante la identificación de los polisacáridos específicos con suero polivalente (Omni serum, Statens Seruminstitut, Dinamarca) por contrinmuno electrophoresis (CIE) o coagulación o ambos (CoA, Pharmacia).

La susceptibilidad a las penicilinas se exploró primariamente por el método de Kirby-Bauer modificado, con discos de oxacilina (Difco, 1 MCG), considerando resistentes aquellas cepas con halos < 20 mm. A los *S. pneumoniae* resistentes se les determinó la concentración inhibitoria mínima (MIC).

También por técnica de difusión en agar, se determinó la susceptibilidad al cotrimoxazol (trimetoprim-sulfametoxazol, Difco, 25 MCG), considerando resistentes a las cepas con halos ≤ 10 mm, y con resistencia intermedia a las que producían halos de 11 a 15 mm.

La serotipificación se realizó por CIE. En los casos en que la tipificación no se realizó enseguida del aislamiento, las cepas fueron conservadas en skim milk a -70°C , hasta que se completó el estudio. La primera aproximación a la tipificación se hizo enfrentando las cepas problema a nueve pools de sueros, cada uno de estos conteniendo mezclas de 7 a 11 antisueros, lo que permite cubrir los 83 serotipos. Una vez identificado el pool que daba una reacción positiva, se procedió de la misma manera, empleando por separado cada uno de los antisueros mono-específicos. Los pools y los sueros mono-específicos fueron producidos en el Statens Seruminstitut de Dinamarca, que es el Centro de Referencia para *S. pneumoniae* designado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Periódicamente, se enviaron a dicho Centro algunas de nuestras cepas para control de calidad, dilucidar problemas vinculados al diagnóstico del serotipo 14 y para completar la serotipificación con subtipos únicamente allí disponibles.

La colección de cepas así caracterizada se conserva

congelada para ulteriores estudios antigénicos, genéticos y de comportamiento frente a antibacterianos.

Los aspectos clínicos relacionados con los casos de los cuales se aisló *S. pneumoniae*, así como la evaluación de las técnicas de diagnóstico etiológico, serán objeto de un análisis aparte.

Resultados

Del total de cepas estudiadas ($n = 275$), 112 correspondieron a 1987, 62 a 1988, 49 a 1989, y 52 a 1990. Se realizó la serotipificación en toda las cepas invasivas, en las productoras de infecciones localizadas y en las aisladas de portadores sanos, así como en una muestra representativa de las cepas que colonizan las vías respiratorias altas de pacientes con IRA. La susceptibilidad a los antibacterianos fue explorada en la totalidad de los aislamientos a que se hace referencia.

En el cuadro I se muestra en orden decreciente la frecuencia de los serotipos de las cepas invasivas ($n = 70$), de las cepas de infecciones localizadas ($n = 12$), de las que colonizan a niños con IRA ($n = 69$), y las que se hallan en la rinofaringe de niños sanos ($n = 29$). El serotipo 14 representa 34.3% del total, que con el agregado de los serotipos 9V, 1, 3, y 5, constituyen la mayoría de los serotipos identificados hasta el momento (75.7%).

Se observa además, que 14 de los serotipos reconocidos en este estudio, aparecen únicamente colonizando la rinofaringe de pacientes y/o de niños sanos.

En el cuadro II, se presenta un ejemplo de la correlación existente entre serotipos de cepas invasivas y los correspondientes a *S. pneumoniae* aislados del tracto respiratorio superior del mismo paciente, así como la presencia de flora normal, o de otros agente potencialmente patógenos en otros de los casos. También se muestra que más de un serotipo pueden colonizar simultáneamente a un mismo individuo.

En el cuadro III se muestra el comportamiento de las cepas resistentes a la penicilina y el correspondiente serotipo; se establece una relación similar también para el cotrimoxazol. En el primer caso la frecuencia de la resistencia en el total de las cepas tipificadas es baja (4.6%), y los MICs de las cepas resistentes a la penicilina oscilaron entre 0.04 y 0.4 $\mu\text{g/ml}$. Si se considera solamente las cepas invasivas la resistencia es aun menor (2.9%). No sucedió lo mismo con el comportamiento de los *S. pneumoniae* frente al cotrimoxazol, cuya resistencia se evidenció en 31.3% de las cepas.

