

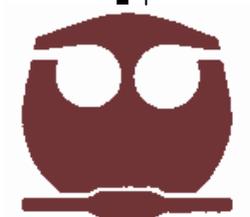


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

LA ACTUAL IMPORTANCIA DE
Streptococcus pneumoniae
EN SALUD

TRABAJO MONOGRÁFICO DE
ACTUALIZACIÓN
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
PRESENTA:
MARIA DEL CONSUELO OVALLE
MARTINEZ



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

| | |
|---------------|--------------------------------------|
| Presidente | Prof. Saturnino de León Chapa |
| Vocal | Prof. Raúl Garza Velasco |
| Secretario | Prof. Adriana Guadalupe Mejía Chávez |
| 1er. Suplente | Prof. Alejandro Camacho Cruz |
| 2º. Suplente | Prof. Norma Trejo Medina |

Sitios donde se desarrolló el tema:

Biblioteca de la Facultad de Química UNAM, Biblioteca del Colegio de Medicina de la Universidad de Cincinati, Biblioteca del Colegio de Farmacia de la Universidad de Cincinati y otras diversas bibliotecas de los sectores académicos y de salud.

QFB. Raúl Garza Velasco

Asesor

María del Consuelo Ovalle Martínez

Sustentante

DEDICATORIAS

A Dios: Por regalarme la vida y permitirme despertar cada día rodeada de amor.

A mi Madre:

MA. DEL CONSUELO MARTINEZ ARANDA

por ser ejemplo de constancia, valor y superación y por el amor e inmenso apoyo recibido a lo largo de mi vida y en especial durante mi formación profesional. **GRACIAS, TE QUIERO MUCHO.**

A ANTONIO:

Por la maravillosa experiencia de compartir el camino con un hombre íntegro y admirable y porque tu amor y comprensión incondicional en todo momento, me impulsan a lograr mis más grandes metas. **TE AMO.**

A ANI, FABI Y RAFA:

Por todos los momentos de inmensa felicidad y armonía que hemos vivido juntos y ser mis grandes amigos. **LOS QUIERO MUCHO**

AGRADECIMIENTOS

A mis abuelitos, Mica y Manuel, que aunque no físicamente siempre están conmigo en todos los momentos difíciles y alegres.

A toda la Fam. Villagómez Amezcu, por todo su cariño y desde siempre haberme hecho parte de la familia.

Al QFB Raúl Garza Velasco, por confiar en mi y darme su valiosa ayuda, paciencia, dirección y guía en la realización de este trabajo.

A la Facultad de Química.

A todos y cada uno de mis maestros, por los consejos y conocimientos transmitidos a lo largo de mi carrera.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 7 |
| OBJETIVOS | 9 |
| GENERALIDADES | 10 |
| Componentes de superficie | 11 |
| Características microscópicas | 16 |
| Cultivo | 18 |
| Identificación en el laboratorio | 21 |
| Serotipificación | 26 |
| FACTORES NEUMOCÓCCICOS DE VIRULENCIA | 27 |
| Cápsula | 28 |
| Pared celular | 31 |
| Proteínas neumocóccicas | 33 |
| Neumolisina | 34 |
| Proteína A de superficie neumocóccica | 36 |
| Proteína C de superficie neumocóccica | 37 |
| Autolisina | 38 |
| Relación entre los diferentes mecanismos de virulencia | 38 |
| PATOLOGÍA | 41 |
| a) Entidades clínicas causadas por <i>S. pneumoniae</i> | 43 |
| Neumonía | 44 |
| Otitis Media | 48 |
| Sinusitis | 50 |

| | |
|---|------------|
| Bacteremia | 54 |
| Meningitis | 56 |
| Artritis | 58 |
| Endocarditis | 59 |
| b) Epidemiología y distribución de serotipos | 61 |
| c) Inmunología | 70 |
| d) Tratamiento | 80 |
| Neumonía | 90 |
| Otitis media | 93 |
| Sinusitis | 94 |
| Bacteremia | 95 |
| Meningitis | 97 |
| Endocarditis | 99 |
| e) Prevención: vacunas | 100 |
| | |
| DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO | 120 |
| Detección antigénica | 125 |
| Serología | 126 |
| PCR | 127 |
| PCR en tiempo real o cuantitativa | 134 |
| | |
| CONCLUSIONES | 142 |
| | |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 145 |
| | |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 147 |

INTRODUCCIÓN

Streptococcus pneumoniae es una bacteria patógena de especial interés mundial, aunque forma parte de la microflora habitual de una considerable cantidad de adultos. Sin lugar a dudas, representa una de las principales causas de neumonía entre los diferentes grupos poblacionales, afectando aún más a niños y adultos mayores, frecuentemente después de que han padecido alguna infección viral o de que han experimentado lesiones previas en el tracto respiratorio superior. Este microorganismo también es un sobresaliente agente causal de meningitis infantil, bacteremia, otitis media y otras diversas patologías que afectan al humano (144).

Desafortunadamente, el neumococo se cuenta entre las bacterias capaces de adquirir multirresistencia a antibióticos, lo que nuevamente lo ha convertido en un problema grave de salud pública. (121). De hecho, ello ha provocado que la meningitis causada por *S. pneumoniae* sea aún más peligrosa en la actualidad que en el pasado (171).

A partir de 1987 ha ocurrido un claro incremento en los casos de las distintas neumococcias (198), a pesar de los avances logrados en cuanto al tratamiento antibiótico y los cuidados intensivos (121).

Ante esta nueva realidad, se ha vuelto particularmente relevante el conocimiento de los factores de virulencia que determinan la dinámica de la patogénesis asociada a las enfermedades invasivas, a fin de establecer su diagnóstico y tratamiento en alguna etapa de las etapas correspondientes (78): es claro que los avances logrados en este campo derivarán en el desarrollo de métodos de diagnóstico efectivos y más oportunos los cuales, a su vez, permitirán realizar la prognosis en los pacientes afectados, determinar con mayores bases los medicamentos adecuados para la terapéutica, diseñar vacunas razonadas anti-neumococos y optimizar la vigilancia epidemiológica tendiente a prevenir la propagación de los brotes debidos a *S. pneumoniae* (35).

OBJETIVOS

- Describir las principales características microbiológicas de los neumococos y las pruebas más importantes relacionadas con su identificación confiable en el laboratorio de Infectología.
- Señalar los factores neumocócicos de virulencia más relevantes, asociándolos a las neumococcias.
- Mencionar los aspectos trascendentales de las enfermedades más graves y frecuentes ocasionadas por *S. pneumoniae* a la comunidad y a la población intrahospitalaria, subrayando los regímenes terapéuticos más adecuados y las medidas para su prevención.
- Describir las principales pruebas empleadas actualmente para establecer el diagnóstico de las neumococcias, haciendo énfasis en los fundamentos implicados.

I. GENERALIDADES

El género *Streptococcus* incluye una amplia variedad de cepas, con hábitats muy diversos y actividades de considerable importancia práctica, destacando el hecho de que algunos de sus miembros son patógenos frecuentes para el humano y los animales (144,169).

Estos microorganismos constituyen un grupo que comparte numerosas similitudes en cuanto a sus características antigénicas, bioquímicas, hemolíticas y culturales. La hemólisis en agar sangre de carnero es relevante para la subdivisión del género: las cepas que producen estreptolisina O y/o S se encuentran rodeadas por una zona de hemólisis completa en las placas de agar sangre de carnero. Por otro lado, una parte de los estreptococos no produce hemólisis aunque origina una zona verde o café alrededor de sus colonias, lo cual se debe a una decoloración y a la pérdida de potasio de los eritrocitos presentes en el medio; la reacción ha sido denominada alfa-hemólisis (96).

El género también se ha dividido en grupos inmunológicos, con base en la presencia de carbohidratos específicos; estos grupos antigénicos o de Lancefield son designados por letras y, actualmente, se conocen desde la A a

la O. Los estreptococos beta-hemolíticos asociados al hombre por lo general presentan el antígeno del grupo A, un polímero de la pared celular que contiene N-acetilglucosamina y ramnosa; así mismo, los de origen fecal pertenecen al grupo D, con un ácido glicerol teicoico que contiene glucosa en cadenas laterales. Los del grupo B se encuentran a menudo en los animales y son causa de mastitis en las vacas y, los que se encuentran en la leche, presentan antígenos del grupo N. *S. pneumoniae* no posee antígenos de Lancefield y, por lo tanto, no se clasifica en grupo alguno; por otra parte, el término estreptococos Viridans se aplica a las especies alfa-hemolíticas exceptuando al neumococo (96, 199).

Streptococcus pneumoniae es un patógeno humano importante, al que se le reconoció como causa principal de neumonía en los años 1880s y, desde entonces, ha sido objeto de numerosos estudios relacionados con inmunidad humoral. Su nombre original fue *Diplococcus pneumoniae* (1926) debido a la apariencia característica que presentaba en placas de esputo teñidas al Gram. Sin embargo, en 1974 tomó el nombre de *Streptococcus pneumoniae* en virtud de que llega a crecer formando cadenas en medios líquidos se le conoce informalmente como pneumococo (169).

Componentes de superficie

S. pneumoniae ha sido uno de los microorganismos estudiados más extensamente desde su aislamiento en 1881 y las numerosas investigaciones

sobre él han conducido a importantes descubrimientos científicos. En 1928, Griffith observó que al inyectar ratones, tanto con neumococos capsulados muertos (tratados con calor), como con alguna cepa viva no capsulada, esta última se transformaba en capsulada, con el mismo tipo capsular de los microorganismos muertos (212). Años más tarde, a la naturaleza de este “principio transformador” o portador de información genética se le llamaría ADN (11).

Otros descubrimientos importantes surgidos del estudio de los neumococos incluyen a la eficacia terapéutica de la penicilina, al papel de la cápsula bacteriana en la resistencia a la fagocitosis, a la capacidad de los polisacáridos para inducir la formación de anticuerpos, a la primera demostración de tolerancia antígeno específica o falta de respuesta inmunológica, al descubrimiento de los linfocitos T y al uso de antígenos polisacarídicos como vacunas (12, 64).

Cabe señalar que, a pesar de la gran cantidad de publicaciones sobre *S. pneumoniae*, aún quedan numerosas preguntas por resolver acerca de su virulencia y que este patógeno continúa representando un importante agente causal de enfermedades graves en humanos, en especial de neumonía adquirida en la comunidad (98). Además, en los países en vías de desarrollo, el neumococo es responsable de la muerte de un gran número de niños menores de 5 años, debido a la neumonía neumocócica y no obstante que se están desarrollando vacunas mejoradas contra el microorganismo (184).

La superficie de las células neumocócicas muestran tres capas principales: la membrana plasmática, la pared celular y la cápsula. A su vez, la pared celular está formada por tres envolturas de peptidoglicanos en donde se anclan los polisacáridos capsulares, así como los azúcares polisacáridos y posiblemente algunas proteínas de la pared celular. La cápsula es la capa más gruesa, que protege por completo las estructuras internas de los neumococos (192).

Aunque los polisacáridos de pared celular son comunes a todos los serotipos neumocócicos, la estructura química de los azúcares capsulares es específica para cada serotipo (206).

Cápsula. La cápsula de los neumococos está formada por polímeros de alto peso molecular constituídos a su vez por unidades repetitivas de oligosacáridos que pueden contener entre dos y ocho monosacáridos (98).

Numerosos serotipos poseen componentes ácidos (como el ácido D-glucurónico o grupos fosfato), ribitol o arabinitol (206). La fosforilcolina también se asocia a los polisacáridos capsulares (193).

Una vez fuera de las mucosas, las cepas capsuladas son mucho más virulentas que las no presentan cápsula, ya que la cápsula interfiere la fagocitosis leucocitaria e impide la libre difusión de las proteínas del complemento hasta la pared celular.

Se sabe que existen 90 serotipos capsulares distintos, lo que explica el porqué la bacteria es tan común en la población general. La cápsula es relativamente inerte, pues al poner en contacto a los polisacáridos implicados con el tejido pulmonar o en el espacio subaracnoideo no ocurre respuesta inflamatoria alguna (98, 193).

Pared celular. En contraste con lo observado en los polisacáridos capsulares, la pared celular sí es un potente inductor de la inflamación; de hecho, se ha comprobado en modelos experimentales que el contacto entre sus componentes y el hospedero llega a reproducir muchos de los síntomas presentes en las diferentes entidades clínicas provocadas por *S. pneumoniae* (139).

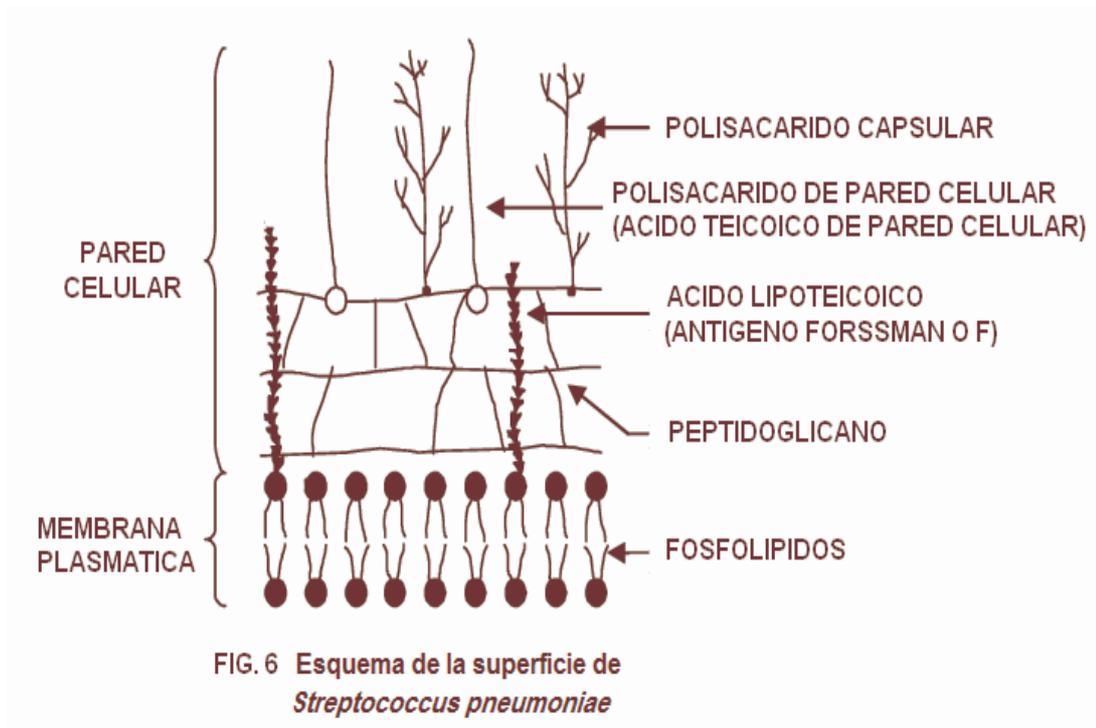
La pared celular neumocócica consta de seis capas y se compone principalmente de peptidoglicanos, es decir, de cadenas de glicanos en que se alternan residuos ácidos de N-acetilglucosamina, eslabonados entre sí por medio de cadenas peptídicas laterales (106, 139).

Los polisacáridos de la pared celular neumocócica forman un complejo con el ácido teicoico, el cual contiene residuos de fosforilcolina y permanece unido a los peptidoglicanos por medio del ácido N-acetilmurámico (aproximadamente cada 3 residuos) (95, 200). Los polisacáridos capsulares también se anclan a los peptidoglicanos y, aunque la unión entre estos dos componentes aún no

ha sido bien determinada, se piensa que probablemente sea de naturaleza covalente (95, 106, 200).

Los residuos de fosforilcolina de los polisacáridos de la pared celular resultan “clave” para la invasión, pues actúa como adhesina y sitio de unión para las proteínas acarreadoras de colina. Además, fungen como región de reconocimiento para la enzima N-acetilmurámico L-alaninamidasa cuya función es la de escindir los peptidoglicanos en cadenas separadas de glicano y péptidos, separando a la alanina y del ácido N-acetilmurámico. Esta enzima está involucrada en el proceso de división celular, aportando la ruptura de peptidoglicanos, y también se le conoce como autolisina, ya que induce la lisis de los neumococos durante la fase estacionaria de crecimiento (200).

Otra estructura importante, el ácido lipoteicoico o antígeno Forssman, es similar a los polisacáridos de pared celular, con material lipídico unido de forma covalente. Este antígeno se encuentra insertado en la membrana plasmática -gracias a su solubilidad lipídica- es un potente inhibidor de la autolisina y sus residuos de fosforilcolina están involucrados en la interacción específica con la autolisina (192, 200). Durante la fase estacionaria, las células neumocócicas liberan el antígeno de Forssman, lo que se traduce en la pérdida de este inhibidor enzimático y en una libre actividad de la autolisina, lo que termina destruyendo la pared celular y, por ende, provocando la lisis bacteriana (91).



Características microscópicas

Los neumococos son microorganismos Gram positivos que semejan cocos elongados con una terminación ligeramente puntiaguda (en forma de lanceta) (consultar las Figuras 1 y 2). Normalmente se les encuentra en pares (diplococos), aunque también puede observarseles individualmente o en cadenas cortas (96). Las células individuales miden entre 0.5 y 1.25 micrómetros de diámetro, no forman esporas ni tienen movilidad y, al igual que otros estreptococos, no producen catalasa y fermentan la glucosa produciendo ácido láctico. A diferencia de otras especies, no presentan

proteína M, hidrolizan inulina y la composición de su pared celular es característica en lo que se refiere a sus peptidoglicanos y al ácido teicoico (96, 199).

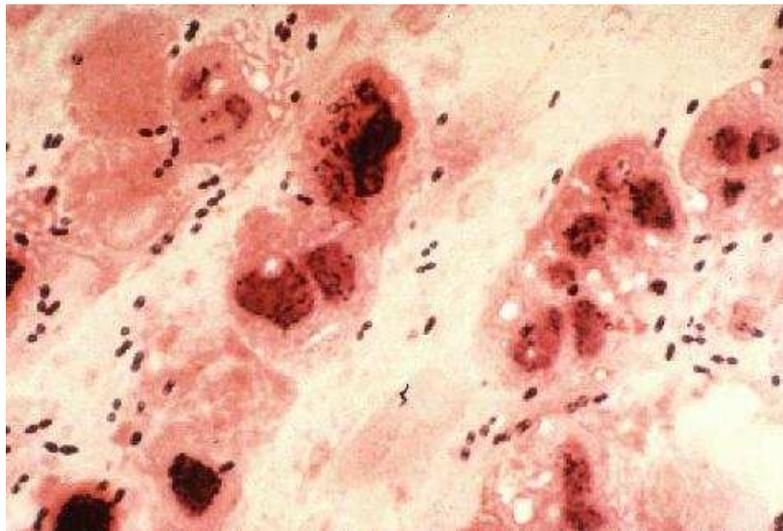


Figura 1. *S. pneumoniae* al Gram (Muestra de esputo en un caso de pulmonía)



Figura 2. *Streptococcus pneumoniae* al microscopio electrónico.

Cultivo

Streptococcus pneumoniae crece mejor en medios enriquecidos (placas de agar sangre de carnero) y a incubaciones con 5% de bióxido de carbono. En todos los casos, el microorganismo requiere de alguna fuente de catalasa (sangre u otros sustratos), para neutralizar las grandes cantidades de peróxido de hidrógeno producidas por el metabolismo bacteriano. En los medios complejos que contienen sangre, la bacteria se duplica en un tiempo de 20 a 30 minutos a 37°C (145, 199).

Por lo que se refiere a su morfología colonial, ésta varía dependiendo del grado de capsulación del microorganismo. En agar sangre, los neumococos crecen como colonias brillantes de aproximadamente 1 mm de diámetro (ver figura 3), si bien las cepas con cápsulas mayores presentan colonias grandes, grisáceas, de varios milímetros de diámetro y con apariencia mucoide. Por su lado, las cepas con cápsulas menores suelen dar lugar a colonias más pequeñas (145).



Figura 3. *S. pneumoniae* en agar sangre. Morfología colonial

Los neumococos sufren espontáneamente de una fase de variación determinada genéticamente, en la que las colonias cambian de opacas a transparentes. Las diferencias en cuanto a la opacidad correlacionan con su patogenicidad y virulencia (159). En diversos estudios realizados con modelos animales se ha observado que la variante transparente es más capaz de colonizar la nasofaringe de las ratas neonatas, mientras que la variante opaca es conocida por su sobrevivencia en sangre, lo cual se asocia a una mayor virulencia durante las infecciones sistémicas tales como la peritoneal. La base química de la diferente apariencia entre las colonias aún es desconocida, pero se han observado diferencias significativas en la expresión proteica de superficie entre los dos tipos de colonias; por ejemplo, las variantes transparentes suelen presentar cantidades mayores de ácido teicoico en la pared celular y, las variantes opacas, parecen obedecer a una mayor producción de polisacárido capsular (159).