Discusión

La información presentada es fundamentalmente epidemiológica, apropiada para evaluar tendencias del comportamiento biológico en conjuntos de cepas. Por ese motivo, y por los recursos técnicos necesarios, este tipo de estudios no es apropiado ni necesario para realizarse en laboratorios de bacteriología clínica. Es por ello conveniente que la serotipificación y el monitoreo del comportamiento de *S. pneumoniae* frente a los antibacterianos se realicen en forma centralizada, para disponer a nivel nacional de esa información. Es un hecho demostrado

CUADRO I
Frecuencia de serotipos de *S. pneumoniae* aislados de diferentes localizaciones.

Serotipo	Cepas invas.	Cepa inf. localiz.	Coloniz. enfermos	Coloniz. sanos	Total
14	24	7	18	2	51
9V	7	1	8	—	16
6B	3	—	4	5	12
3	7	—	2	1	10
1	8	—	—	—	8
5	7	—	1	—	8
7F	4	—	3	1	8
6A	—	—	3	4	7
19A	1	—	3	2	6
23F	—	2	3	1	6
11A	—	1	4	1	6
19F	—	—	3	2	5
16F	—	—	3	1	4
21	—	—	3	—	3
23B	2	—	1	—	3
28A	—	1	1	1	3
4	2	—	1	—	3
15A	—	—	2	—	2
20	1	—	—	1	2
23A	—	—	—	2	2
33B	—	—	—	2	2
33F	1	—	1	—	2
35F	—	—	1	1	2
9N	1	—	—	—	1
10F	—	—	1	—	1
15C	1	—	—	—	1
15F	1	—	—	—	1
18C	—	—	—	1	1
24F	—	—	—	1	1
34	—	—	1	—	1
13	—	—	1	—	1
No tipif.	—	—	1	—	1
Total	70	14	69	29	180

que la prevalencia de los distintos serotipos sufre variaciones temporales, que varían además según los grupos etarios estudiados y las diferentes áreas geográficas.

Las cepas de *S. pneumoniae* del serotipo 14 fueron las más frecuentemente aisladas de niños con neumonía y otitis media aguda, verificándose una escasa participación de tipos como el 6, 19 y 23, que en otros países se asocian en alta proporción a estas patologías pediátricas (6). Barker y col (7), estudiando la historia natural de la infección neumocócica en una cohorte de niños seguidos desde el nacimiento, llegó a la conclusión que las cepas más invasivas no eran las que colonizaban habitualmente el tracto respiratorio superior de los niños. Los datos consignados en el cuadro I concuerdan con esas afirmaciones. Es de destacar el hecho que la mayoría de

los serotipos identificados en el presente estudio, se encuentran representados en la vacuna que inmuniza frente a 23 polisacáridos específicos (8).

En 73.7% de los casos bacteriémicos por serotipo 14, no se demostró la presencia del mismo tipo en las vías respiratorias altas; dicho de otro modo, en la mayoría de los pacientes, los cultivos del exudado faríngeo mostraron la presencia de una flora normal, de un serotipo diferente del aislado de la sangre o del derrame pleural, u otro agente. Sucedió algo similar con los serotipos de menor frecuencia. Esa baja correspondencia de los serotipos reconocidos en las cepas invasivas con su homólogo aislado de las vías respiratorias altas, recalca la imposibilidad de extrapolar, en niños con neumonía, los resulta-

CUADRO II
Correlación de aislamientos del medio interno y de las vías respiratorias altas