Streptococcus pneumoniae es un microorganismo anaerobio facultativo y normalmente se le cultiva en medios que contienen sangre; produce una neumolisina que descompone a la hemoglobina en un pigmento verde llamado biliverdina, que se manifiesta como una zona verde muy amplia alrededor de las colonias. Esta propiedad se sigue reconociendo como alfa-hemólisis, aunque en realidad no es la lisis de eritrocitos lo que la produce. Prueba de ello es que también se observan zonas verde amarillentas rodeando a las colonias en agar chocolate, medio de cultivo en el cual los eritrocitos se lisan durante la preparación. Esta zona de alfa-hemólisis diferencia a *S. pneumoniae* de los estreptococos del grupo A o beta-hemolíticos, pero no de los estreptococos comensales alfa-hemolíticos (*S. viridans*), cohabitantes del tracto respiratorio superior (Figura 4). La distinción entre neumococos y los estreptococos *viridans* puede realizarse mediante pruebas especiales tales como la fermentación de inulina, la solubilidad en bilis y la sensibilidad a la optoquina (199).

Los neumococos tienen la capacidad de dañar y desintegrar sus propias células, vía la acción de una enzima llamada autolisina, la cual degrada al péptidoglicano. Su papel fisiológico consiste en provocar la lisis de los cultivos que se encuentran en la fase estacionaria. Esta autolisina puede jugar un papel directo en la virulencia del microorganismo, ya que origina la liberación de componentes de la pared celular que han demostrado ser altamente inflamatorios en algunos modelos animales (203, 204). Además, se ha sugerido que la autolisina tiene un papel indirecto en la patogénesis, pues al

propiciar la lisis celular promueve la liberación de factores de virulencia tales como la neumolisina, la cual no es liberada activamente por la célula microbiana (97, 139).

Virtualmente todos los cultivos clínicos de pneumococos contienen esta autolisina y entran en etapa de autólisis dentro de las primeras 18 a 24 horas posteriores a su cultivo bajo condiciones óptimas. Esta autólisis puede observarse mediante el cambio en la morfología colonial: las colonias aparecen lisas y planas inicialmente, y posteriormente empiezan a colapsarse en el centro (199).

Identificación en el laboratorio

Los criterios mínimos para identificar a los neumococos incluyen a la prueba de solubilidad en bilis o a la de sensibilidad a la optoquina, previa realización de frotis al Gram y de observar la actividad hemolítica de las colonias sospechosas (169).

Evidentemente, cuando un microorganismo facultativo Gram positivo da negativa la prueba de la catalasa, debe presumirse su pertenencia al género *Streptococcus* y considerar sus patrones hemolíticos en agar sangre. Algunas cepas de neumococos llegan a presentar beta-hemólisis cuando se les incuban en condiciones de anaerobiosis, debido a la acción de una hemolisina lábil en presencia de oxígeno (169) (Figura 4).



Figura 4. Estreptococos alfa y beta hemolíticos

Cuando un estreptococo se manifiesta como alfa-hemolítico es preciso determinar si se trata o no de *Streptococcus pneumoniae*. Típicamente, los neumococos sufren lisis cuando entran en contacto con bilis u optoquina (clorhidrato de etil-hidrocupreína), lo cual no ocurre en el resto de los estreptococos alfa-hemolíticos. La optoquina es un derivado de la quinina y se utiliza para diferenciar al neumococo de los otros estreptococos *viridans* con una sensibilidad mayor al 95%, debido a que inhibe selectivamente el crecimiento del primero a concentraciones muy bajas, de 5 µg/mL o menores (105, 199).

La prueba de la optoquina se realiza en placas de agar sangre a las cuales se agrega un disco impregnado con la quinina (disco P), previa siembra del microorganismo problema en forma masiva. El cultivo se incuba y se examina después de 18 a 24 horas, después de las cuales se realiza la lectura

correspondiente: los neumococos se habrán lisado en la cercanía del disco, creándose una zona de inhibición alrededor de él (Figura 5) (105).

La zona de inhibición debe ser de 14 mm o mayor, alrededor de un disco de 6 mm. Si dicha zona es menor será necesario efectuar otras pruebas tales como la de solubilidad en bilis o reacciones serológicas para la identificación del microorganismo (105, 199).



Figura 5. Prueba de la optoquina en agar sangre con *S. pneumoniae*

La adición de bilis y en particular de sales biliares tales como el desoxicolato o el taurocolato sódicos, acelera la reacción autolítica natural observada en los cultivos de neumococos (199).

La prueba se realiza agregando una solución de sales biliares a un cultivo líquido o a una placa con el microorganismo problema. En el caso del cultivo líquido, se agrega una solución de sales biliares al 2%, se reincuba por un periodo máximo de 3 horas a 35-37°C y se observa comparándose contra un tubo control: el resultado se considera positivo cuando desaparece la turbidez del cultivo. Cuando la prueba se lleva a cabo en placa, las sales biliares se agregan directamente sobre la colonia, se incuba a temperatura ambiente y el resultado se observa después de 30 minutos: las colonias pueden desaparecer por completo, dejando únicamente sus halos de alfa-hemólisis, o bien, experimentar un aplanamiento y depresión centrales. Es importante subrayar que la prueba en placa debe realizarse exclusivamente en cultivos frescos puesto que, como se mencionó anteriormente, la autólisis se inicia de forma natural después de 18-24 horas (105). Se ha encontrado que aproximadamente sólo un 85% de las cepas neumocóccicas se lisan por completo con la adición de sales biliares, por lo que puede ser necesario efectuar pruebas serológicas adicionales que complementen la identificación (105, 199). A continuación se presenta un diagrama de flujo para la identificación de cocos Gram positivos (Fig. 6)

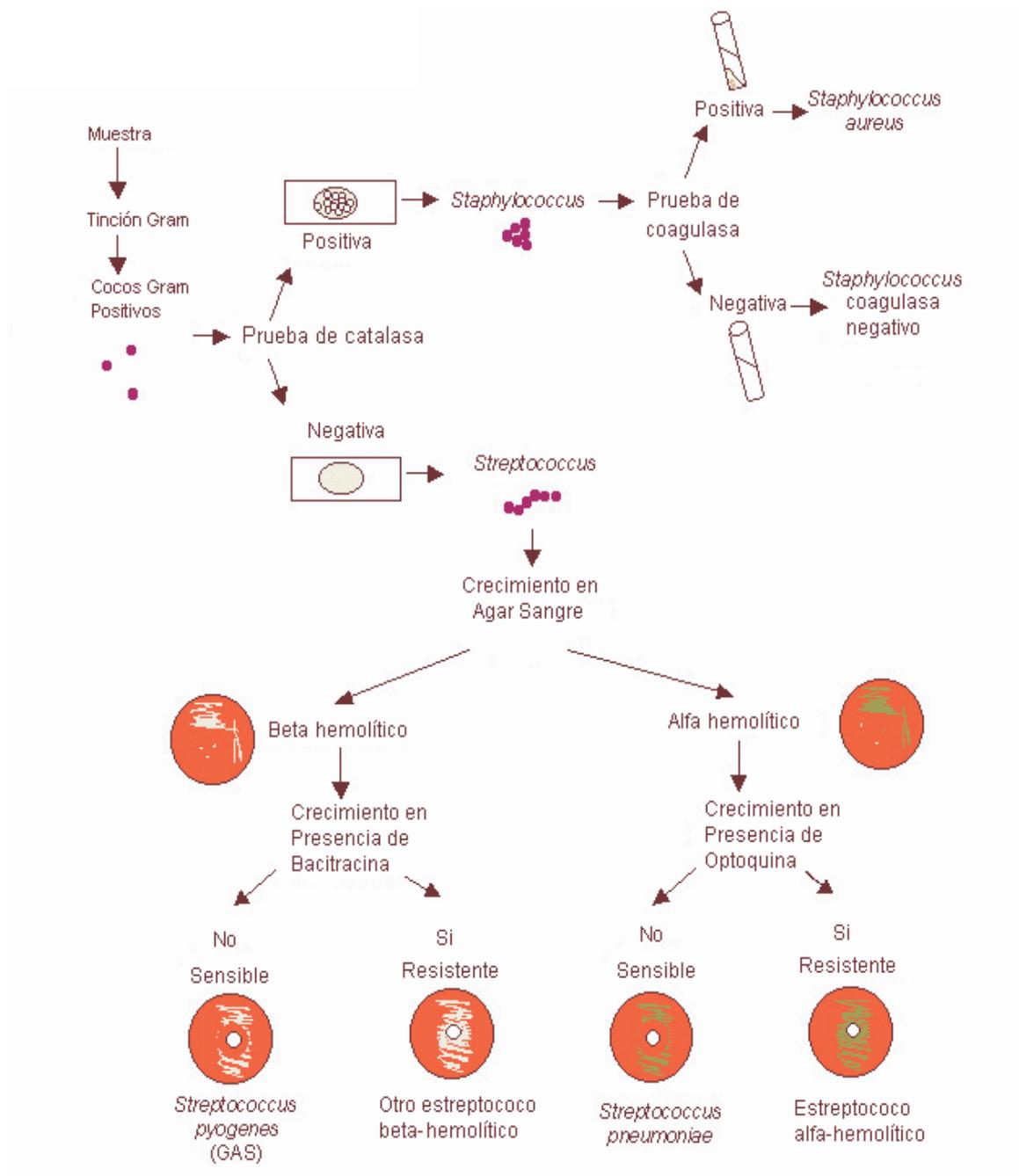


Figura 6. Diagrama de Flujo para identificación de cocos Gram positivos

Serotipificación

La reacción de quellung (reacción de hinchamiento capsular) representa una de las bases para llevar a cabo la serotipificación y requiere de la adición de un anticuerpo homólogo. La prueba consiste en mezclar la colonia en estudio con una cantidad igual de un antisuero específico y examinarla posteriormente al microscopio (a 1000X) para evaluar el posible hinchamiento capsular. Si bien se le considera de alta especificidad, se ha observado reactividad cruzada entre los tipos capsulares 2 y 5, 3 y 8, 7 y 18, 13 y 30 y con *E. coli*, *Klebsiella*, *H. influenzae* tipo b y algunos estreptococos *viridans* (105, 199).

Los neumococos se dividen en aproximadamente 90 serotipos, con base en la estructura de sus polisacáridos capsulares, pero la mayoría de los casos de infecciones invasivas parecen ser causadas por 23 serotipos, mismos que se incluyen en la vacuna antineumocócica que se utiliza en la actualidad: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, y 33F (87, 122, 192).

II. FACTORES NEUMOCÓCCICOS DE VIRULENCIA

La patogenicidad del neumococo ha sido atribuída a varias sustancias estructurales, la mayoría de las cuales se sitúan sobre la superficie celular. Sin embargo, aún falta comprender claramente la alta morbilidad y mortalidad asociada a este microorganismo y completar la lista de sus factores de virulencia. Figuran la cápsula y una proteína identificada recientemente, como promotores de resistencia a la fagocitosis y evasores del sistema inmune del hospedero (152). Diversos componentes de la pared celular y la toxina denominada neumolisina están involucrados principalmente en la inflamación desencadenada por la infección, si bien el proceso inflamatorio se completa sólo después de la lisis bacteriana ligada a la acción de la autolisina (18, 152).

En virtud de que la inflamación induce la mayoría de los síntomas de las enfermedades neumocóccicas, los factores de virulencia implicados fungen directamente como sustentos de la morbilidad y mortalidad debidas a los neumococos (98, 148). Sin embargo, la propia inflamación puede facilitar la propagación del microorganismo hacia otros órganos y tejidos. Recientemente se demostró *in vitro* que la producción neumocóccica de peróxido de hidrógeno ejerce efectos tóxicos sobre las células epiteliales de rata y puesto

que la cantidad de este oxidante es similar a la producida por los neutrófilos activados, se ha inferido su importante participación en la patogénesis del daño pulmonar *in vivo* (58).

A continuación se describen los principales factores de virulencia detectados a la fecha en los neumococos.

Cápsula

Este componente ha sido tradicionalmente reconocido como uno de los más relevantes factores de patogenicidad de *S. pneumoniae*. La prueba experimental empleada para demostrar su trascendencia hace referencia a una diferencia de 50% en las dosis letales relacionadas respectivamente con las cepas capsuladas y no capsuladas (9, 213). Recientemente se han producido cepas mutantes que sólo difieren en el tipo de polisacárido capsular expresado y los estudios implicados han demostrado que otros componentes neumocócicos también pueden hacer la diferencia en cuanto a virulencia (106).

La cápsula del neumococo es de aproximadamente 200 a 400 nm de espesor y se encuentra unida covalentemente a la superficie externa de los peptidoglicanos de la pared celular (193). Hasta ahora se han reconocido 90 distintos tipos de polisacáridos capsulares, los más simples de los cuales son polímeros lineales con unidades repetitivas de uno o más monosacáridos; en

contraste, los más complejos corresponden a polisacáridos ramificados con unidades base repetitivas conformadas por uno a seis monosacáridos más algunas cadenas laterales adicionales (192). Existen dos sistemas de nomenclatura para los serotipos de polisacáridos capsulares, el sistema danés y el americano. En el sistema de nomenclatura americano que fue introducido en 1944 por Eddy y colaboradores, los diferentes tipos tenían números consecutivos basados en el orden de su descubrimiento sin tomar en cuenta su estructura antigénica. Por otro lado, en el sistema danés el cual se ha adoptado a partir del inicio de la década de los 80s, los tipos que poseen antígenos capsulares comunes componen un grupo. Este sistema fue publicado por primera vez por Kaufmann en 1940 y ha sido revisado posteriormente. Cada serotipo puede identificarse por su reacción ante un antisuero específico para cada tipo. Esto se hizo primeramente mediante la reacción de quellung y la visualización microscópica pero ahora se utiliza la contrainmunolectroforesis, la aglutinación en látex y las pruebas de coaglutinación para la serotipificación (87, 102, 122, 123).

El mecanismo mediante el cual la cápsula neumocócica contribuye a la virulencia del microorganismo aún permanece sin determinarse plenamente, si bien se sabe que muestra propiedades antifagocitarias en los hospederos no inmunizados. La mayor parte de los serotipos capsulares se encuentran altamente cargados a pHs fisiológicos, lo que podría interferir directamente las interacciones con los fagocitos. Además, el ácido teicoico de la pared celular, conocido comúnmente como polisacárido C, es capaz de activar la vía alterna

del complemento, al margen de que, frecuentemente, los anticuerpos dirigidos contra ése u otros componentes de la superficie neumocócica se encuentran en el suero de la mayoría de los adultos, lo que da lugar a la vía clásica del complemento, tal como también lo hace la unión del ácido teicoico a la proteína C reactiva (124, 192, 203).

Adicionalmente, es claro que la cápsula forma un escudo protector inerte que evita la interacción neumocócica con sus receptores en las células fagocitarias. Los neumococos de diferentes serotipos muestran una capacidad variable para resistir a la fagocitosis *in vitro* y para inducir la respuesta inmune humoral (206).

La estructura química de los polisacáridos capsulares y, en menor medida, el espesor de la cápsula, determinan la capacidad de cada serotipo para sobrevivir en el torrente sanguíneo y, con base en ello, para provocar enfermedades sistémicas. Ello puede depender de las diferencias en cuanto a la intensidad de la activación de la vía alterna del complemento (66, 72, 189), la deposición y obstaculización de los componentes del complemento por parte del material capsular (6, 93), la resistencia a la fagocitosis (39, 128, 189), la inmunogenicidad (206) y la mayor o menor posibilidad de la interacción con receptores de los fagocitos (156).

Pared celular

El peptidoglicano y sobre todo los polisacáridos de la pared celular, inducen procesos inflamatorios de similar intensidad a la observada en la infección por neumococos completos viables. Las afecciones neumocócicas típicas tales como otitis media, meningitis y neumonía pueden reproducirse fielmente en los animales inoculados con pared celular purificada o sus productos de degradación (33, 204, 205).

Los polisacáridos de la pared celular activan la vía alterna del complemento (216, 217) y, durante el proceso, se producen en la región implicada las anafilotoxinas C3a y C5a, las cuales incrementan la permeabilidad vascular, la degranulación de los mastocitos y la atracción y activación de los leucocitos polimorfonucleares (98). Además, la pared celular purificada representan un poderoso estimulador para que los monocitos produzcan interleucina 1 (IL-1) (175) la cual, junto con el factor de necrosis tumoral (TNF- α), juega un papel primordial en el proceso inflamatorio (204).

La pared celular también está involucrada en la fijación de neumococos no capsulados a las células endoteliales humanas, a las cuales origina efectos citopáticos (mediados por IL-1) (71).

Los anticuerpos anti-polisacáridos de la pared celular y anti-fosfocolina protegen a los animales a los que se reta con neumococos, aunque otros autores reportan resultados contrarios, lo que podría deberse a condiciones

de cultivo inadecuadas que se tradujeron en la inoculación de bacterias parcialmente no capsuladas (153). La actividad protectora de los anticuerpos anti-fosfocolina es sustancialmente más débil que la de otros anticuerpos (28) y la inducida por los anti-polisacáridos de la pared celular parecen no estimular la fagocitosis. Generalmente, en el humano no se observan diferencias significativas en cuanto a los niveles de inmunoglobulinas G anti-polisacáridos de pared celular encontrados en adultos sanos y en los enfermos con infección neumocócica. No obstante, la edad podría representar un factor de variación (149).

Por otra parte, es interesante la capacidad de la pared celular neumocócica para inducir la producción de citocinas preinflamatorias por parte de los fagocitos mononucleares periféricos, aunque realmente no se han identificado los componentes responsables: tanto los peptidoglicanos como los péptidos disacáridos originan el efecto mencionado. Finalmente, existe evidencia adicional de las múltiples interacciones entre la pared celular del neumococo y los factores derivados del huésped, lo que es ejemplificado por la unión del complemento y de la proteína C reactiva a los ácidos colino-teicoicos (192, 203, 204).

Proteínas neumocóccicas

Aunque se ha sugerido que existen varias proteínas involucradas en la patogenicidad de *S. pneumoniae*, sólo algunas de ellas han sido reconocidas como factores de virulencia, tales como una IgA1 proteasa que neutraliza las defensas del hospedero en las superficies mucosas y una neuraminidasa, enzima que facilita su unión a las células epiteliales vía la escisión del ácido siálico asociado a los glicolípidos y gangliósidos presentes en la superficie de numerosas células eucariontes (110, 111).

De hecho, la neuraminidasa parcialmente purificada puede inducir en ratones los mismos síntomas de la meningitis, si bien es posible que estos resultados se deban a que las preparaciones empleadas incluyeran productos de pared celular (23). Aún así, la inmunización previa con neuraminidasa pura mejora el tiempo de sobrevivencia de los ratones inoculados con neumococos, lo cual confirma la contribución de esta proteína a la patogenicidad del microorganismo (119).

Otras proteínas están implicadas en la adhesión del neumococo a las células epiteliales y endoteliales. Aunque dichas moléculas proteicas aún no se han identificado, se sabe que reconocen glicoconjugados situados en la superficie de las células hospederas, los cuales contienen oligosacáridos específicos tales como la N-acetil-D-glucosamina-galactosa, N-acetil-D-galactosamina-galactosa y glucosalina (119).

Recientemente se reportó que las péptido-permeasas podrían regular la adherencia neumocócica a las células endoepiteliales, pero no se ha logrado establecer con certeza si lo hacen actuando directamente en el proceso o si sólo aumentan la adherencia modulando la expresión de las adhesinas neumocócicas (46).

Otros trabajos sugieren que la hialuronidasa y el inhibidor de la neutrófilo-elastasa podrían contribuir a la virulencia del neumococo (23, 73). Asimismo, se ha descrito un componente de superficie, sensible a proteasas, capaz de unirse al factor H del complemento, inhibiendo con ello la activación de este sistema y la fagocitosis: al tratar neumococos con proteasas, se aumenta su capacidad para activar el complemento y la fagocitosis dependiente del complemento, disminuyéndose la virulencia neumocócica en ratones. Cabe señalar que dicho tratamiento con proteasas no ejerce efecto alguno sobre la cápsula. Existen estudios que han demostrado la producción de una proteasa que degrada al componente C3 del complemento, producida principalmente por los serotipos neumocócicos 3, 4 y 14. La actividad enzimática observada es eliminada con temperatura y es independiente de la producción de cápsula y puede ser eliminada de la superficie neumocócica con tratamiento de mutanolisina (6, 70, 152).

Neumolisina. Es una proteína intracelular perteneciente a la familia de las citotoxinas tiol-activadas (23) que posee una diversidad de efectos tóxicos

sobre diferentes tipos celulares. No es secretada por el neumococo viable sino hasta que ocurre la lisis neumocócica por influencia de la autolisina.

En altas concentraciones, los oligómeros de neumolisina se depositan sobre las membranas celulares hospederas, incrementando la cantidad de poros transmembranales hasta que éstos provocan la lisis celular (23). En proporciones menores de esta toxina, tienen lugar diversos efectos comprobados *in vitro*: estimula la producción de citocinas inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la IL-1, por parte de los monocitos humanos (94), inhibe el movimiento ciliar de las células del tracto respiratorio, desorganiza las monocapas de células epiteliales del tracto respiratorio superior y de los alveolos (63, 179), disminuye la actividad bactericida y la migración de neutrófilos (162), e inhibe la proliferación de linfocitos y la síntesis de anticuerpos (65).

Además, la neumolisina activa la vía clásica del complemento en ausencia de anticuerpos dirigidos contra ella. A este respecto, comparte alguna secuencia homóloga con la proteína C reactiva, molécula de fase aguda que protege parcialmente a los ratones contra el neumococo (23). Después de unir sus residuos fosforilcolina a los polisacáridos neumocócicos de la pared celular, la proteína C reactiva activa la vía clásica del complemento interactuando con C1q. Inclusive, algunos autores han obtenido datos preliminares indicativos de que la neumolisina puede unirse a C1q directamente, potenciando el proceso

inflamatorio, vía la activación del complemento, modificando el epitelio del tracto respiratorio (facilitando con ello el acceso del microorganismo al torrente sanguíneo) y estimulando la producción de citosinas. Lógicamente, al competir con la Proteína C reactiva para unirse a C1q, disminuye los efectos protectores de esta última (23).

En general, las cepas mutantes que no poseen neumolisina son menos virulentas que las originales y la inmunización previa con neumolisina prolonga el tiempo de supervivencia de los ratones inoculados con diversos serotipos de neumococos (2, 10, 17, 119).

Proteína A de superficie neumocócica. Esta proteína, conocida como PspA, presenta una gran variabilidad estructural y antigénica entre las diferentes cepas neumocócicas y se le localiza en la mayoría de los cultivos clínicos del microorganismo (45). En virtud de que posiblemente se trate de una proteína transmembranal, no ha sido fácil purificarla y aún se desconocen sus funciones, aunque su presencia es necesaria para que el neumococo se manifieste plenamente virulento (29, 130).

Los estudios de laboratorio han sugerido que la PspA aumenta la virulencia neumocócica, inhibiendo la activación del complemento (152). Adicionalmente, la inmunización pasiva con anticuerpos poli o monoclonales contra PspA y la inmunización activa con PspA recombinante o con sus

fragmentos N-terminales, han protegido a los ratones sometidos a reto neumocócico empleando cepas de varios serotipos capsulares (130).

Proteína C de superficie neumocócica. La PspC se encuentra en aproximadamente el 75% de los neumococos (30, 124) y su nombre deriva del hecho de que presenta numerosas similitudes moleculares y serológicas con la PspA, aunque también se le conoce como Proteína A de unión a colina (CbpA), ya que se enlaza covalentemente a la fosforilcolina sobre la superficie neumocócica. Esta proteína es parte de un grupo de 12 distintas proteínas que se encuentran en la superficie celular y se unen reversiblemente a otras proteínas con diversas funciones. Interactúa con la vía del complemento uniéndose a C3 y al factor H, promueve la adherencia de *S. pneumoniae* a células humanas activadas por citosinas, parece jugar un papel importante sobre las superficies mucosas y participa en la colonización neumocócica de la nasofaringe (124).

Las cepas mutantes que carecen de esta proteína se asocian a colonización deficiente, incapaces de adherirse a las células pulmonares humanas y a las células endoteliales (30, 178). En ausencia de CbpA, el neumococo es incapaz de penetrar una barrera vascular cerebral, lo que indica que la proteína resulta “clave” para la invasión. Aún se desconoce si sus propiedades enlazantes derivan de la capacidad para actuar como lectina, uniéndose a carbohidratos comunes, a través de uno o múltiples dominios de unión por molécula (30).

Autolisina. La autolisina neumocócica LytA corresponde a una amidasa localizada en la pared celular y se encuentra unida a la colina presente en el ácido lipoteicoico de la membrana celular. De esta manera, la autolisina es inactiva, pero puede activarse mediante la autólisis celular cuando el neumococo se encuentra en la fase estacionaria de crecimiento o cuando entra en contacto con antibióticos tales como la penicilina. Su papel en la patogénesis de las neumococcias sería el de generar productos de degradación de la pared celular con propiedades inflamatorias (18).

Las cepas mutantes que carecen de autolisina son menos virulentas que las silvestres y la inmunización con esta proteína confiere cierta protección a ratones infectados con neumococos (31). Sin embargo, los efectos de la autolisina podrían estar mediados por la previa liberación de neumolisina y de productos de pared celular desde el citoplasma neumocócico (118).

Además, se ha demostrado que la secreción de autolisina se ve estimulada por la lisozima humana, un factor de defensa secretado al producirse inflamación e infección (77).

Relación entre los diferentes mecanismos de virulencia

Al intentarse relacionar a los diferentes mecanismos de virulencia y a las formas en las que los distintos factores contribuyen a la patogénesis de las neumococcias, resultan inevitables algunas incongruencias y paradojas.

Mientras los polisacáridos de la pared celular y la neumolisina activan al sistema del complemento, el factor H enlazante del complemento y la PspA inhiben la activación del mismo (31, 77). En tal contexto, se ha propuesto dividir a los factores de virulencia del neumococo en dos grupos separados: el primero constaría de aquellos factores presentes en la superficie del neumococo intacto, los cuales parecen actuar al inicio de la fase infecciosa, impidiendo la fagocitosis mediante la inhibición de la vía del complemento. Por su parte, el segundo grupo incluiría a los factores que ejercerían su acción durante la fase de desintegración y lisis del microorganismo, también críticos en los padecimientos neumocócicos (77, 139, 152).

| FACTOR DE VIRULENCIA | MECANISMO DE VIRULENCIA |
|---|--|
| <i>Cápsula</i> | Impide la vía alterna del complemento Interfiere la fagocitosis Impide la libre difusión de opsoninas del complemento Es poco inmunógena o de nula inmunogenicidad en algunos serotipos |
| <i>Pared celular o polisacáridos de pared celular</i> | Genera efectos inflamatorios Activa la vía alterna del complemento ocasionando la producción de anafilotoxina Aumenta la permeabilidad vascular, la degranulación de mastocitos y la activación de PMNs Provoca incrementos en la producción de IL-1 Media la unión a células endoteliales |
| <i>Neumolisina</i> | Es citolítica a altas concentraciones Es citotóxica a bajas concentraciones Inhibe el movimiento ciliar y daña al epitelio Inhibe la actividad bactericida de PMNs Inhibe la proliferación linfocítica Inhibe la síntesis de anticuerpos Activa al complemento Incrementa la producción de IL-1 β y de TNF- α Se une al fragmento Fc de los anticuerpos |
| <i>PspA</i> | Inhibe la activación del complemento |
| <i>Factor H enlazante de complemento</i> | Inhibe la activación del complemento Interfiere la fagocitosis |
| <i>Autolisina</i> | Provoca la liberación de neumolisina y otros productos de pared celular |
| <i>Neuraminidasa</i> | Origina la exposición de receptores para neumococo |
| <i>Péptidopermeasas</i> | Incrementa la adherencia |
| <i>Peróxido de Hidrógeno</i> | Ocasiona daño tisular |
| <i>Proteasa IgA1</i> | Hidroliza anticuerpos IgAs en mucosas |

Tabla 1. Principales factores de virulencia presentes en *S. pneumoniae*

III. PATOLOGÍA

Streptococcus pneumoniae es el agente etiológico más frecuente de patologías respiratorias tales como la otitis media aguda, la sinusitis aguda, la nasofaringoconjuntivitis febril y la neumonía adquirida en la comunidad; asimismo, es causa de procesos sistémicos invasivos entre los que destacan la bacteremia sin foco evidente de infección, meningitis, la neumonía grave y la septicemia con o sin componente meningoencefálico (77).

Si bien *S. pneumoniae* es parte de la flora normal del tracto respiratorio superior (199) y su prevalencia es limitada debido a la competencia con el resto del ecosistema microbiano nasofaríngeo y a los mecanismos de defensa innatos del hospedero, las alteraciones que ocurran en cualquiera de estos factores pueden desencadenar alguna neumococcia. Generalmente, las enfermedades ocasionadas por esta especie son el resultado de la adquisición de una cepa nueva, combinada con el desequilibrio de la flora habitual (163).

Dependiendo de la zona anatómica implicada, la invasión tisular por el neumococo puede dar lugar a afecciones del oído medio (otitis media), senos nasales (sinusitis) o pulmones (neumonía, generalmente del tipo lobular), y la

meningitis puede aparecer como consecuencia directa de la diseminación del microorganismo a partir del oído medio o de los senos paranasales hacia las meninges, si bien este grave padecimiento también puede presentarse después de la invasión del flujo sanguíneo desde algún foco pulmonar (41).

A partir de una bacteremia, también pueden presentarse infección en los huesos (osteomielitis) o las articulaciones (artritis) (163, 199). En general, se considera que este microorganismo es actualmente la causa más importante de enfermedades bacterianas invasivas, tanto en adultos mayores como en los niños (199).

Los neumococos causan afecciones a humanos, conejos, monos, caballos, ratones y cobayos. Los conejos y caballos han sido utilizados extensivamente como modelos animales para estudiar las neumococcias y tratar de comprender mejor los determinantes neumocócicos de virulencia (163).

La colonización nasofaríngea ocurre en aproximadamente un 40% de la población general e inicia poco tiempo después del nacimiento. La unión al epitelio nasofaríngeo depende de la intraconversión entre los dos fenotipos de *S. pneumoniae* previamente mencionados: opaco y transparente. Sólo este último es capaz de persistir en la nasofaríngea *in vivo* (202) y su adherencia al tracto respiratorio superior está mediada por un receptor disacárido presente en la fibronectina del tejido faríngeo (5).

Esta clase de colonización trae como resultado un estado de portador nasofaríngeo asintomático, el cual funge como fuente principal de infecciones neumocócicas en niños, ancianos, individuos inmunocomprometidos y aquellos que sufren de enfermedades crónicas y debilitantes. La nasofaringe funge como foco bacteriano y es importante en la diseminación e inicio de la infección neumocócica, por lo que representa un “blanco” relevante para prevenir diversos padecimientos (124, 202).

Con base en trabajos experimentales, se ha logrado establecer que, en tejidos sanos, se requieren aproximadamente 100,000 bacterias/mL para que empiece una respuesta inflamatoria, sin embargo, si ocurre una señal proinflamatoria, el mismo efecto tiene lugar con tan solo 10 bacterias/mL. Dicha señal puede consistir en la adición de una citosina al modelo experimental pero, en situaciones clínicas, el análogo sería una infección viral concomitante (199).

a) Entidades clínicas causadas por *S. pneumoniae*

A continuación se presenta un panorama general de las entidades clínicas causadas por *S. pneumoniae*, sus signos y síntomas así como las complicaciones que pueden ocasionar.

Neumonía

El neumococo representa el más común agente causal de neumonía bacteriana, ya que es el responsable de dos terceras partes de los casos adquiridos en la comunidad. El padecimiento tiene un periodo de incubación que fluctúa entre 1 y 3 días, afecta a todas las edades y no hay diferencias en cuanto al sexo, aunque es más frecuente en niños y adultos mayores (15, 170).

Su prevalencia es mayor durante el invierno y los microorganismos generalmente llegan hasta los pulmones por inhalación o aspiración, alojándose en los bronquiolos, en donde proliferan e inducen una respuesta inflamatoria que inicia en los espacios alveolares produciéndose gran cantidad de un fluido rico en proteínas que funge como medio de cultivo para el invasor. Éste migra hacia otros alvéolos y provoca una pulmonía lobular cuyo primer estadio consiste en una congestión que se caracteriza por exudación serosa, engrosamiento vascular y proliferación bacteriana rápida. El siguiente estadio se denomina hepatización roja, debido a que el pulmón semeja al hígado: los espacios aéreos son ocupados por numerosas células polimorfonucleares y se presenta una congestión vascular y una extravasación de los glóbulos rojos que le confieren al pulmón una coloración rojiza. El siguiente estadio se conoce como hepatización gris, en virtud de que la fibrina acumulada se asocia a la presencia de eritrocitos y leucocitos en proceso de desintegración, y los espacios alveolares se llenan de exudado

inflamatorio. El estadio final corresponde a la resolución del cuadro, en la cual el exudado se reabsorbe (41).

La neumonía neumocócica frecuentemente es precedida por una infección viral del tracto respiratorio superior y suele aparecer como bronconeumonía o traqueobronquitis sin compromiso del parénquima (132).

El cuadro clínico y los cambios radiológicos no siempre se ajustan a lo que se describe habitualmente. Por lo regular, el inicio de la enfermedad es súbito, con escalofrío y temblor seguidos por fiebre, dolor al respirar –en el lado afectado–, tos, disnea y producción de esputo; el dolor puede ramificarse hacia algún otro sitio y, en el caso de que se implique al lóbulo pulmonar inferior, debe considerarse la posibilidad de alguna sepsis intraabdominal como la de la apendicitis. La temperatura se eleva rápidamente a 38°- 40.5°C, el pulso alcanza cifras de 100 a 140 por minuto y la frecuencia respiratoria se eleva a 20-45 respiraciones por minuto; así mismo, se presentan náuseas, vómito, fatiga y mialgias, y la tos es seca al inicio pero se torna productiva con esputo purulento amarillento o sanguinolento (132, 157).

Durante el examen clínico se pueden encontrar diferentes signos, dependiendo del carácter del proceso y del estadio en el cual se encuentra el cuadro; además, se pueden presentar signos típicos de consolidación lobular o efusión pleural, ya sea durante la fase aguda o como una manifestación tardía. Los pacientes con enfermedad broncopulmonar crónica evidencian

rasgos de insuficiencia respiratoria y/o de insuficiencia cardíaca. En ocasiones el diagnóstico diferencial incluye infarto pulmonar o procesos de infiltración pulmonar de otra naturaleza. Evidentemente, cuando se presenta la bronconeumonía es común detectar ruidos pulmonares crepitantes durante la realización del examen (15, 41, 132).

Los síntomas respiratorios pueden no presentarse, especialmente en los pacientes con enfermedad bacterémica; la ausencia de fiebre es de algún modo común y propicia pronósticos erróneos (125, 201).

En 15 a 20% de los pacientes ocurren síntomas gastrointestinales tales como náuseas, vómito o diarrea, e inclusive, éstos pueden predominar durante la revisión clínica. De igual manera, hay diferencias en cuanto a la neumonía neumocócica bacterémica y la no bacterémica; de hecho, en la primera los pacientes manifiestan con mayor frecuencia escalofríos, síntomas gastrointestinales y elevados niveles sanguíneos de urea y creatinina (14).

Es importante subrayar que los datos clínicos y hallazgos radiológicos de la neumonía suelen no ser suficientes para establecer la etiología y que los síntomas y signos varían según la edad del paciente; en los niños menores de 5 años, destacan la tos y la dificultad respiratoria (taquipnea) y la fiebre no es un signo muy específico, debido a su frecuencia en varias afecciones comunes de la infancia (diarrea, otitis, infecciones del tracto urinario, etc.) (99).

Aunque numerosos enfermos infantiles evidencian fiebre, ésta puede no presentarse, especialmente en pacientes graves y en los desnutridos. En el grupo de 2 meses a 4 años, la taquipnea y la retracción torácica, sobre todo en quienes no padecen asma, representan signos clínicos importantes para el diagnóstico de neumonía, particularmente cuando ambas ocurren simultáneamente (15, 170).

La edad avanzada y la coexistencia de otra enfermedad constituyen factores importantes que enmascaran la evidencia clínica; en el anciano, la neumonía representa un problema de especial magnitud, con un cuadro clínico a menudo atípico, oscuro y hasta ausente, pero comúnmente cursa con arritmia y existen casos de insuficiencia cardíaca. Hasta el 80% de los pacientes geriátricos con neumonía requieren hospitalización y 70% de los decesos por este padecimiento ocurren en el anciano (14, 41, 138).

Las complicaciones de la enfermedad pueden ser potencialmente letales e incluyen a la neumonía progresiva, la cual se asocia al síndrome de insuficiencia respiratoria adulta y/o al shock séptico. Algunos pacientes desarrollan infecciones en sitios contiguos provocando empiema o pericarditis purulenta; las efusiones pleuríticas aparecen en aproximadamente el 25% de los enfermos y sólo en 3% se detecta empiema pleural, aunque éste es más frecuente en los lactantes (170).

El exudado pleural puede desaparecer espontáneamente o durante el tratamiento de la enfermedad, pero también es posible que se torne espeso y fibrinopurulento, pudiendo obligar a un drenado quirúrgico. La bacteremia puede ocasionar infecciones extrapulmonares, tales como artritis séptica, endocarditis, meningitis y peritonitis. Algunos pacientes pueden desarrollar superinfecciones pulmonares con una mejora temporal durante el tratamiento, aunque el deterioro es grave con recurrencia de fiebre e incremento de infiltrados pulmonares (132).

Otitis media

La infección del oído medio puede ser aguda o crónica y, en el caso de la ocasionada por neumococos, es del tipo supurativo y tiene lugar como resultado de la obstrucción del flujo en la trompa de Eustaquio. *S. pneumoniae* causa aproximadamente el 50% de los casos de otitis media aguda en infantes menores a 1 año de edad; de hecho, se estima que cerca del 80% de los niños tienen un ataque de otitis media en los primeros 3 años de vida y que la otitis recurrente debida a esta especie es particularmente frecuente (133).

Lógicamente, la otitis media aguda puede presentarse a cualquier edad, pero es más común entre niños, sobre todo en quienes se encuentran entre los 6 meses y 3 años de edad. Esta distribución puede deberse a factores inmunológicos tales como la falta de anticuerpos contra el agente causal y el menor ángulo de la trompa de Eustaquio en relación con la nasofaringe. Dada

la sucesión de agentes infecciosos ante los cuales se carece de inmunidad, la inflamación de la mucosa y la hipertrofia adenoidal provocan que el invasor se desplace desde la nasofaringe al oído medio y se establezca en este último (15, 170, 188).

La incidencia de la enfermedad es mayor durante los meses de invierno, en paralelo con el aumento en las infecciones respiratorias virales. Casi todas las afecciones de vías respiratorias superiores inician como infecciones virales y evolucionan en 5 a 10 días como superinfecciones bacterianas (41). En la otitis media supurativa, influyen diferentes factores, los cuales incluyen a las infecciones de las vías respiratorias superiores, reacciones alérgicas y simples cambios posicionales, todo lo cual propicia el reflujo de la flora nasofaríngea a través de la trompa de Eustaquio. La respuesta inflamatoria aguda posterior a la infección viral y a alguna reacción alérgica cambia el revestimiento de la cavidad del oído medio y lo duplica o triplica en cuanto a espesor; los neutrófilos migran hacia la cavidad y tornan purulento el fluido sérico inicial (188).

Conforme se inflama el orificio de la trompa de Eustaquio, el lumen se ocluye y se acumula exudado, lo que incrementa la presión interior y la membrana timpánica se expande hacia fuera; además, puede haber introducción de pus en algunas porciones neumatizadas de los huesos y, puesto que la liberación de la presión es crítica, puede ocurrir la ruptura del tímpano (133, 188).

Si la otitis media es tratada a tiempo, el pronóstico no es grave, sin embargo, la acumulación prolongada de fluido puede provocar otitis media crónica, la cual también puede tener origen en una infección con microorganismos resistentes al tratamiento antimicrobiano (188).