Nº casos	Serotipo C. invasivas*	Ex. Faríngeo Cultivo	Serotipo
3	14	S. pneumoniae	14
2	14	S. pneumoniae	no tipificado
11	14	Flora normal	no corresponde
1	14	H. influenzae	no corresponde
1	14	S. pneum. + H. infl.	6A
1	14	S. pneumoniae	21
2	9V	S. pneum. (1 + H. infl.)	9V
3	9V	Flora normal	no corresponde
4	5	Flora normal	no corresponde
1	5	S. pneum + H. infl.	5
1	3	S. pneumoniae	3
2	3	Flora normal	no corresponde
2	7F	Flora normal	no corresponde
1	4	S. pneumoniae	4, 7F y 1a
1	4	Flora normal	no corresponde
1	6B	S. pneumoniae	no tipificado
1	1	Flora normal	no corresponde
1	33F	Flora normal	no corresponde

* Hemocultivo o derrame pleural

CUADRO III
Sensibilidad de *S. pneumoniae* a la penicilina y al cotrimoxazol

	14	V	6A	11A	1	4	19A	19F	6B	15C	23B	16F	23F	33F	NT*
R a penicilina	1										1		1		
ox R cotr S															
ox R cotr I				2											
ox R cotr R							1		1						1
R a cotrimox.	14	9	4	2	1			1	1						1
ox S cotr R															
ox S cotr I	7	2	1	1	2	2				1		1			
Total	22	11	5	5	3	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1

NT: No tipificados
R: resistentes
Ox: oxacilina

S: sensibles
Cotr: cotrimoxazol
I: intermedio

dos obtenidos por cultivo de exudado faríngeo, para presumir la etiología del proceso intratorácico.

También se pudo comprobar que a veces las vías respiratorias altas pueden estar colonizadas por más de un serotipo de *S. pneumoniae*. Según algunos autores, las cepas más frecuentemente invasivas, cuando recién colonizan a un individuo tienen más posibilidades de invadir y causar enfermedad (9). En los estudios realizados sólo se pudo verificar la presencia de *S. pneumoniae*, pero no fue posible establecer la secuencia con que se instaló en la orofaringe, ni el período durante el cual un niño estuvo colonizado. No obstante, resulta llamativo que el serotipo 14 se halla casi exclusivamente en hisopados faríngeos de pacientes y no de niños sanos. El número reducido de controles estudiados (n = 29) obliga a plantear en forma provisoria este hecho que surge de los datos disponibles.

El cuadro III permite apreciar la baja frecuencia de resistencia a la penicilina hallada tanto en las cepas serotipifi-

cadas (4.6%), como en las cepas invasivas (2.9%). A pesar del predominio del serotipo 14, únicamente una de las cepas fue resistente a la penicilina, distribuyéndose las restantes entre 7 serotipos diferentes. Los MICs comprobados, si bien indican resistencia a la penicilina, su nivel es menor que las concentraciones establecidas en cepas aisladas en otros países (10). La susceptibilidad al cotrimoxazol fue observada en casi la tercera parte de los aislamientos. No se observó, sin embargo, el predominio de un serotipo ligado a una resistencia selectiva para un antibiótico o a multiresistencia, como ocurre en algunos países con el serotipo 23F (10).

Según los datos consignados hasta el presente, es posible concluir que la penicilina sigue siendo el fármaco de elección para el tratamiento de las neumonías, ya que su resistencia es poco frecuente y que las cepas resistentes tuvieron MICs relativamente bajos. No por ello se debe dejar de señalar la conveniencia de mantener a nivel

nacional un monitoreo continuo del comportamiento de los *S. pneumoniae* frente a los antibacterianos. También corresponde destacar que un número restringido de serotipos se halla ligado a los cuadros clínicos provocados por cepas invasivas, pero que la frecuencia de estas en las vías respiratorias superiores es relativamente baja como para ejercer una vigilancia efectiva mediante el estudio de niños portadores del agente.

Agradecimientos: A las Dras. A. Suárez, C. Deleón y L. Palma por la captación y caracterización clínica de los casos, al Dr. J. Henrichsen por su colaboración en la tipificación de las cepas, y a la Swedish Agency for International Research Development, SAREC, por la financiación de estos estudios.