Por lo general, el paciente se queja de dolor de oído persistente, pudiendo haber pérdida de la audición; suelen presentarse signos de infección de vías respiratorias superiores, mareos, fiebre (de hasta 40.5°C), náuseas, vómito y diarrea, principalmente en niños pequeños (15). La membrana timpánica se torna eritematosa y puede estar volteada hacia el exterior; la sangre periférica llega a mostrar una leucocitosis moderada y no se detecta linfadenopatía. Si ocurre la perforación de la membrana timpánica, puede existir otorrea con sangre, después serosanguinolenta y finalmente purulenta (41, 133).

En general, las complicaciones del padecimiento son serias e incluyen mastoiditis aguda, petrositis, laberintitis, parálisis facial, pérdida de la audición (tanto conductiva como sensorineural), absceso epidural, meningitis, absceso cerebral, trombosis lateral sinusítica, empiema subdural e hidrocefalia otítica. Los síntomas que indican complicaciones son dolor de cabeza, súbita o profunda pérdida de la audición, vértigo, escalofríos y fiebre (133).

Sinusitis

Se define como una inflamación de los senos paranasales, las cuales corresponden a cavidades llenas de aire en el cráneo. Dicha inflamación

puede ser causada por agentes infecciosos (virales o bacterianos) o factores no infecciosos entre los que destacan las alergias y la patología se clasifica como “aguda” cuando los síntomas se presentan por menos de 4 semanas, “subaguda” si su duración es de 4 a 12 semanas y, “crónica”, cuando se extiende a más de 12 semanas. La sinusitis aguda recurrente es aquella que provoca 4 episodios por año, durando 2 semanas en cada uno (59).

La causa más común de sinusitis son las infecciones virales de las vías respiratorias superiores, las cuales suelen desencadenar inflamación de los senos nasales, de carácter autolimitante, ya que se resuelve sin tratamiento en menos de 2 semanas. No obstante, cuando los síntomas empeoran después de 3 a 5 días o persisten por más de 10 días, siendo más severos que los relacionados con las infecciones virales, debe sospecharse de una infección bacteriana. Cabe señalar que los senos que normalmente se ven involucrados, tanto en la sinusitis crónica como en la aguda, son los maxilares y los etmoides anteriores (83); por obvio, la mucosa nasal responde produciendo moco y atrayendo hacia la mucosa nasal a los diversos mediadores de la inflamación, entre los cuales destacan los leucocitos; éstos empeoran la congestión y el edema en los pasajes nasales provocando el bloqueo en los orificios de drenado de los senos. La consecuente hipoxia en los senos y la retención del moco provocan que la función ciliar sea ineficiente y, por lo tanto, se crea un medio ideal para el crecimiento bacteriano. Si la sinusitis aguda no se resuelve, ocurre la sinusitis crónica, produciéndose la

hiperplasia de la mucosa, lo que continúa atrayendo infiltrados inflamatorios y generando la posibilidad de que se desarrollen pólipos nasales (59, 83).

S. pneumoniae es el responsable del 33% de los casos de sinusitis bacteriana (41).

En los adultos, la sinusitis bacteriana aguda se presenta generalmente después de 7 días de congestión nasal; la región afectada puede estar adolorida e inflamada y, cuando se trata de los senos frontales, aparece el dolor característico en la frente; así mismo, la sinusitis maxilar cursa con dolor en el área maxilar, muelas y frente. Por su parte, los senos etmoidales se localizan entre los ojos, cerca de los conductos lagrimales, por lo que la sinusitis etmoidea se asocia a inflamación y dolor en los párpados, detrás de los ojos y entre ellos, con cefalalgia intensa. Finalmente, el dolor de la sinusitis esfenoidal no es tan localizado, pudiéndose ubicar en el área frontal u occipital, o en el oído, cuello y la parte superior de la cabeza (59).

El drenado purulento puede ser evidente durante el examen clínico, ya sea en forma de rinorrea anterior o como drenado faríngeo posterior asociado a irritación de garganta y tos, lo cual con frecuencia empeora por las noches (194).

Los niños con sinusitis aguda pueden no reportar drenado postnasal o dolores de cabeza; de hecho, la tos y rinorrea son los síntomas más comunes en este

grupo, ya que la fiebre es menos frecuente (170). Evidentemente, hay malestar general, náuseas, fatiga, afectación del sentido del olfato (hiposmia o anosmia) y el gusto, epistaxis, dolor al masticar, afonía y halitosis; se considera que la presencia de fiebre y escalofríos implica infecciones que van más allá de los senos paranasales (134).

Es común que la mucosa nasal esté enrojecida e inflamada y puede haber rinorrea purulenta de color amarillento o verdoso y exudado seropurulento o mucopurulento en el meato medio, sobre todo cuando se trata de sinusitis anterior etmoidea o frontal (83, 134).

La sinusitis crónica se relaciona con síntomas que tardan más en aparecer pero mucho más persistentes; la congestión nasal y el goteo postnasal son los síntomas más comunes de esta entidad, la tos crónica se exagera durante la noche o al despertar (83).

Las complicaciones graves de la sinusitis son infrecuentes desde que se introdujeron los antibióticos, y pueden consistir en meningitis, osteomielitis del seno frontal, empiema extradural subdural y trombosis de seno cavernoso. La sinusitis etmoidal aguda es más común en los niños que en los adultos y puede cursar con tumefacción orbitaria y periorbitaria unilateral (134).

Bacteremia

Corresponde a la presencia de bacterias en la sangre circulante después de trauma o infección, es normalmente transitoria, se combate y es eliminada por el sistema inmune del hospedero y, por lo general, es causada por manipulaciones quirúrgicas de tejidos infectados, cateterización del tracto urinario infectado, incisión y drenado de abscesos, así como colonización de catéteres intracardíacos, uretrales etc. (135).

Dicha colonización es debida a agentes oportunistas y, aunque podría no tener efecto alguno en individuos sanos, es de especial importancia en pacientes inmunocomprometidos, con otras enfermedades concomitantes, entre quienes reciben quimioterapia o personas malnutridas. El sitio primario o focal de la infección es variable, pero frecuentemente se trata de los pulmones y, una vez que la bacteria se ingresa al torrente sanguíneo, la infección puede extenderse a otros órganos produciendo complicaciones mayores. En los adultos, 60 a 87% de las bacteremias neumocóccicas están asociadas a neumonías previas, aunque también derivan de meningitis, endocarditis, sinusitis y otitis, e inclusive, de infecciones virales de vías respiratorias superiores (112, 135).

Evidentemente, la bacteremia también puede ocurrir como infección primaria y, en este caso, se le conoce como bacteremia oculta que afecta a un paciente febril sin signos de infección bacteriana focal o de sepsis. *S. pneumoniae* es responsable de 65 a 75% de los casos de esta entidad (135)

y, si bien es más común en niños de 3 a 36 meses de edad, también se presenta en pacientes susceptibles como los que padecen de linfoma, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, esplenectomía, deficiencias inmunológicas graves y anemia de células falciformes (157).

La bacteremia puede progresar, propiciando una respuesta inflamatoria sistémica (septicemia) y provocar taquipnea (más de 20 respiraciones por minuto), temblores, escalofríos, fiebre (mayor de 38°C), taquicardia (con más de 90 latidos por minuto) y síntomas gastrointestinales (dolor abdominal, náusea, vómito y diarrea). Los pacientes manifiestan piel tibia y estado mental alterado, así como una hipotensión que puede presentarse en forma tardía. Hematológicamente, se presentan leucocitosis ($>12,000$) o leucopenia ($<4,000$), más de 10% de neutrófilos inmaduros y cultivos sanguíneos positivos; la cuenta de leucocitos disminuye a menos de $4,000/\mu\text{L}$ y después se incrementa a más de $15,000/\mu\text{L}$ con un marcado aumento en las células inmaduras en un intervalo de 2 a 6 horas (112, 135, 157).

S. pneumoniae provoca endocarditis en 1 al 3% de las bacteremias, con evolución fulminante y una importante destrucción valvular, al margen de que ocurre la diseminación microbiana a otros órganos, pudiéndose producir peritonitis (cavidad abdominal), endocarditis (corazón), artritis (articulaciones) o meningitis (SNC), además del shock séptico y la falla multiorgánica (135, 157).

Meningitis

Se define como la infección de las membranas del cerebro (meninges) y de la médula espinal. El neumococo es la causa más frecuente de este padecimiento en pacientes adultos y la segunda en niños mayores de 6 años, con una prevalencia de hasta 50% de los casos de meningitis bacteriana y una mortalidad de 19 a 26% de ellos, aún cuando se haya instituido el tratamiento antibiótico (41, 129, 207). Por lo regular, la meningitis neumocócica es secundaria a la bacteremia, neumonía, otitis, mastoiditis, sinusitis y lesiones craneales con fuga de líquido cefalorraquídeo. Las personas con mayor predisposición son los alcohólicos, pacientes con anemia falciforme, diabetes, trastornos en válvulas cardíacas y asplenia (157).

El neumococo llega a las meninges a través del torrente sanguíneo, e inclusive, a partir de focos infecciosos cercanos como sinusitis o abscesos epidurales, o por contacto del líquido cefalorraquídeo con el exterior debido a mielomeningocele, lesiones cutáneas y procedimientos neuroquirúrgicos (41, 77, 157).

Comúnmente, existen signos prodrómicos de enfermedad respiratoria o garganta irritada previos a la presentación de los signos de la meningitis aguda, entre los cuales destacan fiebre, dolor de cabeza, rigidez de cuello, vómito y fotosensibilidad. El paciente adulto empeora rápidamente durante las primeras 24 horas y, los niños, aún más pronto (129, 207); en los adultos se observan cambios en el estado de consciencia tales como irritabilidad,

confusión, mareo, estupor, pérdida del conocimiento y coma, pudiendo agregarse convulsiones y neuropatías craneales. La deshidratación y el colapso vascular pueden ocasionar shock, son posibles el déficit focal y la hemiparesis como resultado de infarto cerebral, los signos de Brudzinski, Kernig y de Babinski (uni o bilateral), así como las anormalidades en los nervios craneales tales como parálisis facial, oculomotora o sordera; las muestras de líquido cefalorraquídeo presentan leucocitos, elevación de la concentración de proteínas y la baja de glucosa (157, 136, 207).

En niños de 3 meses a 2 años de edad, los síntomas y signos son menos predecibles, si bien destacan letargia, fiebre, vómito, irritabilidad, pérdida del apetito, convulsiones, llanto agudo y fontanela a tensión, pero la rigidez de nuca puede no estar presente. Las efusiones subdurales ocurren después de varios días caracterizándose por convulsiones, fiebre persistente y aumento en el tamaño de la cabeza (129, 207).

Aunque los antibióticos han disminuído las tasas de mortalidad de la meningitis aguda éstas siguen siendo elevadas (19-26%), principalmente cuando la afección no es tratada a tiempo o incide en neonatos o ancianos. El paciente puede morir debido a complicaciones sistémicas o a infarto cerebral masivo y las secuelas neurológicas entre quienes sobreviven alcanza cifras de 25-30%, incluyendo hidrocefalia, acumulación de fluído en tejido subdural, daño en nervios craneales, sordera, parálisis, infarto cerebral, convulsiones recurrentes y retraso mental (136, 207).

Artritis

Se presenta cuando *S. pneumoniae* invade articulaciones provocando la inflamación del revestimiento sinovial, en cuyo caso adquiere la denominación de artritis séptica (131, 135). Cuando el microorganismo entra a la cavidad articular, se producen efusión, piogénesis y una destrucción eventual del hueso y el cartílago. La procedencia del invasor es el torrente sanguíneo, al que ingresa desde un sitio de infección primario, ubicado en huesos o tejidos adyacentes, aunque también puede haber inoculación directa del microorganismo en la articulación; en ocasiones la artritis se presenta varias semanas después de que la infección primaria ha sido resuelta (13).

S. pneumoniae es responsable del 20% de las artritis sépticas que afectan a los adultos, incidiendo principalmente en los mayores de 65 años (45% de los pacientes con artritis séptica reabasan esta edad); así mismo, 5 a 10% de los casos se presentan en niños menores de 15 meses (172). Entre los diversos factores que pueden predisponer a los individuos figuran enfermedades crónicas (falla renal, diabetes, cirrosis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, etc.), los padecimientos y medicamentos supresores del sistema inmunológico, la administración intravenosa de drogas, traumas articulares recientes, implantes articulatorios artificiales, cirugía articular, inyecciones intraarticulares y anormalidades articulares previas (13, 172).

La artritis séptica aguda inicia en forma abrupta, causando eritema, fiebre moderada, dolor intenso e inflamación y limitación funcional de la articulación afectada, así como inmovilidad voluntaria o pseudoparálisis; la movilización pasiva distiende la cápsula y genera mayor dolor. Por lo regular, la artritis se presenta en forma monoarticular, con afectación preferente de las grandes articulaciones (sobre todo la cadera), pudiendo afectar la columna vertebral y las articulaciones periféricas menores. En orden de frecuencia, la rodilla, cadera, tobillo y codo son las articulaciones más comprometidas; en niños menores de 15 meses la localización más común implica a la cadera y puede acompañarse de osteomielitis. En algunos pacientes pueden no presentarse los signos sistémicos de inflamación y, si la bacteria invade la cadera, el dolor puede localizarse en la ingle, muslo o glúteos (13, 135, 172).

Las principales complicaciones de esta entidad clínica incluyen articulaciones disfuncionales, osteomielitis, anquilosis y septicemia (13).

Endocarditis

Esta enfermedad involucra a las válvulas cardíacas y otras estructuras adyacentes. La endocarditis neumocócica puede ser consecuencia de una bacteremia, aún en pacientes sin enfermedad valvular cardíaca previa; sin embargo, es una complicación poco frecuente que incluye tan sólo un 1 a 3% de los casos de endocarditis bacteriana (127, 187).

S. pneumoniae provoca la endocarditis bacterial aguda, la cual se presenta en válvulas previamente sanas. La endocarditis valvular protésica se presenta en pacientes sometidos a reemplazo valvular y ello ocurre normalmente dentro del año posterior a la cirugía (68, 137).

En general, la endocarditis se presenta cuando las células endoteliales se dañan y liberan factor tisular que genera acumulaciones de fibrina y plaquetas las cuales impiden el acceso de neutrófilos, inmunoglobulinas y complemento, lo que permite sobrevivir al microorganismo colonizando el tejido cardíaco. La patología comúnmente se ubica en el lado izquierdo del corazón involucrando, en orden de frecuencia, a las válvulas mitral, aórtica, tricúspide y pulmonar. Los defectos congénitos y la enfermedad reumática valvular son factores predisponentes importantes, y a ellos se adicionan la calcificación valvular, el prolapso mitral, la estenosis hipertrófica subaórtica y las válvulas protésicas (68, 137).

Los síntomas son muy parecidos a los de otras enfermedades sistémicas, con fiebre elevada, sudores nocturnos, fatiga, malestar general, pérdida de peso e insuficiencia valvular ocasionada por la destrucción del tejido y la aparición de abscesos. También pueden haber escalofríos, artralgias, taquicardia, petequias en el torso, conjuntiva, membranas mucosas y extremidades, nódulos eritematosos subcutáneos en las puntas de los dedos –nódulos de Osler–, hemorragia bajo las uñas y lesiones hemorrágicas retinales (68, 137).

La endocarditis infecciosa sin tratamiento es fatal. De hecho, aún con los avances en cuanto al tratamiento, la mortalidad es de aproximadamente un 20%, ya que el éxito de la terapéutica depende de la edad y condición del paciente, de la duración previa de la infección, de la severidad de otras enfermedades colaterales, del sitio de la infección y de la susceptibilidad del microorganismo a los antibióticos. Las complicaciones más comunes son los abscesos anulares, complicaciones neurológicas debidas a accidentes cerebro vasculares, encefalopatía y embolia pulmonar, renal o retinal, infarto al miocardio, arritmias cardíacas, falla cardíaca congestiva, insuficiencia arterial aguda en alguna extremidad y meningitis purulenta. En pacientes a quienes se han instalado prótesis cardíacas, éstas pueden tornarse disfuncionales (68, 137).

b) Epidemiología y distribución de los serotipos

La enfermedad neumocócica es endémica en todo el mundo; afecta mayoritariamente a menores de 2 años de edad y a los adultos mayores de 65 años (69, 80). De hecho, los neumococos representan la segunda causa más frecuente de meningitis bacteriana y de otitis media en niños, siendo superados únicamente por *Haemophilus influenzae* tipo b, aunque debido a la introducción de las vacunas conjugadas dirigidas contra este último, quizá la meningitis neumocócica será en breve la variedad predominante (49, 148).

S. pneumoniae es el agente etiológico más importante de la neumonía adquirida en la comunidad (CAP) que afecta a los adultos y, en numerosos países desarrollados, también figura entre los principales productores de meningitis bacteriana en este mismo grupo etario, sólo detrás de *Neisseria meningitidis* (157).

La incidencia de la neumonía neumocócica no disminuyó significativamente durante el siglo XX, aunque se redujo notablemente su tasa de mortalidad desde el descubrimiento y uso de los antibióticos; sin embargo su letalidad continúa siendo elevada: por ejemplo, en las últimas cuatro décadas la mortalidad asociada a la bacteremia neumocócica ha permanecido estable, oscilando entre 25 y 29% de los casos, entre los adultos mayores y en quienes presentan padecimientos predisponentes (73, 157).

La distribución de los serotipos relacionados con pacientes adultos difiere sustancialmente de la que afecta a los niños y, aunque existen diferencias entre las distintas publicaciones, se pueden reconocer algunas tendencias. En los pacientes pediátricos sólo algunos serotipos son responsables de la amplia proporción de enfermedades neumocócicas; los serotipos pediátricos más importantes: 6A, 14, 19F y 23F ocasionan casi el 60% de las neumococcias. Por otro lado, los serotipos 3, 19F y 6A se encuentran en el 31% de los aislamientos provenientes de adultos (80), pero los serotipos capsulares 1 al 8 causan aproximadamente el 75% de las infecciones en adultos, con casi la mitad de decesos debidos a neumonía (144, 197).

También existen diferencias en cuanto a la distribución geográfica y la prevalencia de los distintos serotipos en el mundo, variando sustancialmente con respecto al tiempo, lo que afecta la efectividad de las diversas vacunas (6, 51, 206). Por ejemplo, el tipo 3 fue uno de los más prevalentes desde el inicio del siglo XX hasta hace apenas algunas décadas, cuando empezó a ser rebasado por el 14 en numerosos países (157).

Adicionalmente, la sensibilidad del neumococo hacia los antibióticos difiere de una a otra región geográfica, aunque la resistencia se ha desarrollado primariamente en las cepas más prevalentes en los niños, quienes representan la población más expuesta a los antimicrobianos (7, 157). Los neumococos con menor susceptibilidad a la penicilina pueden encontrarse en la mayor parte del mundo, pero su prevalencia es muy variable en cada zona geográfica. La comparación de los genes que codifican para la proteína de unión a penicilina (PBP, por *penicillin-binding protein*) de diversas cepas muestran una gran variación, indicando que dichos genes han surgido en diferentes lugares (40). Sin embargo, las clonas más resistentes evidencian una variación menor en cuanto a sus genes PBP, lo que sugiere la propagación de un número limitado de cepas entre los diferentes países y continentes, destacando los tipos capsulares originales 23F, 9V y 6B. Más aún, una sola clona multirresistente 23F ha sido prevalente en España por aproximadamente 20 años y ha originado un aumento a nivel mundial de la resistencia neumocócica a los β -lactámicos. Lógicamente, las cepas

pandémicas se pueden encontrar expresando nuevos serotipos capsulares (24, 40, 210).

En los países en vías de desarrollo, la neumonía es una enfermedad muy seria en niños: se estima que más de un millón de menores de 5 años mueren cada año por neumonía neumocócica. En los Estados Unidos, las infecciones neumónicas debidas a esta especie ascienden a 500,000 casos – de los cuales 100,000 demandan hospitalización–, pero también ocurren 7 millones de otitis medias y 60,000 de enfermedad invasiva debidos a cepas con resistencia múltiple a antibióticos, incluidas 3,000 meningitis infantiles. Por lo que respecta a los adultos hospitalizados por CAP, el agente infeccioso más común es *S. pneumoniae* y fallece un 14% de los pacientes con enfermedades invasivas (meningitis, endocarditis, etc.), cifra que tiende a disminuir con la aparición de nuevas vacunas (197).