Résumé

Entre 1987-1990, des cèpes de *S. pneumoniae* isolées chez des enfants à pneumonie et/ou otite moyenne aigue, du nasopharynx de patients ayant ces pathologies et de contrôles sains, furent typifiées et leur susceptibilité à la pénicilline et le cotrimoxazol fut étudié.

Il fut déterminé la présence et la fréquence des 83 sérotypes de *S. pneumoniae* aux cèpes envahissantes (n = 70), celles qui provoquaient des infections locales (n = 12) et celles qui colonisaient l'oropharynx (n = 98).

Ce fut le sérotype 14 qui prédomine parmi les cèpes envahissantes (34.3%). Avec les types 9V, 1, 3, et 5, ils furent les plus nombreux (75.7%). Chez peu de patients, les sérotypes de cèpes isolées du sang ou l'épanchement pleural, coïncidèrent avec les résultats des cultures de l'oropharynx.

La résistance à la pénicilline fut basse pour toutes les cèpes typifiées (4.6%) et encore plus basse pour les cèpes envahissantes (2.6%). Seulement 68.7% des cèpes fut sensible au cotrimoxazol. Les cèpes résistants aux drogues évaluées ne furent associées à aucun sérotype spécial.

On tire comme conclusion qu'il y a peu de sérotypes pouvant être associées aux pneumonies de l'enfant, et que la résistance à la pénicilline n'est pas un empêchement pour son emploi.

Summary

S. pneumoniae strains isolated between 1987 and 1990, from children with pneumonia or acute otitis media, from the nasopharynx of patients or healthy controls, were typed and their susceptibility to penicillin and to cotrimoxazol evaluated.

The presence and frequency of the 83 *S. pneumoniae* serotypes was explored among the invasive strains (n = 70), the ones producing localized infections (n = 12), and those colonizing the upper respiratory tract (n = 98).

Among the invasive strains, serotype 14 was the most frequent (34.3%), and adding serotypes 9V, 1, 3, and 5 were majority (75.7%).

In few patients strains isolated from the blood or the pleural fluid had the same serotype as the ones obtained from the oropharynx.

Resistance to penicillin was low (4.6%), but this was not the case for cotrimoxazol (31.3%). Resistance was not associated to any serotype in particular.

It is possible to conclude that to date, few serotypes are related to severe infections, and that resistance to penicillin does not interfere with its use for the pneumonia treatment.

Bibliografía

1. **Berman S.** Epidemiology of acute respiratory infections in children of developing countries. *Rev Infect Dis* 1991; 13 (suppl 6): 454-62.
2. **Muñoz R et al.** Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1991; 164: 302-6.
3. **Hortal M, Mogdasy C, Russi JC, Deleón C, Suárez A.** Microbial agents associated with pneumonia in children from Uruguay. 1990. *Rev Infect Dis* 12 (suppl 8): S915-22.
4. **Mogdasy C, Camou T, Fajardo C, Hortal M.** Colonizing and invasive strains of *S. pneumoniae* in children from Uruguay: type distribution and patterns of antibiotic resistance. *Pediatr Infect Dis J* 1992 (en prensa).
5. **Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ.** Manual of microbiology. 4th ed Washington: ASM, 1985.
6. **Austrian R.** Epidemiology of pneumococcal capsular types causing pediatric infections. *Pediatr Infect Dis J* 1989; 8: S21-S22.
7. **Barker J et al.** Pneumonia in children in the eastern highlands of Papua New Guinea: a bacteriologic study of patients selected by standard clinical criteria. *J Infect Dis* 1989; 159: 348-51.
8. **Smart LE, Platt DJ, Timbury MC.** A comparison of the distribution of pneumococcal types in systemic disease and the upper respiratory tract in adults and children. *Epidemiol Infect* 1987; 98:203-09.
9. **Harry BM, Dillon HC.** Natural history of pneumococcal infections. *Pediatr Infect Dis J* 1989; 8: S23-S25.
10. **Coffey TJ et al.** Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 1991; 5: 2255-60.