La incidencia anual de neumonía en las poblaciones occidentales es aproximadamente de 1% y 5 de cada 1,000 personas afectadas deben su afección al neumococo, destacando las de edades extremas. Así mismo, la neumonía es el principal origen de la bacteremia neumocócica, cuya incidencia total anual en América del Norte y Europa fluctúa entre 10 y 20 por cada 100,000 individuos (197). Por obvio, el riesgo de contraer enfermedad invasiva neumocócica resulta 20 veces mayor entre los niños pequeños que asisten a las guarderías y la frecuencia de la enfermedad neumocócica es mayor durante el invierno, debido probablemente a que durante esta época

predominan las infecciones respiratorias virales que predisponen a la enfermedad neumocócica. Las epidemias de esta última se asocian comúnmente a la introducción de nuevas cepas a los sistemas cerrados tales como escuelas, campos militares, asilos, hospitales y cárceles (146).

En México, la incidencia anual de neumonía en niños de 5 años varía entre los 13 y 15 casos por cada 100,000; la neumonía adquirida en la comunidad incluye a 300,000 pacientes y la mortalidad alcanza los 30,000 casos, 8,000 de los cuales son menores de 5 años (79).

S. pneumoniae coloniza la faringe y nasofaringe de sujetos sanos, en proporciones variables de 5 a 75%, fenómeno que inicia desde la etapa de lactancia; dicha proporción disminuye con la edad, siendo de 38 a 45% en menores de 5 años, de 29 a 39% de los 5 a los 9 años y de 9 a 25% entre los 9 y 14 años (191).

La distribución de los serotipos de *S. pneumoniae* en niños que habitan en la República Mexicana se resume en las tablas 2 y 3 (79).

| SEROTIPO | % CASOS |
|--------------------|---------|
| 19F | 23% |
| 6B | 15% |
| 6A | 14% |
| 23F | 11% |
| 19A | 5% |
| 14 | 3% |
| 18B, 18C, 9V y 23A | 1% |
| otros | 28% |

Tabla 2. Serotipos más frecuentes en niños mexicanos (79).

| SEROTIPO | CASOS | % | SEROTIPO | CASOS | % |
|-----------------|-------|------|-----------------|-------|-----|
| 23F | 32 | 19.0 | 18C | 5 | 3.0 |
| 6B | 20 | 11.9 | 5 | 5 | 3.0 |
| 14 | 20 | 11.9 | 18 ^a | 4 | 2.4 |
| 19F | 16 | 9.5 | 1 | 4 | 2.4 |
| 6 ^a | 14 | 8.3 | 15 | 3 | 1.8 |
| 19 ^a | 11 | 6.5 | 7F | 3 | 1.8 |
| 9V | 10 | 6.0 | 15A | 3 | 1.8 |

Tabla 3. Principales serotipos invasivos de *S. pneumoniae* detectados en el Hospital Infantil Federico Gómez durante el lapso 1997-2004 (79).

El mismo estudio mostró que existe un 29% de colonización por *S. pneumoniae*, y que el propio estado de portador puede ser el origen de las formas invasoras, tal como lo reporta la literatura internacional, con un claro predominio del serotipo 14 (79).

Por otra parte, el análisis molecular de los genes responsables de la síntesis de los componentes capsulares ha demostrado que aquéllos se encuentran arreglados en grupos y contienen toda la información necesario para la síntesis de la cápsula (51, 100). A tal respecto, también debe considerarse que el neumococo es un microorganismo naturalmente transformable, por lo que puede intercambiar material genético con otras cepas y variar su especificidad capsular, tanto *in vitro* como *in vivo* (40, 51); ello se describió por primera vez en 1928 y se ha demostrado repetidamente que corresponde a un evento muy común en la naturaleza (40, 157).

En tres estudios recientes, los cuales incluyeron 5,000 a 10,000 cepas provenientes de pacientes con enfermedad invasiva de diferentes países, se identificó un total de 64 a 77 tipos (182). En otro trabajo que abarcó 13,616 aislamientos neumocócicos a nivel mundial, los 10 tipos más frecuentes constituyeron el 61.7% del total y 30 tipos cubrían al 91.5%; es decir, los 60 tipos menos comunes sumaban únicamente el 8.5% (177).

En los niños, la cantidad de cepas que se aíslan con más frecuencia es aún más limitado; los tipos 6, 14, 18, 19 y 23 inciden claramente en los niños

pequeños, mientras que en los adultos el patrón de distribución resulta más amplio (79, 182). Al parecer, el predominio de esos 5 serotipos en la población infantil se debe a que son menos inmunogénicos que otros y pasan inadvertidos para sistema inmunológicos inmaduros (164). En EUA y Europa, al inicio del siglo XX, los tipos 1 y 2 causaban el 65% de los casos de neumonía lobular, mientras que el 1, 2, y 3 juntos ocasionaban el 75% de las bacteremias y el 5 empezaba a figurar. Actualmente, los tipos 2 y 5 casi nunca se aíslan en la región occidental y el 1 es detectado sólo en contadas ocasiones (100, 197).

En los países en vías de desarrollo, el patrón de distribución es muy similar al observado en EUA y Europa en los inicios del siglo XX, con predominio del los tipos 1 y el 5. Los serotipos 1, 2, 3 y 5 son más inmunogénicos que otros, se han aislado menos en portadores y muestran una clara tendencia a propagarse en forma epidémica (157). Por ello, en condiciones de pobreza y hacinamiento, las patologías se deben más al contacto con enfermos; por su parte, en los países desarrollados, los focos infecciosos suelen radicar en los niños que son portadores asintomáticos (191).

Ciertamente, la edad tiene que ver con la frecuencia de las neumococcias: éstas son hasta 50 veces más comunes en niños menores de 2 años y en adultos mayores de 65. Sin embargo, también se han detectado otros factores predisponentes; por ejemplo, la proporción hombre:mujer es de aproximadamente 1.5:2.1, lo que podría deberse al tabaquismo y alcoholismo,

que aún se estiman mayores en los hombres. Sin embargo, son más determinantes la disminución en el reflejo de la tos, la función ciliar alterada e insuficiencias inmunológicas tales como la alfa o hipogammaglobulinemia, defectos del sistema del complemento, leucopenia o asplenia (157).

Lipsky y colaboradores sugieren que la demencia, los desórdenes convulsivos, el tabaquismo, la falla cardíaca congestiva, la enfermedad cerebrovascular y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica son factores de riesgo estadísticamente independientes para neumonía neumocócica en pacientes masculinos hospitalizados (117).

Nuorti y colaboradores establecieron que el tabaquismo, tanto activo como pasivo, fue el factor de riesgo individual más importante para enfermedad neumocócica invasiva en adultos inmunocompetentes de 18 a 64 años de edad. Otros factores mencionados son la raza negra, el bajo nivel de educación, las enfermedades crónicas y la convivencia con niños menores de 6 años que asisten a guarderías (155).

La asplenia funcional o anatómica es otro importante factor predisponente en pacientes con anemia falciforme, talasemia mayor o enfermedad maligna y, en menor grado, en quienes la esplenectomía fue necesaria debido a algún trauma (157). En el paciente alcohólico, el etanol puede provocar la disminución en la movilidad de los neutrófilos y una menor eficacia bactericida (157).

Finalmente, *S. pneumoniae* es el patógeno bacteriano identificado más comúnmente en los casos de neumonía que afectan a los pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), en quienes se calcula que muestran un riesgo 10 a 100 veces mayor de sufrir neumonía neumocócica que el resto de la población. Sin embargo, la tasa de fatalidad entre ambos grupos no parece diferir, debido en parte a que generalmente los pacientes VIH positivos son jóvenes que no presentan alguna otra enfermedad predisponente y reciben atención médica más tempranamente (157).

c) Inmunología

La colonización nasofaríngea con este microorganismo, ocurre en aproximadamente un 40% de la población general e inicia poco tiempo después del nacimiento. La unión al epitelio nasofaríngeo depende de la intraconversión entre los dos fenotipos de *S. pneumoniae* previamente mencionados: opaco y transparente. Sólo este último es capaz de persistir en la nasofarínge *in vivo* y su adherencia al tracto respiratorio superior está mediada por un receptor disacárido presente en la fibronectina del tejido faríngeo (5, 202).

Los neumococos se adhieren fuertemente al epitelio nasofaríngeo vía diversos mecanismos los cuales, en la mayoría de los individuos, traen como

consecuencia una respuesta inmune que genera inmunidad específica. Sin embargo, en algunas personas, esta respuesta no se desencadena, lo que permite al microorganismo alcanzar los pulmones o el oído medio (78). El paso del microorganismo a través de la trompa de eustaquio se acompaña por cambios en los receptores de superficie de la célula epitelial, inducidos principalmente por la neuraminidasa neumocócica, aunque la inflamación del oído medio es debida a la acción de algunos componentes de la pared celular y a ello se agrega la acción citotóxica de la neumolisina sobre las células ciliadas de la cóclea (119). Además, la adherencia de los neumococos a las células epiteliales de la tráquea puede aumentar si existe una infección viral previa (168).

Es posible que la potenciación de la adherencia esté mediada por una neuraminidasa viral que escinde al ácido siálico de los glucoesfingolípidos presentes en el tejido pulmonar, lo que descubriría otras estructuras receptoras del neumococo (111).

Para llegar al tracto respiratorio inferior formando parte de algún aerosol, el neumococo evita las células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio superior, a menos de que existan daños previos en él (199). De esta manera alcanza los alvéolos y se asocia a las células alveolares específicas, que producen un surfactante que contiene colina, cuya producción es importante para que la colonización resulte exitosa (77, 202).

Los mecanismos mediante los cuales el neumococo pasa de la nasofaringe al pulmón para causar neumonía o para alcanzar directamente la sangre y ocasionar septicemia aún no se han estudiado plenamente. No obstante, buena parte de las infecciones se presenta en individuos que tienen mucho tiempo como portadores sanos, aunque generalmente aquellas ocurren cuando se adquiere un serotipo distinto (81, 98). Estas observaciones confirman lo que se conoce ampliamente: el estado inmunológico del hospedero determina en gran medida el tipo de interacción que se efectuará en la nasofaringe, incluida la posibilidad de la invasión, lo que también implica a la virulencia de la cepa en turno (73).

El neumococo crece debido principalmente a que la cápsula dificulta la fagocitosis (163, 199). Los componentes de la pared celular activan directamente cascadas inflamatorias múltiples, abarcando a la activación alterna del complemento, a la coagulación y a la liberación de citosinas tales como IL-1, IL-5 y TNF, a partir de los macrófagos y otras células (5, 81).

Conforme el microorganismo empieza a lisarse en respuesta a las defensas del huésped y a los agentes antimicrobianos, se liberan esos componentes de pared celular, la neumolisina y otras sustancias que exacerban la inflamación y los efectos citotóxicos. Dicha neumolisina y el peróxido de hidrógeno matan células e inducen la producción del radical óxido nítrico, el cual puede jugar un papel importante en el origen del shock séptico (58, 63, 179).

Cuando fallan los mecanismos de defensa del tracto respiratorio, tanto específicos (IgA secretoria) como no específicos (la tos, el moco y el movimiento ciliar), se facilita el acceso del neumococo a los bronquios y los pulmones (23, 148).

Los efectos de la neumolisina sobre el movimiento ciliar de las células epiteliales, así como la acción de la IgA1 proteasa hidrolizando a los anticuerpos IgAs también resultan trascendentales en el proceso infeccioso global. El daño tisular sobre la capa epitelial constituye una constante y la erosión de los vasos y capilares sanguíneos por efecto de la inflamación permite el acceso del neumococo a la sangre, si bien la alteración también se puede deber a infecciones virales respiratorias previas (60). El microorganismo puede migrar del torrente circulatorio a las meninges y lesionar el endotelio, aunque también puede alcanzar el espacio subaracnoideo desde la nasofaringe (23).

La multiplicación del neumococo en los pulmones, meninges u oído medio trae como consecuencia un grado importante de lisis neumocócica, liberándose productos de la pared celular y neumolisina. La propia lisozima que se acumula puede contribuir a la lisis neumocócica, activando a la autolisina (44).

La lisis neumocócica en estadios posteriores intensifica el proceso inflamatorio directamente, vía la atracción y activación de los fagocitos, e

indirectamente, mediante la activación del complemento y la formación de anafilotoxinas. De hecho, estos efectos se relacionan con la elevada morbilidad y mortalidad de la infección neumocócica, e inclusive, algunos autores aseguran que la terapia antibiótica no mejora el curso o pronóstico de la enfermedad durante algún lapso, precisamente porque originan la lisis de la célula neumocócica (23, 31, 148).

Durante la invasión, la interacción entre la colina de la pared celular y la proteína G del factor de activación plaquetaria del hospedero (PAF), propicia una alteración de la permeabilidad vascular, misma que en el pulmón genera un exudado inflamatorio que se torna cada vez más purulento con la progresiva llegada de leucocitos (199).

Los neumococos invaden las células endoteliales y otras células humanas merced a la colina ligada al ácido teicoico de su pared celular, ya que aquella funge como punto de unión para el PAF y la proteína de unión a colina; así mismo, la CbpA neumocócica se une a un carbohidrato específico de la célula alveolar. Una vez unido al PAF, el nemococo se internaliza en la célula “blanco” dando lugar a una vacuola generada por un proceso endocítico mediado por receptores; posteriormente, la vacuola se desplaza dentro de la célula liberando a la bacteria hacia la superficie abluminal. A este respecto, *in vitro*, el neumococo se adhiere y atraviesa la barrera endotelial en aproximadamente 4 horas (139, 199).

Cuando ocurre la bacteremia, el riesgo de una meningitis se incrementa. En este caso, los microorganismos se adhieren a las vellosidades cerebrales utilizando los mismos mecanismos (colina-receptor PAF y de CbpA-receptor de carbohidrato) y, empleando el mecanismo de endocitosis del receptor PAF para la migración celular, llega al fluido cerebroespinal, liberando una gran variedad de componentes, particularmente de la pared celular, los cuales potencian la respuesta inflamatoria (5).

Cabe señalar que la proliferación irrestricta del neumococo en cualquier sitio de infección no ocurre con frecuencia en los individuos sanos, en quienes los macrófagos alveolares y los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) infiltrados eliminan a las bacterias, sobre todo cuando se encuentran presentes anticuerpos específicos y el complemento (88). La opsonización es fundamental para la eliminación efectiva del neumococo: cuando el sistema fagocitario o la producción de opsoninas se encuentran afectados, suele evidenciarse una clara predisposición hacia las infecciones neumocócicas (98). Ello resulta frecuente cuando se trata de individuos sin suficiente producción de anticuerpos (hipogammaglobulinemia, incapacidad infantil para producir anticuerpos antipolisacáridos, deficiencia de IgA), en ausencia de opsoninas no específicas (deficiencias del sistema del complemento) y defectos del sistema fagocitario (asplenia, neutropenia, enfermedad de Hodgkin, etc.). Una vez ingerido el neumococo y atrapado en el fagolisosoma, los neumococos son destruidos, aún en los casos en que los PMNs no

generan una reacción oxidativa normal, como se percibe en los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (98, 123).

La eliminación del neumococo en ausencia de anticuerpos específicos puede facilitarse mediante la activación del complemento mediada por la proteína C reactiva. Los efectos antineumocócicos de esta proteína no se basan en la capacidad para inducir fagocitosis, excepto en los serotipos cuyos polisacáridos capsulares poseen fosforilcolina (39, 73). Otros mecanismos no mediados por anticuerpos incluyen la fagocitosis y la activación del complemento mediadas por lectinas, proteínas abundantes en los macrófagos del hígado y bazo, las cuales reconocen numerosos carbohidratos. La lectinofagocitosis no parece ser un mecanismo general contra todos los neumococos, sino sólo los de algunos serotipos (156).

En presencia de anticuerpos anticapsulares IgG, los neumococos se eliminan rápidamente de la sangre, principalmente en el hígado y bazo, aunque se requiere la presencia de complemento para que exista una acción completa. La presencia de complemento en la cápsula (no en la pared celular), activado por la vía clásica o alterna, por la proteína C reactiva o por anticuerpos, suele potenciar la fagocitosis y la eliminación neumocócica (123).

Los efectos protectores de los anticuerpos anti-polisacáridos de pared celular no residen en la fagocitosis de los neumococos, sino en la neutralización de los efectos inflamatorios de dichos componentes (192, 73).

En resumen, el combate de las enfermedades neumocócicas requiere de un sistema de complemento funcional y la inducción de anticuerpos opsonizantes anti-polisacárido capsular. En ausencia de uno o ambos factores, un individuo inmunocomprometido infectado con *S. pneumoniae* experimentará padecimientos riesgosos (98, 157).

Según algunos autores, los anticuerpos dirigidos contra los polisacáridos capsulares presentan uno de los principales factores de protección, muy superior a los anticuerpos contra polisacáridos de pared celular, neumolisina y proteína A de superficie, que también han mostrado eficacia, principalmente en animales. La actividad protectora de los anticuerpos anti-neuraminidasa y anti-autolisina resulta aún menor (26, 158).

Se han encontrado niveles detectables de IgM contra fosforilcolina en infantes afectados por *S. pneumoniae*, durante el primer año de vida. Estos anticuerpos se encuentran presentes prácticamente en todos los niños y adultos, pero sus niveles disminuyen después de los 50 a 60 años de edad (149). Los infantes pueden producir anticuerpos anti-polisacáridos capsulares de la clase IgG durante una infección neumocócica, pero esto prácticamente no ocurre en el caso de portadores asintomáticos de los serotipos pediátricos 23F y 19F, mismos que son poco inmunogénicos (21, 158).

La respuesta inmune a los antígenos proteicos requiere la cooperación de los linfocitos T con los B, por lo que los antígenos proteicos son llamados timo-dependientes o células T-dependientes. La activación y diferenciación adecuadas de las células B antígeno específicas, en células de memoria y células productoras de anticuerpo, la unión de los antígenos a su receptor antigénico no es suficiente, ya que se necesita la participación de los linfocitos T y de diversas citosinas. La respuesta dependiente de las células T se caracteriza por implicar memoria inmunológica que se hace evidente al aplicarse vacunaciones subsecuentes. Los anticuerpos primarios producidos frente a las proteínas implicadas son del tipo IgM e IgG, mientras que las subclases que predominan en una respuesta inmune secundaria -en humanos- son IgG1, IgG4, IgM, IgG2, IgA e IgG3 (110, 148).

Por su parte, los polisacáridos capsulares neumocócicos generan respuestas inmunes timo-independientes (TI) (19, 140). Estos antígenos se subclasifican en los tipos 1 y 2 según su capacidad para inducir la formación de anticuerpos en cepas de ratones inmunodeficientes. Los antígenos TI del tipo 2 no se asocian a respuestas inmunológicas en ratones e incluyen diversas clases de polisacáridos, polipéptidos y polinucleótidos; así mismo, son poco inmunogénicos en infantes menores de 18 a 24 meses de edad, aunque su inmunogenicidad aumenta con la edad (22, 57).

Aunque las células T no se requieren para inducir la producción de anticuerpos contra dichos antígenos TI-2, algunas pueden estimular o suprimir

la respuesta inmunológica. Las células T se pueden activar de diferentes maneras para modular las respuestas anti-polisacáridos: la activación directa con participación del receptor de las células T (TCR) que se ensambla a polisacáridos, oligosacáridos o glicolípidos ligados a las moléculas clase II (MHC II) del complejo mayor de histocompatibilidad, no es muy factible, aunque se ha comprobado que el TCR puede reconocer glicopéptidos unidos al MHC II. Otra posibilidad de que se activen las las células T regulatorias es reconociendo a las determinantes idiotípicas de las células B sacárido-específicas, tal como se ha observado en las respuestas de IgG anti-dextran (12, 195). Las células T, macrófagos, mastocitos y células asesinas naturales (NK) también podrían influir en la respuesta a los antígenos TI-2 por medio de citosinas (12).

A diferencia de las respuestas timo-dependientes, las timo independientes de la clase 2 son oligoclonales, dependientes de la edad del hospedero y se caracterizan por la falta de maduración y la incapacidad de generar memoria inmunológica; no obstante, pueden activar células de memoria preexistentes (140). Los polisacáridos inducen principalmente la formación de anticuerpos IgM e IgA y las subclases de anticuerpos IgG producidas en humanos son IgG2, IgG1, IgG3, e IgG4, en orden decreciente de producción. Algunos estudios han revelado que los anticuerpos IgA (principalmente los IgA2) son los más abundantes en el suero después de la inmunización con polisacáridos neumocócicos o de otros orígenes (12, 149).

A la fecha no se conocen bien los mecanismos moleculares que conducen a la activación y diferenciación de las células B por medio de antígenos TI-2 (140). Para el caso de los antígenos timo-dependientes, es claro que las señales de activación son generadas por las células T auxiliares; sin embargo, estudios *in vitro* han mostrado que los polisacáridos que se unen a las Ig de superficie de las células B suelen estar recubiertos por moléculas de C3d que, a su vez, son reconocidas por el receptor CR2 de las mencionadas células B; ambas reacciones generan señales que terminan con la secreción de IgM dirigidas contra los polisacáridos correspondientes. Aunque la activación vía C3d aún no se ha demostrado *in vivo*, su importancia es congruente con el descubrimiento de que las células B tienen una baja expresión de CR2 en la zona marginal del bazo de neonatos; a este respecto, es preciso subrayar que dichas células sólo participan en la iniciación de respuestas TI-2 a partir de los 2 años de edad (116).

d) Tratamiento

En el tratamiento y manejo de las infecciones neumocóccicas resultan particularmente importantes los agentes antimicrobianos y vacunas; de hecho, durante muchos años la penicilina fue el agente terapéutico de elección contra las infecciones neumocóccicas y las alternativas incluían cefalosporinas de bajo espectro, eritromicina y vancomicina (50).

Los antibióticos beta-lactámicos son los más utilizados para combatir a este microorganismo, destacando las penicilinas, cefalosporinas, monobactam y carbapenem, los cuales actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, nivel al que también actúa la vancomicina, si bien ésta es un glucopéptido y no un beta-lactámico (50, 101).

En 1967 se describieron por primera vez infecciones clínicas debidas a neumococos resistentes a penicilina en Australia y Nueva Guinea. En la década siguiente se reportaron otros casos en Sudáfrica y el problema se ha extendido mundialmente, convirtiéndose en un desafío clínico de gran importancia (84).

En 1998, la red del Sistema Regional de Vacunas (SIREVA) efectuó un estudio en diversos países de América Latina, el que reveló que 24.9% de las cepas aisladas mostraban baja susceptibilidad a la penicilina: 16.7% evidenciaban resistencia intermedia y 8.3% resistencia alta. El mismo grupo había reportado una resistencia global a penicilina de 34.2%, encontrándose en Brasil la más baja (22.3%) y en México la más alta (49.4%), todo ello referido a cepas de neumococos causantes de enfermedad invasiva en población pediátrica (92).

Al efectuarse el análisis de las cepas resistentes se observa que el factor predominante en la emergencia detectada durante la década de los 90 fue el contagio persona a persona de algunas clonas que poseían determinantes de

resistencia a múltiples antibióticos (174). Lógicamente, dichas cepas se expandieron debido al uso indiscriminado de los antibióticos, como lo señalan algunos ejemplos que muestran que el uso de penicilinas en ciertas comunidades ha llevado a la selección de cepas penicilina-resistentes en las mismas. Además, se ha comprobado el incremento en la incidencia de cepas penicilina-resistentes durante los meses de invierno, lo que se explica por el mayor empleo de antibióticos en el invierno; otro factor que contribuye a la distribución de neumococos resistentes reside en que los niños portadores de esa clase de microorganismos los transmiten a sus compañeros de clase, guardería, juegos, etc. (1, 50, 84, 174)

Los macrólidos tales como la eritromicina también se prescriben para tratar neumococcias; actúan a nivel molecular uniéndose a los ribosomas libres y, por tanto, impiden la síntesis proteica. El fenómeno de propagación de clonas resistentes a dicho antimicrobiano también se ha observado en distintas comunidades estudiadas (167).

Las sulfonamidas tales como el sulfametoxazol también se emplean con alguna frecuencia para tratar neumococcias y, en este sentido, actúan previniendo la síntesis de ácido fólico bacteriano; así mismo, las fluoroquinolonas se unen a la ADN girasa, evitando la síntesis del ADN bacteriano (50, 174)

Existen definiciones para considerar a una cepa como “resistente” o “intermedia”, con base en pruebas de susceptibilidad microbiana. Estos estándares se actualizan periódicamente y deben usarse para determinar la terapia microbiana óptima frente a las infecciones neumocócicas; se ha observado que las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) tienen un diferente significado dependiendo del sitio de infección. Por ejemplo, una sensibilidad “intermedia” no predice que el tratamiento vaya a fallar en una neumonía pero sí en una otitis media; del mismo modo, hay evidencias de que el uso de penicilina, aún en dosis elevadas, no resulta una opción adecuada para la terapéutica de meningitis causadas por neumococos no susceptibles (165).

La tabla 4 presenta las CMI de diversos antimicrobianos en relación con *S. pneumoniae* (151).

| Antibiótico | CMI (mcg/mL) estándar | | | Comentarios |
|---|-----------------------|----------|--------|--|
| | S | I | R | |
| Penicilina ¹ | <= 0.06 | 0.12-1 | >= 2 | Altas dosis de penicilina IV (por ej. > 2 MU cada 4 h en adultos con función renal normal) o ampicilina (por ej. >= 2 g IV cada 6 h) son efectivas para el tratamiento de neumonía neumocócica causadas por cepas en la categoría intermedia. |
| Amoxicilina (no meningitis) o | <= 2 | 4 | >= 8 | |
| amoxicilina-clavulanato (no meningitis) | <= 2/1 | 4/2 | >= 8/4 | |
| Cefotaxima (meningitis) o | <= 0.5 | 1 | >= 2 | Para aislamientos a partir de LCR sólo se reportan los casos de meningitis. Usar cefotaxima (2g IV cada 4 a 6 h) o ceftriaxona (2g IV cada 12 h). En meningitis deben usarse las dosis máximas. |
| Ceftriaxona (meningitis) | <= 0.5 | 1 | >= 2 | |
| Cefotaxima (no meningitis) o | <= 1 | 2 | >= 4 | Para aislamientos que no son del LCR, se reportan todos los casos sean o no meningitis. De cefotaxima, en el caso de que no se trate de meningitis, se requieren dosis adecuadas para infecciones neumocócicas serias (1 g IV cada 6 h en adultos o 50-75 mg/kg IV cada 6 h para niños). |
| Ceftriaxona (no meningitis) | <= 1 | 2 | >= 4 | |
| Imipenem | <= 0.12 | 0.25-0.5 | >= 1 | |
| Meropenem | <= 0.25 | 0.5 | >= 1 | |
| Vancomicina | <= 1 | --- | --- | |
| Eritromicina y claritromicina | <= 0.25 | 0.5 | >= 1 | |
| Azitromicina | <= 0.5 | 1 | >= 2 | |
| Tetraciclina | <= 2 | 4 | >= 8 | Las cepas que son susceptibles a tetraciclina también se consideran susceptibles a doxiciclina y minociclina. |
| Levofloxacina or | <= 2 | 4 | >= 8 | |
| Gatifloxacina or | <= 1 | 2 | >= 4 | |
| Moxifloxacina | <= 1 | 2 | >= 4 | |
| Clindamicina | <= 0.25 | 0.5 | >= 1 | No se reporta rutinariamente en aislamientos de tracto urinario. |
| Quinupristina-dalfopristina | <= 1 | 2 | >= 4 | |
| Linezolid | <= 2 | --- | --- | |

CLAVES: LCR = líquido cefalorraquídeo; I = intermedia; IV = intravenosa; MU = millón de unidades; R = resistente; S = susceptible; ¹ = Un neumococo susceptible a penicilina también se considera que lo es a ampicilina, amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina-sulbactamo, cefaclor, cefdinir, cefepima, cefetamet, cefixima, cefotaxima, cefprozil, ceftibuten, ceftriaxona, cefuroxima, cefpodoxima, ceftizoxima, ertapenem, imipenem, loracarbef y meropenem. El medico debe tomar en cuenta que la respuesta clínica frente a estos agentes puede ser menor en las cepas que no son susceptibles a penicilina (169).

Tabla 4. Estándares de CMI (en mcg/mL) para *Streptococcus pneumoniae*

Evidentemente, existen diferentes mecanismos de resistencia. Por ejemplo, entre los patógenos que causan otitis media, el más simple consiste en la producción de beta-lactamasas, enzimas que rompen el anillo beta-lactámico de las penicilinas y otras beta-lactaminas, lo cual se traduce en la inactivación del antimicrobiano; sin embargo, es importante considerar que *S. pneumoniae* no basa su resistencia en la producción de beta-lactamasas (por lo que no responde a los tratamientos combinados tendientes a neutralizar la acción de esta clase de enzimas, entre los cuales destacan la amoxicilina/clavulanato y la amoxicilina/sulbactam (174, 198). La resistencia a penicilina en los neumococos está mediada por mutaciones genéticas que dan como resultado alteraciones en moléculas proteicas involucradas en la síntesis de la pared celular bacteriana: las transpeptidasas, conocidas como proteínas de unión a penicilina (PBP) (174). Estas moléculas son membranales y catalizan los pasos terminales de la formación de la pared celular bacteriana, por lo que su eventual inhibición da lugar a una pared celular debilitada que conduce a la lisis bacteriana. En tal sentido, la alteración genética de las transpeptidasas elimina la posibilidad de que la bacteria se una a la penicilina u otros antibióticos beta-lactámicos, incluidas las cefalosporinas, lo que impide la acción antimicrobiana del fármaco. Las proteínas “clave” involucradas en la resistencia a penicilina incluyen a la PBP1a, PBP1b, PBP2a, PBP2b y PBP3 (50, 174, 215).

La resistencia de *S. pneumoniae* a otros antibióticos también se ha venido extendiendo, por lo que hoy en día también la hay frente a macrólidos,

trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol, tetraciclinas y quinolonas. Los mecanismos que median la resistencia son múltiples y, con cierta frecuencia, la resistencia adquirida a una clase particular de antibióticos, coincide con la que se manifiesta a otros antimicrobianos. Por ejemplo, 94% de las cepas susceptibles a penicilina también lo son a azitromicina y sólo el 17% de las clonas penicilina-resistentes son susceptibles a dicho macrólido (101, 174).

Tabla 5. Mecanismos de resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a diversos antimicrobianos.

| Antibiótico | Mecanismo de resistencia |
|----------------------------|---|
| Penicilina | Alteración del sitio blanco: proteínas enlazantes de penicilina alteradas |
| Macrólidos | Mecanismos de eflujo (resistencia baja) Alteración del sitio blanco: metilación del rRNA (resistencia elevada) |
| Quinolonas | Alteración del sitio blanco: alteración de la ADN girasa o topoisomerasa IV |
| Trimetoprim-sulfametoxazol | Vía bypass metabólico |
| Cloranfenicol | Transformación enzimática con acetiltransferasas |
| Rifampina | Alteración del sitio blanco: alteración de la subunidad beta de la RNA polimerasa |

La prevalencia de cepas resistentes a penicilina se ha incrementado dramáticamente durante la última década, con tasas de 15 a 35% (101, 166).

La resistencia a los macrólidos, tetraciclinas y trimetoprim-sulfametoxazol también ha aumentado. En el primer caso, está mediada ya sea por mecanismos de eflujo (baja resistencia) o por una metilasa ribosomal (resistencia elevada) (185).

Las cepas resistentes a penicilina también lo son a cefalosporinas tales como ceftriaxona y cefotaxima. La vancomicina es activa casi frente a todas las cepas de *S. pneumoniae* pero empiezan a presentarse cepas tolerantes a este glucopéptido (154).

Las fluoroquinolonas presentan actividad diferencial frente a *S. pneumoniae*: las de primera generación como la ciprofloxacina, norfloxacina y ofloxacina, son activas frente a patógenos Gram negativos y *S. aureus*, pero muestran limitaciones frente a *S. pneumoniae*, lo que impide su empleo (90). Las de segunda generación, como levofloxacina y sparfloxacina, manifiestan una mejor actividad contra cepas susceptibles y resistentes a penicilina, por lo que pueden usarse para el tratamiento de infecciones neumocóccicas, aunque en el caso de la levofloxacina no se cuenta con suficiente experiencia clínica y, por lo tanto, no debe seleccionarse en los casos de meningitis (37). Las de tercera generación, como moxifloxacina y gatifloxacina, éstas son las más activas frente al neumococo, evidencian excelente penetración hacia el tejido pulmonar, pero su uso excesivo no es recomendable pues la resistencia a ellas se desarrolla rápidamente (54). Entre las fluoroquinolonas de cuarta generación se ubican la trovafloxacina y la grepafloxacina pero han sido

retiradas de mercado debido a severas reacciones secundarias adversas (90, 196).

La resistencia frente a quinolonas se ha mantenido por debajo del 1% en los Estados Unidos, pero en el resto del mundo las tasas varían entre 5 y 16%, lo que se debe a que se emplean con alta frecuencia (37, 90).

En otras palabras, se ha observado un aumento en cuanto a la resistencia frente a penicilinas, cefalosporinas y macrólidos, si bien las cifras varían ampliamente en zonas geográficas aisladas o pequeñas, sobre todo en relación con las que se presentan en todo un país. Ello se debe principalmente al tipo de antibióticos que más se usan en cada región, al uso de instalaciones comunitarias como guarderías y a la mayor o menor transmisión de los microorganismos resistentes (196).

Lógicamente, existen numerosos reportes sobre fracasos clínicos de tratamientos contra neumococcias causadas por cepas de *S. pneumoniae* resistentes a diversos antibióticos; sin embargo, los estudios epidemiológicos no registran una mortandad mayor asociada a infecciones invasivas debidas a una cepa resistente, a neumonías adquiridas en la comunidad o a meningitis, lo que podría deberse en parte al uso empírico de fluoroquinolonas y vancomicina al inicio de la enfermedad (62, 126, 127, 215).

La terapia definitiva a seleccionarse para combatir una infección neumocócica se basa en (157):

- El sitio de infección (SNC, tracto respiratorio etc.)
- Resultados de las pruebas de susceptibilidad frente a antibióticos.
- Severidad de la infección
- Factores inherentes al hospedero (alergias a medicamentos, edad, interacciones medicamentosas, función renal y hepática y embarazo)

Las cepas susceptibles de neumococo deben tratarse con una penicilina o cefalosporina, aunque en pacientes alérgicos a ellas es adecuado el empleo de un macrólido (en el caso de infecciones no graves) o vancomicina (si el riesgo para la salud es grande). La dosis del medicamento depende del peso del paciente y de si éste presenta función hepática o renal alterada (35, 157, 197).

Los enfermos con infecciones serias tales como meningitis, endocarditis o sepsis debidas a cepas resistentes a penicilina y cefalosporinas, los cuales no puedan recibir vancomicina o no respondan a ella, son candidatos para regímenes terapéuticos basados en fluoroquinolona, linezolid o quinupristin-dalfopristin, aunque la experiencia con estas drogas es limitada (62, 126).

Tratamiento de la neumonía

La terapéutica recomendada para la neumonía neumocócica ocasionada por cepas susceptibles a penicilina, consiste precisamente en penicilina G o amoxicilina, aunque otras alternativas son las cefalosporinas de primera y segunda generación, macrólidos, fluoroquinolonas o doxiciclina (3). Los pacientes no graves pueden ser tratados con penicilina G o V en dosis de 250 a 500 mg cada 6 h; el régimen para tratamiento parenteral es penicilina G acuosa, de 500,000 a 2 millones de unidades, vía intravenosa, cada 4 a 6 h (3, 132).

El combate de las cepas resistentes a penicilina debe basarse en pruebas de susceptibilidad *in vitro*. La mayor parte de las cepas resistentes responden frente a altas dosis de penicilina, cefotaxima o ceftriaxona. Las nuevas quinolonas (levofloxacin, esparfloxacin) son útiles frente a cepas resistentes a penicilina y por ello representan una alternativa, si bien la vancomicina es el único antibiótico con actividad consistente frente a todas las cepas de *S. pneumoniae* y debe usarse preferentemente en pacientes graves y en áreas con mucha resistencia (3, 132).

Los medicamentos alternativos eficaces incluyen a las cefalosporinas, eritromicina y clindamicina. Debido a que las tetraciclinas son menos activas contra el neumococo, no deben usarse en pacientes seriamente enfermos. Los regímenes orales incluyen a la eritromicina o clindamicina, 300 mg cada 6 h; en los parenterales destacan la cefotaxima 1 a 2 g IV cada 6 h, ceftriaxona

1 a 2 g IV cada 12 h, cefazolina 500 mg IV cada 8 h, eritromicina 500 mg a 1 g IV cada 6 h y clindamicina 300 a 600 mg IV cada 6 a 8 h. Las demás cefalosporinas de tercera generación son relativamente inactivas frente al neumococo. (3, 132)

Si se sospecha meningitis, el paciente deberá recibir cefotaxima 2g IV cada 4 a 6 h o ceftriaxona 1 a 2 g IV cada 12 h más vancomicina 1 g IV cada 12 h con o sin rifampina 600 mg al día, hasta contar con los resultados de susceptibilidad. Para los pacientes con empiema, el tratamiento debe incluir el drenado adecuado y antibióticos parenterales (3, 132).

Los tratamientos de soporte incluyen reposo en cama, administración de líquidos y analgésicos para el dolor pleural. En pacientes con cianosis, hipoxemia, disnea severa, enfermedad circulatoria o delirio, debe aplicarse oxígeno. En individuos con enfermedad pulmonar crónica, el oxígeno debe aplicarse con un monitoreo cuidadoso y frecuente de gases sanguíneos (3).

El tratamiento empírico de elección para la neumonía adquirida en la comunidad depende de la severidad del cuadro y de algunos otros factores epidemiológicos aunque, como regla general, deben utilizarse únicamente fluoroquinolonas con alta actividad antineumocócica, tales como la levofloxacin, moxifloxacin y gatifloxacin (132).

Tabla 6. Terapia recomendada para el tratamiento de la neumonía

| Severidad de la enfermedad | Otros factores | Terapia |
|----------------------------|--|--|
| Paciente externo | --- | Doxiciclina o un macrólido o una fluoroquinolona |
| | Paciente de edad avanzada con alguna otra enfermedad | Una fluoroquinolona |
| Hospitalizado | Hospitalización general | Cefalosporina de amplio espectro más un macrólido o beta-lactámico/inhibidor beta-lactamasa, más un macrólido o fluoroquinolona (sola) |
| | Unidad de cuidados intensivos | Cefalosporina de amplio espectro o un beta-lactámico/inhibidor beta-lactamasa más un macrólido o fluoroquinolona |
| | Unidad de cuidados intensivos (alergia a beta-lactámicos) | Fluoroquinolona ± clindamicina |
| | Unidad de cuidados intensivos (posible aspiración) | Fluoroquinolona ± clindamicina o metronidazol o un beta-lactámico/ inhibidor beta-lactamasa |
| Paciente externo | Sin enfermedad cardiopulmonar o algún otro factor | Azitromicina o claritromicina o doxiciclina |
| Paciente externo | Enfermedad cardiopulmonar o algún otro factor | Beta-lactámico (cefpodoxima oral, cefuroxima, amoxicilina en altas dosis, amoxicilina-clavulanato o ceftriaxona parenteral) seguida de defpodoxima oral más un macrólido, doxiciclina o una fluoroquinolona (sola) |
| Hospitalizado | Hospitalización General: Enfermedad cardiopulmonar o algún otro factor | Betalactámico intravenoso (cefotaxima, ceftriaxona, ampicilina/sulbactam, altas dosis de ampicilina) más un macrólido intravenoso u oral o doxiciclina o fluoroquinolona intravenosa. |
| Hospitalizado | Hospitalización General: Sin enfermedad cardiopulmonar o algún otro factor | Azitromicina intravenosa Si hay intolerancia o alergia a macrólidos, utilizar doxiciclina y un betalactámico o monoterapia con una fluoroquinolona. |
| Hospitalizado | Unidad de cuidados intensivos: sin riesgo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Betalactámico intravenoso (cefotaxima o ceftriaxona) más un macrólido intravenoso (azitromicina) o una fluoroquinolona intravenosa. |
| Paciente externo | --- | Un macrólido o doxiciclina o un beta lactámico oral (cefuroxima, amoxicilina, amoxicilina/clavulanato) [segunda línea de tratamiento: una fluoroquinolona] |
| Hospitalizado | Hospitalización General | Beta lactámico parenteral (cefuroxima, cefotaxima, ceftriaxona, ampicilina, ampicilina/sublactam) más un macrólido. [segunda línea de tratamiento: una fluoroquinolona] |
| Hospitalizado | Unidad de cuidados intensivos | Betalactámico intravenoso (cefotaxima, ceftriaxona) más un macrólido intravenoso o una fluoroquinolona. |

Tratamiento de la otitis

La terapia antibiótica debe administrarse para aliviar los síntomas y acelerar la recuperación del paciente, así como para reducir la probabilidad de infecciones intracraneales o del laberinto y de daños residuales auditivos. El medicamento de elección en mayores de 14 años es penicilina V oral, a dosis de 250 mg cada 6 h durante 12 días. En los menores de 14 años se emplean 35 a 70 mg/kg/día de amoxicilina oral, en tres dosis iguales cada 8 h durante 7 a 12 días; este medicamento se prefiere por la frecuencia de infecciones debidas a *H. influenzae* (188). El tratamiento debe continuarse por 12 a 14 días para asegurar la desaparición de la infección y prevenir secuelas. La terapia subsecuente depende de los cultivos, las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos y el curso clínico de la enfermedad (133). Cuando se presenta alergia a la penicilina, se administra eritromicina oral en dosis de 250 mg cada 6 h para adultos o una combinación de eritromicina (30 a 50 mg/kg/día vía oral) y sulfisoxazol (150 mg/kg/día, vía oral), ambos divididos en dosis iguales cada 6 h para niños menores de 14 años, durante 12 a 14 días (133, 188).

Las sulfonamidas no deben administrarse a los menores de 2 meses. Alternativamente, puede utilizarse trimetoprim y sulfametoxazol: en infantes mayores de 2 meses y en niños, 8/40 mg/kg/día en dos dosis divididas cada 12 h por 10 días; en adultos 160/800 mg cada 12 h durante 12 días. Otra opción para niños es una dosis única de ceftriaxona intramuscular (máximo 50 mg/kg) (133, 188).

En casos de resistencia, puede administrarse una cefalosporina durante 12 días, como cefaclor (niños: 40 mg/kg/día cada 8 h; adultos: 250 mg cada 8 h), cefuroxima (menores de 2 años: 125 mg cada 12 h; niños de 2 a 12 años: 250 mg cada 12 h; adultos: 500 mg cada 12 h), amoxicilina-clavulanato (niños: 40mg/kg/día en 3 dosis), claritromicina (niños: 15 mg/kg/día cada 12 h) o cefixima (niños: 8 mg/kg/día en dos dosis; adultos: 200 mg cada 12 h) (133, 188).

Para mejorar la función de la trompa de Eustaquio, pueden aplicarse vasoconstrictores tópicos tales como fenilefrina al 0.25%, 3 gotas cada 3 h vía nasal, pero esta terapia no debe exceder los 3 a 4 días. La pseudoefedrina puede ser útil pero su uso no se recomienda en niños; si además el paciente es alérgico, pueden administrarse antihistamínicos tipo clorfeniramina (4 mg cada 4 a 6 h por 7 a 10 días) para mejorar la función del tubo de Eustaquio (133, 188).

Tratamiento de la sinusitis

En esta afección, la terapia tiene como objetivo mejorar el drenado de los senos y controlar la patología. En tal sentido, la inhalación de vapor produce vasoconstricción y promueve el drenado, tal como también lo logran los lavados salinos nasales. Los vasoconstrictores tópicos como la fenilefrina (0.25% cada 3 h como spray nasal) son efectivos pero deben ser usados un máximo de 7 días; por su parte, los vasoconstrictores sistémicos tales como la

pseudoefedrina (30 mg vía oral cada 4 a 6 h) son menos efectivos (59). En la sinusitis aguda y la crónica, los antibióticos deben administrarse por lo menos durante 10 a 12 días; para la aguda la penicilina V es el antibiótico de primera elección (250 mg cada 6 h vía oral) y la eritromicina (250 mg cada 6 h) es la de segunda elección. En la exacerbación de la sinusitis crónica, lo más indicado consiste en un antibiótico de amplio espectro como la ampicilina (250 a 500 mg cada 6 h) o la tetraciclina (250 mg cada 6 h) (149, 150, 152). El tratamiento antibiótico de la sinusitis crónica debe durar 4 a 6 semanas para eliminar por completo la infección. Los estudios de susceptibilidad de los patógenos aislados a partir de los exudados nasales y la respuesta del paciente deben guiar la terapia subsecuente. Cuando la sinusitis no responde frente a los antibióticos, puede requerirse la cirugía para mejorar la ventilación y el drenado y para remover el material mucopurulento y la membrana mucosa hipertrófica (50, 54, 133, 134).

Tratamiento de la bacteremia

Los antibióticos son indispensables para disminuir los riesgos de la propia bacteremia y de posibles complicaciones secundarias, como sepsis, meningitis, neumonía y artritis. La elección del antibiótico depende de los perfiles de susceptibilidad para la región geográfica específica (135, 171).

La penicilina y la amoxicilina son los antibióticos de primera elección en pacientes no hospitalizados sin signos de infección bacteriana grave. En los graves estos mismos fármacos pueden administrarse parenteralmente. La

dosis de penicilina para adultos es de 500 mg (800,000 U) vía oral o 10-30 millones de U/día IV cada 4 a 6 h. La dosis pediátrica es de 25 mg (40,000 U) a 50 mg/kg/día (80,000 U/kg/día) vía oral o 100,000 a 400,000 U/kg/día IV cada 4 a 6 h. En el caso de pacientes no hospitalizados con cultivo positivo de neumococo, los cuales se presentan afebriles, con buena apariencia y sin evidencia de infección focal, pueden administrarse antimicrobianos orales como amoxicilina (adultos: 1.5 a 3 g/día vía oral en tres tomas; niños: 40-80 mg/kg/día cada 8 h) (135).

La ampicilina puede usarse cuando se requiere tratamiento parenteral, siempre que no se evidencie resistencia a la penicilina. La dosis para adultos es de 500 a 3,000 mg por vía intravenosa o intramuscular, cada 4 a 6 h sin exceder los 12 g/día. En niños, la dosis adecuada es de 100-400 mg/kg/día IV o IM cada 6 h (135).

Cuando el enfermo experimenta bacteremia neumocócica oculta debido a su edad o presenta fiebre muy elevada y leucocitosis, deben administrarse antibióticos empíricos y la ceftriaxona por vía parenteral es el antibiótico de elección. La dosis en adultos es de 1 a 4 g/día vía IV o IM cada 12 h y, en niños, de 50-100 mg/kg/día por vía IM o IV cada 12 h. Los pacientes con bacteremia neumocócica comprobada pueden ser tratados con penicilina o cefalosporina, a menos de que la cepa manifieste resistencia en las pruebas de susceptibilidad. Las infecciones que ponen en riesgo la vida deben tratarse con vancomicina hasta recibir los resultados del antibiograma. La dosis para

adultos es de 2 g/día cada 6 a 12 h y, la pediátrica, de 60 mg/kg/día cada 6 h. (54, 196).

Tratamiento de la meningitis

El incremento en la aparición de cepas resistentes a penicilina ha cambiado el manejo de la meningitis neumocócica. Lógicamente, el tratamiento debe incluir un antibiótico que alcance altos niveles en el líquido cefalorraquídeo, lo cual depende de la liposolubilidad del medicamento, de su tamaño molecular, de su capacidad para unirse a proteínas y del estado inflamatorio de las meninges. Las penicilinas, las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, el carbapenem, fluoroquinolonas y la rifampina llega a altas concentraciones en el LCR (41, 207).

La dosis de los agentes antimicrobianos debe ajustarse de acuerdo con la función renal y hepática del paciente y, en ocasiones, es necesario realizar pruebas de concentración sérica para asegurar la existencia de niveles adecuados y evitar la toxicidad con el uso de medicamentos, aún tratándose de un índice terapéutico estrecho como el de la vancomicina y los aminoglucósidos. También debe considerarse el uso de esteroides como la dexametasona (0.4 mg/kg IV cada 12 hrs 15-20 minutos antes de la administración del antibiótico) como tratamiento adjunto, ya que se ha demostrado que reduce la tasa de mortandad y las secuelas (67, 109).

El tratamiento empírico para meningitis bacteriana depende de la edad del paciente y de la existencia de algún factor predisponente. En enfermos de 0 a 4 semanas de edad el antibiótico de elección es la ampicilina (100-250 mg/kg/día IV o o IM cada 6 h) más cefotaxima (50 mg/kg/día IV cada 6 h) o algún aminoglucósido como la gentamicina (2.5 mg/kg IV/IM cada 8 h). Para 1 a 3 meses de edad, se administra ampicilina (100 a 400 mg/kg/día IV o IM cada 6 h) más cefotaxima (50 mg/kg/día IV cada 6 horas) y vancomicina (15 mg/kg/d IV cada 8 h) (67, 109, 207).

En enfermos de hasta 50 años, el tratamiento adecuado es ceftriaxona (niños: dosis inicial 75 mg/kg y, después, 50 mg/kg IV cada 12 h; adultos: 2-4 g/día IV cada 12 h) o cefotaxima (mayores de 12 años: 2-3 g IV cada 4 a 6 h sin exceder los 12 g/día; menores de 12 años: 50-200 mg/kg/día IV cada 6 h sin exceder los 12 g/día) más vancomicina (niños: 15 mg/kg/d IV cada 8 h; adultos: 750 a 1000 mg IV cada 12 h). Un tratamiento alternativo es cloranfenicol (25 mg/kg IV cada 12 hrs) más vancomicina (15 mg/kg IV cada 8 h) o clindamicina (niños: 40 mg/kg/día IV en 3 o 4 dosis; adultos: 1 g IV cada 8 h (67, 109, 207).

Para mayores de 50 años se emplea ampicilina (50 mg/kg IV cada 6 h) más ceftriaxona (2 g IV cada 12 h) o cefotaxima (2 g IV cada 4 h) más vancomicina (750-1000 mg IV cada 12 h or 10-15 mg/kg IV cada 12 h). Si el paciente presenta problemas de inmunidad celular se le trata con ampicilina más ceftazidima (2 g IV cada 8h) y vancomicina (750-1000 mg IV cada 12 h or 10-

15 mg/kg IV cada 12 h) (207). Si el individuo sufre de trauma craneal o neurocirugía se debe usar vancomicina más ceftazidima en las dosis ya mencionadas. En todos estos casos, la vancomicina se emplea empíricamente junto con el régimen inicial si se sospecha de *S.pneumoniae* penicilina-resistente o si existe una alta incidencia de resistencia en la comunidad, aunque la vancomicina tiene un bajo ingreso al LCR y puede disminuir aún más con la adición de dexametasona; por ello, si se utiliza dexametasona una alternativa es la rifampina (600 mg/día) (67, 109, 207). Una vez confirmada la presencia de *S. pneumoniae* y su correspondiente susceptibilidad a penicilina, el antibiótico de elección es la penicilina G (24 millones U/día en dosis cada 4 h o como infusión IV continua) por 10-14 días. La dosis pediátrica es de 100,000 a 400,000 U/kg/d IV cada 4 h sin exceder las 24 millones de U/día. Si el microorganismo es resistente a penicilina se utilizan los esquemas antimicrobianos previamente mencionados (41, 67, 109, 207).

Tratamiento de la endocarditis

Cuando la cepa es susceptible a penicilina, debe utilizarse penicilina G (12 a 20 millones U/día IV continua o cada 4 h durante 4 semanas). Si se utiliza penicilina procaínica la proporción recomendada es de 1.2 millones U IM cada 6 a 12 h por 4 semanas. Los pacientes con endocarditis ocasionada por neumococo resistente a penicilina deben ser tratados con altas dosis de penicilina G combinada con vancomicina (750-1000 mg IV cada 12 h or 10-15 mg/kg IV cada 12 h) (162). Las infecciones por neumococo con resistencia

intermedia y susceptibles a cefalosporina se tratan con cefalosporinas en altas dosis, tales como cefotaxima (2g IV cada 6 a 8 h) o ceftriaxona (2g IV cada 12 h). Las cepas resistentes a cefalosporina pueden combatirse con vancomicina 750-1000 mg IV cada 12 h o 10-15 mg/kg IV cada 12 h (29, 92, 156, 173).

e) Prevención: vacunas

Aun cuando la creciente detección de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a los antibióticos ha impulsado el desarrollo de nuevos regímenes terapéuticos, actualmente es indudable que la mejor estrategia para combatir las enfermedades neumocócicas consiste en la vacunación de los individuos. Ciertamente, se han efectuado diversos estudios para el desarrollo de vacunas efectivas, aunque hoy en día la única aprobada es la vacuna heptavalente conjugada (PNCRM7). En este sentido, la vacunación con la PNCRM7 es segura y efectiva en lactantes y niños, y debe emplearse rutinariamente para evitar que continúen generándose más cepas resistentes de *S. pneumoniae* y que disminuyan los costos asociados al tratamiento (107, 108, 184).

A partir de 1993, diversos estudios epidemiológicos realizados en América Latina, coordinados por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y llevados a cabo por la Red del Sistema Regional de Vacunas (SIREVA), han revelado una alta incidencia de neumonía y meningitis en niños menores de 2 años de edad, incuestionablemente el grupo de mayor riesgo de infección por

neumococo, e inclusive, el más afectado por cepas con menor susceptibilidad a penicilina (107).

Vacunas anti-neumocóccicas

Una de las principales preocupaciones respecto a las enfermedades neumocóccicas tiene que ver con los patrones cambiantes de virulencia, la falta de susceptibilidad a antibióticos y la mayor propagación del microorganismo entre la población. Además, actualmente ocurre una creciente diseminación global de las enfermedades transmisibles, lo que ha extendido la de los neumococos resistentes a diversos antibióticos hacia todos los continentes (53).

Se sabe que el uso indiscriminado de los antibióticos ha provocado el surgimiento de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a múltiples antibióticos y que a pesar del continuo desarrollo de nuevos antimicrobianos, éste es rebasado por la rápida aparición de cepas resistentes a ellos (8, 53).

Las vacunas representan la acción médica de mayor beneficio para prevenir la enfermedad, lo que resulta particularmente importante en los países en vías desarrollo, en donde más del 80% de los niños de hasta un año de edad podrían ser protegidos (24).

El desarrollo de las vacunas neumocóccicas inició a principios del siglo XX, pero los intentos por inducir inmunidad contra *S. pneumoniae* en humanos con

el neumococo inactivo completo no fueron exitosos; de hecho, este tipo de inmunización dejó de realizarse debido a los efectos colaterales adversos causados por las grandes cantidades de inóculo utilizado. Alrededor de 1930, al inicio de los intentos de serotipificación en los neumococos y demostrarse la inmunogenicidad de los polisacáridos capsulares purificados, se efectuaron estudios con carbohidratos de algunos serotipos, los cuales culminaron con la autorización de la producción de una vacuna neumocócica polisacárida hexavalente. Sin embargo, debido al entusiasmo existente por la eficacia terapéutica de los antibióticos, esta vacuna no se utilizó extensamente y terminó siendo retirada del mercado (212).

Sin embargo, en cuanto al estado actual, la tasa de mortalidad relacionada con la enfermedad neumocócica invasiva ha continuado elevándose, a pesar del empleo de los antibióticos –debido al progreso de la multirresistencia-, por lo que a partir de los 70s se ha retomado la búsqueda de mejores vacunas polisacáridas anti-neumocócicas (190).

Lógicamente, la existencia de por lo menos 90 distintos serotipos de neumococos representó un obstáculo para el desarrollo de alguna vacuna que proporcionara protección adecuada (87, 102, 122, 123), pero ello se ha resuelto introduciendo una vacuna polivalente. En 1977, se autorizó el uso de un producto que protegía contra los 14 serotipos más frecuentes de neumococos, alcanzando cifras de 80% en cuanto a las cepas invasivas aisladas en Estados Unidos. En 1983, se le agregaron otros nueve serotipos

(para dar lugar a un total de 23), lo cual aumentó la protección contra más de 90% de las cepas aisladas en los países desarrollados (177).

La vacuna de polisacáridos 23-valente contra neumococo (23PS) ha estado disponible por más de 20 años para su uso en mayores de dos años de edad. A través de estudios retrospectivos se ha establecido con certeza su efectividad clínica respecto a la prevención de enfermedad neumocócica invasiva en adultos mayores (61). Además, se ha demostrado su adecuada relación costo-efectividad mediante estudios efectuados en Estados Unidos y en varios países de Europa Occidental, verificándose que la vacunación con 23PS disminuye las tasas de hospitalización por neumonía y los índices de mortalidad por cualquier causa en personas con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (107).

Por obvio, la vacuna también muestra ciertas limitaciones. En tal contexto, la su eficacia global es de sólo 50 a 81% para los serotipos específicos contenidos -en el producto- que provocan bacteremia en adultos (184); además, no es inmunogénica en niños menores de dos años de edad, el grupo con la mayor incidencia de enfermedad neumocócica invasiva, debido en parte a que genera una respuesta independiente de linfocitos T (21, 148, 206). En los ancianos ocurre rápidamente una disminución de niveles de anticuerpos contra serotipos importantes, hasta niveles previos a la vacunación, en un periodo de 3 a 7 años y el producto tampoco es inmunógeno en grupos con riesgo elevado de contraer enfermedad

neumocócica, tales como los pacientes asplénicos, los que padecen infecciones recurrentes del tracto respiratorio e individuos infectados con VIH (61, 148, 184, 206).

La necesidad de superar las limitaciones de la vacuna 23PS condujo al desarrollo de vacunas anti-neumocócicas conjugadas, las cuales generan inmunidad en lactantes y niños pequeños contra los antígenos capsulares (183).

Este mecanismo de acción permite que los antígenos débiles o no inmunógenos se activen a través del acoplamiento covalente a una proteína transportadora inmunogénica. De esta manera, el antígeno adquiere la característica de dependiente de linfocitos T, ya que dicha proteína es degradada a péptidos que se asocian a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase de II sobre la superficie celular, para ser presentados a los linfocitos T y estimular la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B. Es decir, los complejos resultantes pueden estimular a los linfocitos T cooperadores, lo que genera respuestas más intensas (85). Las cuestiones bioquímicas implicadas en la construcción de las vacunas conjugadas óptimas varían de acuerdo al serotipo, por lo que ha sido necesario desarrollar formulaciones específicas para ciertos serotipos, con el fin de maximizar la respuesta inmune y contrarrestar la exposición variable a diferentes polisacáridos neumocócicos (21, 108).

Entre los factores que pueden potenciar la inmunogenicidad de las vacunas conjugadas se cuentan los siguientes:

- La selección de una proteína transportadora que evite la supresión de la respuesta inmune mediada por el transportador
- La frecuencia de inmunización
- El uso de adyuvantes
- La edad e inmunocompetencia del hospedero (86, 108)

Debido a que no todos los serotipos son igualmente prevalentes, una vacuna conjugada sólo debe contener a los serotipos relacionados más frecuentemente con la enfermedad neumocócica (32), ya que cada uno tiene que asociarse individualmente al transportador; debido a esto, se procura limitar la dosis total de proteína transportadora, con el objeto de evitar la tolerancia hacia ella (86).

La efectividad de las vacunas conjugadas depende en parte de la proporción de enfermedades causadas por los serotipos involucrados. La determinación de los serotipos a incluirse en los productos se ha basado en estudios epidemiológicos realizados en distintas áreas geográficas, después de los cuales se lograron interesantes conclusiones: 5 a 8 serotipos constituyen alrededor del 75% de las cepas de neumococo provenientes de niños pequeños; 10 a 11 serotipos se encuentran, en la misma proporción, en niños de mayor edad y en adultos (85).

Los serotipos incluidos en la vacuna heptavalente (4, 6, 9, 14, 18, 19 y 23) causan el 70 a 88% de neumococcias en niños pequeños de los Estados Unidos, Canadá, Oceanía, África y Europa, y más de 65% en América Latina y Asia. Por su parte, los serotipos de la formulación nonavalente (los de la vacuna heptavalente más el 1 y 5) causan 80 a 90% de las neumococcias en todas las regiones exceptuando Asia (66%). El serotipo 1 se encontró en más de 6% de casos en cada región, incluyendo Europa, aunque no en Estados Unidos, Canadá y Oceanía. Sin embargo, se observaron varios serotipos no incluidos en las vacunas conjugadas heptavalente, nonavalente, y 11-valente (los de la nonavalente más el 3 y 7) causando enfermedad en niños de mayor edad y adultos. Aún así, cada una de estas vacunas conjugadas podría disminuir la morbilidad causada por neumococo (32, 85).

Los mismos estudios mostraron que ciertos serotipos se encuentran más frecuentemente en ciertos tejidos. En todos los grupos de edad, los serotipos 1 y 14 se aislaron más frecuentemente de la sangre, mientras que el 6, 10 y 23 provinieron predominantemente del líquido cefalorraquídeo. En los niños pequeños, los serotipos 3, 19, y 23 se aislaron más frecuentemente del líquido del oído medio. Los serotipos representados en las vacunas conjugadas se aislaron menos frecuentemente del líquido cefalorraquídeo que de la sangre o del líquido del oído medio. Sin embargo, los serotipos en la vacuna conjugada nonavalente representaron casi 75% de cepas aisladas del líquido cefalorraquídeo en infantes (32, 85, 86).

Estos hallazgos indican que las vacunas conjugadas neumocócicas podrían prevenir una buena proporción de episodios de enfermedad bacterémica, neumonía, meningitis y otitis media, especialmente en los niños pequeños (85).

Se han efectuado diversos estudios para probar la seguridad e inmunogenicidad de las vacunas conjugadas contra el neumococo. En uno de ellos se evaluó la vacuna heptavalente conjugada con el complejo proteico de la membrana externa de *N. meningitidis* (Pnc-OMP). Esta vacuna fue bien tolerada por los niños y fue altamente inmunogénica ya que los anticuerpos aumentaron significativamente después de 2 ó 3 inyecciones y además generó memoria inmunológica frente a 23PS (4).

En otro estudio se reportó la seguridad e inmunogenicidad de dos vacunas tetravalentes conteniendo los serotipos 6B, 14, 19F y 23F, conjugados con toxoide tetánico (Pnc-T) o toxoide diftérico (Pnc-D). Ambas fueron bien toleradas e indujeron anticuerpos anticapsulares específicos para serotipo y memoria inmunológica (48).

En un estudio efectuado por Black y Shinefield, además de determinar la eficacia, seguridad e inmunogenicidad de la vacuna PNCRM7, se estudió su efectividad para prevenir enfermedad invasiva causada por los serotipos

contenidos en la vacuna. Hasta agosto de 1998 no se habían presentado casos de infección neumocócica causadas por los serotipos de neumococos incluídos en la vacuna en los pacientes que la recibieron mientras que en el grupo control se presentaron 17 casos de la enfermedad. No hubo evidencia de aumento en la enfermedad causada por serotipos no incluídos en la vacuna. Todo ello demostró que la PNCRM7 es segura y altamente efectiva en la prevención de enfermedad neumocócica invasiva causada por los siete serotipos incluídos en ella y los de reacción cruzada, además de que reduce los episodios de otitis media (20).

En febrero de 2000 se autorizó el uso de la vacuna en Estados Unidos para la prevención de la enfermedad neumocócica invasiva causada por *S. pneumoniae* en lactantes y niños pequeños. La Academia Norteamericana de Pediatría y el Comité Asesor sobre Inmunizaciones de los Centros para el Control de Enfermedades (ACIP-CDC) han publicado sus recomendaciones para la prevención de las infecciones neumocócicas, entre las que están el uso de vacunas polisacáridas y conjugadas contra el neumococo y la profilaxis con antibióticos (36, 158). El uso de la vacuna PNCRM7 se recomienda en los niños de 23 meses de edad y menores y debe administrarse junto con otras vacunas recomendadas a los 2, 4, 6 y 12 a 15 meses de edad. En la tabla 7 se muestra el esquema de vacunación recomendado para PNCRM7 en niños previamente no vacunados, en la tabla 8 el recomendado para los grupos de alto riesgo y en la tabla 9 para la población de edad avanzada y con otros factores de riesgo (36, 158).

Tabla 7. Esquema de vacunación recomendado para la PNCRM7 en niños previamente no vacunados (serie primaria y actualización de inmunizaciones)

| Edad a la primera dosis | Serie primaria | Dosis de refuerzo* |
|--------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 2-6 meses | 3 dosis cada 6-8 semanas | 1 dosis a los 12-15 meses de edad |
| 7-11 meses | 2 dosis cada 6-8 semanas | 1 dosis a los 12-15 meses de edad |
| 12-23 meses | 2 dosis cada 6-8 semanas | ----- |
| ≥ 24 meses | 1 dosis | ----- |

* Dosis a administrarse al menos 6-8 semanas después de la dosis final de la serie primaria

Tabla 8. Esquema de vacunación para la PNCRM7 o 23PS en niños con alto riesgo de enfermedad neumocócica invasora*

| Edad | Dosis anterior | Posología |
|-------------|---------------------|--|
| ≤ 23 meses | Ninguna | Ver Tabla 7 |
| 24-59 meses | 1-3 dosis de PNCRM7 | 1 dosis de PNCRM7 1 dosis de 23PS, 6-8 semanas después de la última dosis de PNCRM7 1 dosis de 23PS, 3-5 años después de la primera dosis de 23PS |
| 24-59 meses | 1 dosis de 23PS | 2 dosis de PNCRM7, una cada 6-8 semanas, comenzando al menos 6-8 semanas después de la última dosis de 23PS. 1 dosis de 23PS, 3-5 años después de la primera dosis de 23PS |
| 24-59 meses | Ninguna | 2 dosis de PNCRM7, separadas 6-8 semanas 1 dosis de 23PS, 6-8 semanas después de la última dosis de PNCRM7 1 dosis de 23PS, 3-5 años después de la primera dosis de 23PS |

* Niños con anemia de células falciformes, asplenia, infección por VIH y otros factores de riesgo.

Tabla 9. Indicaciones para la administración de la vacuna 23PS

| Grupos para los cuales se indica la inmunización | Subgrupo | Revacunación |
|--|--|--|
| Personas Inmunocompetentes | | |
| Edad 65 años o más | Todas las personas de 65 años o más | Segunda dosis si el paciente recibió la vacuna previamente hace 5 años o más y era menor de 65 años en el momento de la inmunización. |
| Personas de 2 a 64 años | Enfermedad cardiovascular crónica como falla cardíaca congestive o cardiomiopatía | No recomendada |
| | Enfermedad pulmonary crónica como enfermedad pulmonary obstructive crónica o enfisema | No recomendada |
| | Alcoholismo, enfermedad hepática crónica, pérdida de líquido cefalorraquídeo, implante coclear | No recomendada |
| | Asplenia funcional o anatómica | Si el paciente es mayor de 10 años, un solo refuerzo después de 5 años de la dosis inicial. Si el paciente tiene 10 años o menos, revacunar 3 años después de la dosis previa. |
| Personas inmunocomprometidas | | |
| Personas de 2 ó más años de edad | Infección con VIH, leucemia, linfoma, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, cáncer, falla renal crónica, síndrome nefrótico y personas recibiendo terapia inmunosupresora (incluida quimioterapia y corticoesteroides), trasplante de órganos o de médula ósea. | Refuerzo único a los 5 años o más de la primera dosis. Si el paciente tiene 10 años o menos, revacunar 3 años después de la dosis previa. |

En los niños con alto riesgo de infección se ha recomendado el uso de la vacuna 23 PS para extender así la cobertura de serotipos. Los niños con alto riesgo deben ser vacunados lo más temprano posible y se sigue recomendando el uso de antibióticos como medida profiláctica en niños menores de 5 años con asplenia funcional o anatómica, incluyendo a aquellos con anemia de células falciformes (36, 158). Los niños que nunca han sufrido de enfermedad neumocócica invasiva y que han sido inmunizados como se recomienda, pueden suspender la profilaxis después de los cinco años de edad. En la actualidad se estudia la seguridad y eficacia de estas vacunas en niños mayores de 24 meses de edad que están en riesgo bajo o moderado de infección neumocócica invasiva. En la actualidad la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) recomienda la administración de PNCRM7 en niños menores de 24 meses pero en todos los niños de 24 a 59 meses de edad la administración de la vacuna neumocócica puede ser benéfica, independientemente del riesgo de infección y por ello los niños de 24 meses de edad o mayores pueden recibir una dosis única de la vacuna PNCRM7 o 23PS. Aunque ésta última es buena, debe favorecerse el uso de la PNCRM7 pues produce una mejor respuesta inmune y una reducción de la colonización nasofaríngea (36, 85, 158)

La vacuna se administra por vía intramuscular o subcutánea en una dosis de 0.5 mL. Puede administrarse al mismo tiempo que la vacuna contra la influenza pero por medio de inyección separada en el brazo contrario al utilizado para la vacuna anti-influenza. La única contraindicación para su uso

en los pacientes que lo requieren es la historia de reacción anafiláctica a una dosis previa de la vacuna o la alergia a alguno de los componentes de la vacuna. Aproximadamente un 50% de los pacientes que la reciben desarrollan algún efecto secundario local moderado como dolor en el sitio de aplicación, eritema e inflamación que cede dentro de las 48 horas siguientes a la aplicación (36). Las reacciones sistémicas moderadas como fiebre y mialgias o más severas son extrañas. La vacuna no ha sido evaluada para su uso durante el primer trimestre del embarazo (34).

Por lo que respecta al impacto económico y de la salud, en Estados Unidos se han llevado a cabo diversos estudios de costo-efectividad de las vacunas conjugadas neumocócicas y se ha observado que la vacunación de niños sanos, prevendría por año más de 12,000 casos de meningitis y bacteremia, 53,000 de neumonía, un millón de otitis media y 116 muertes por infección neumocócica. Aún antes de tomar en cuenta el costo de la vacuna, se evitarían infecciones neumocócicas con un ahorro de \$342 millones de dólares anuales en costos médicos y \$415 millones en pérdidas laborales y otros costos también por año (115). Aunque hacen falta más estudios, la vacunación puede ser costo-efectiva. Los costos financieros de la atención médica y las pérdidas laborales causadas por los síntomas asociados con la vacuna son significativos y deben incluirse en el análisis económico. Además deben estimarse los costos de la vacuna en cuanto al valor no tangible de la prevención de la morbilidad y mortalidad por las enfermedades neumocócicas (114).

En los países desarrollados, las vacunas conjugadas han disminuído la incidencia de enfermedad invasora causada por *H. influenzae* tipo b y son potencialmente efectivas contra las infecciones causadas por *S. pneumoniae*, pero la especificidad serotípica de las vacunas conjugadas contra neumococo ha generado preocupación sobre la posibilidad de que su uso aumente la colonización y frecuencia de las infecciones por serotipos no incluídos en las vacunas (164).

Esto no ha ocurrido en las vacunas conjugadas contra Hib pero se ha reportado en ensayos clínicos de vacunas contra neumococos. Por ejemplo se ha observado que el uso de la vacuna neumocócica nonavalente disminuyó la colonización nasofaríngea de los serotipos 19F y 6B pero a pesar de que los serotipos 6A y B difieren únicamente en un solo azúcar de la molécula de carbohidratos, la vacuna no disminuyó la colonización del serotipo 6A y de hecho el 15% de la colonización nasofaríngea de cepas resistentes a antibióticos se debió a la portación de serotipo 6A y es por ello que pudiera ser importante incluir este serotipo en futuras generaciones de vacunas (48, 150).

También se encuentra bajo discusión el hecho de que el uso de las vacunas conjugadas neumocócicas pueda producir la recolonización por serotipos no incluídos en las vacunas y alterar la distribución serotípica o el surgimiento de nuevas cepas que puedan producir enfermedad invasiva. En algunos estudios

se ha observado que existe cierto grado de reemplazo de la colonización nasofaríngea pero no se ha demostrado la relación entre este reemplazo y el desarrollo de enfermedad clínica (47, 48).

Después de extensos estudios, se ha demostrado que la vacuna PNCRM7 es altamente efectiva en niños menores de 2 años de edad y no han ocurrido problemas de seguridad en relación con la vacunación. En los ensayos clínicos se ha observado una efectividad de 95% para PNCRM7 en la prevención de las enfermedades neumocócicas invasivas debidas a los serotipos incluidos en las vacunas (20). Esta efectividad en la prevención de la enfermedad invasiva, puede reducir el uso empírico de antibióticos en los niños con fiebre de origen desconocido y con alta cobertura de vacunación (186).

Buscando el superar la limitación de la especificidad serotípica de las vacunas neumocócicas, se han llevado a cabo diversos estudios de identificación de antígenos proteicos neumocócicos comunes a todos los serotipos para su uso potencial como vacunas de tercera generación. Estas proteínas son antígenos dependientes de células T y por tanto serían altamente inmunogénicos en infantes y capaces de generar memoria inmunológica. Las proteínas neumocócicas por sí solas, combinadas entre sí o como transportadoras de polisacáridos en las vacunas conjugadas pudieran ser componentes útiles en las vacunas (8, 25). Entre las proteínas que pudieran utilizarse con este fin se encuentran la Proteína de superficie PspA, PspC, la

autolisina, la neumolisina y la PsaA. La inclusión de algunas de estas proteínas en las vacunas conjugadas puede aumentar su eficacia contra la otitis media y puede contribuir a la formulación exitosa que incluya a todas las proteínas, pero hacen falta más estudios al respecto (8, 25).

La PspA es producida por todos los pneumococcos y como ya se indicó antes, es un factor de virulencia importante y se sabe que interfiere con la activación de C3. Esta proteína tiene una elevada reactividad cruzada cuando se examina frente a suero policlonal. La inmunización intranasal con PspA ha demostrado conferir protección contra el estado de portador nasofaríngeo en un modelo en ratones y con ello se abre la posibilidad para desarrollar vacunas que prevengan la portación y transmisión del pneumococo (219).

El suero de virtualmente todos los adultos y la mayoría de los niños mayores de 7 meses de edad contiene niveles detectables de anticuerpo contra PspA. Estos niveles son mayores en los adultos que en niños y por tanto es posible que los anticuerpos naturales contra PspA puedan contribuir más a la inmunidad contra la infección neumocócica en los adultos que en niños. Se espera que la inmunización para generar niveles altos de anticuerpos contra PspA pueda proteger a los niños pequeños así como a los adultos contra las infecciones neumocócicas (25, 209).

La PspC es una proteína muy similar a PspA en su dominio estructural general y sus dominios ricos en prolina y los enlazantes de colina. Los

anticuerpos dirigidos contra esta proteína confieren protección contra la infección neumocócica, aparentemente mediante una reactividad cruzada con PspA (8, 25).

La neumolisina juega un papel muy importante en la patogénesis de la enfermedad neumocócica y por tanto es una proteína que puede usarse en vacunación. Se ha sabido por mucho tiempo que la inmunización con neumolisina purificada protege a los ratones inoculados con neumococos (17, 119). Los problemas de toxicidad se han eliminado por medio de mutagénesis en las regiones de la toxina esenciales para la citotoxicidad y la activación del complemento. También se han insertado los genes que codifican para estos toxoides neumolisínicos recombinantes (neumolisoides) en *E. coli* para permitir la producción a gran escala de antígenos a un bajo costo (161). Se han secuenciado los genes de neumolisina para muchos diferentes serotipos de neumococo y se ha confirmado que existe una variación mínima en la secuencia aminoácido primaria y por ello una vacuna de un solo antígeno proveería cobertura contra todos los neumococos independientemente de su serotipo aunque los anticuerpos neutralizadores de la toxina producidos tras la inmunización con pneumolisoides no tendrán actividad opsonofagocítica y por ello sería recomendable incorporar antígenos de superficie como PS o PspA (2).

Por lo que respecta a la Adhesina A de superficie pneumocócica (PsaA), es una lipoproteína producida por todos los neumococos que en un inicio se

pensó que era una adhesina. Los neumococos que no la poseen son virtualmente no virulentos para los ratones y tienen una capacidad reducida para adherirse *in Vitro* a pneumocitos humanos tipo II (16). El gen para esta proteína es parte de un complejo que codifica los componentes de un sistema de transporte de manganeso que *S. pneumoniae* requiere para su crecimiento (52). Las dimensiones de esta proteína son tales que cualquier proteína anclada a la membrana celular vía lípidos no queda expuesta en la superficie externa del neumococo y por tanto PsaA no es una adhesina per se y por tanto la no virulencia en los neumococos que no la poseen se explicaría por el requerimiento de Mn²⁺ como cofactor o regulador de la expresión de otros factores de virulencia o por incapacidad de crecimiento al no poder obtener este metal *in vivo*. Al ser tan profundos los efectos de la mutagénesis de la PsaA en la virulencia del neumococo, puede ser una buena proteína de vacunación (16, 52).

También la autolisina LytA ha demostrado tener potencial como vacuna pues genera un nivel de protección similar al alcanzado con neumolisina (160). En resumen, de todas las proteínas neumocócicas propuestas como candidatas para vacunas hasta la fecha, la neumolisina, la PspA y la PsaA han demostrado que contribuyen a la virulencia del neumococo y que son producidas prácticamente por todas las cepas del microorganismo (52). Además para la neumolisina y la PsaA no existe variación antigénica entre un aislado y otro. El papel de PspC como mediador de la colonización nasofaríngea justifica el que se le analice como candidata para vacunación. Si

todas estas proteínas funcionan en diferentes etapas durante el proceso patogénico, la inmunización con una combinación de estos antígenos proveerá protección aditiva y además, debido a las diferencias en las capacidades protectoras de los antígenos individuales contra las distintas cepas de *S. pneumoniae*, una vacuna de proteínas neumocócicas combinadas podría conferir una mayor protección contra un rango más amplio de cepas que un antígeno individual (27).

IV. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

La descripción clásica de las características clínicas de la neumonía neumocócica hace referencia a la aparición repentina de escalofríos y dolor pectoral seguidos por fiebre y tos productiva con expectoración amarillenta. En general, los síntomas respiratorios pueden no presentarse, especialmente en pacientes con enfermedad bacterémica; de hecho, la ausencia de fiebre es bastante común con una prognosis pobre (125, 201) y un 15 a 20% de los pacientes presentan síntomas gastrointestinales como náuseas, vómito o diarrea, signos que pueden predominar las características clínicas. Al margen de ello, el diagnóstico médico en pacientes ancianos es aún más complicado, ya que incide una mayor cantidad de síntomas inespecíficos (138).

Entre los datos de laboratorio que sugieren neumonía neumocócica, destaca la leucocitosis polimfonuclear, aunque los pacientes pueden tener cuentas normales de leucocitos; la leucopenia ocurre en un 5 a 10% de los pacientes para quienes la prognosis es pobre (201). Además, una cuenta normal de leucocitos parece asociarse a tasas mayores de mortalidad que las alcanzadas al haber leucocitosis. Los niveles de proteína C reactiva se encuentran elevados y mucho más altos que los que caracterizan a pacientes

con neumonías atípicas. También suelen encontrarse recuentos elevados de bilirrubina durante el curso de la infección neumocócica, debido posiblemente a factores tales como hipoxia, hemólisis e inflamación hepática (201).

En las radiografías de individuos con bacteremia neumocócica es frecuente observar infiltrados pulmonares alveolares que involucran a uno o más segmentos de todo un lóbulo. La efusión pleural es común pero el empiema no; aunque las efusiones pleurales y el involucramiento multilobular son comunes, especialmente en la enfermedad bacterémica, el patrón radiográfico no es exclusivo de la enfermedad, por lo que no debe utilizarse como método para diferenciar entre la neumonía neumocócica y la causada por otros patógenos (201).

En el laboratorio, las primeras técnicas mediante las cuales se diagnosticaban las infecciones neumocócicas fueron los cultivos, las pruebas en animales y la observación de frotis teñidos al Gram. Las preparaciones, efectuadas a partir de muestras de esputo, representan una herramienta rápida y barata que se utiliza para determinar la causa bacteriana de la neumonía (75), aunque desde luego esto es controversial: muchos químicos consideran que bien ejecutadas e interpretadas, acompañadas por cultivos bien realizados resultan muy confiables (75, 201).

Un estudio reciente mostró que el examen microscópico y la siembra de muestras de esputo obtenidas antes de la administración de antibióticos

proporcionan un diagnóstico correcto en más del 80% de los pacientes con neumonía neumocócica (147). De hecho, la prueba estándar para el diagnóstico de las infecciones pneumocócicas continúa siendo el cultivo bacteriano, aunque es conveniente considerar que si el paciente ha recibido tratamiento antibiótico antes de la recolección del espécimen, la viabilidad del microorganismo se reduce y ello puede conducir a falsos negativos. En estos casos, es recomendable recurrir a métodos inmunológicos en los que ocurre la búsqueda de antígenos neumocócicos en los fluidos biológicos. Evidentemente, cuando el cultivo y la detección antigénica fallan, pueden aplicarse ensayos con anticuerpos y la medición de complejos inmunes circulantes (ICs) (181), ya que si bien ya existen diversos métodos de amplificación del ácido nucleico neumocócico, aquellos aún no han sido estandarizados y los reactivos no están disponibles a nivel comercial.

El diagnóstico definitivo se puede basar en la recuperación del microorganismo a partir de muestras estériles en condiciones de salud, tales como sangre, fluido pleural o líquido cefalorraquídeo, e inclusive, de muestras obtenidas mediante métodos invasivos como los aspirados transtraqueales, broncoscópicos o transtorácicos (157, 181). El cultivo hemático sigue siendo un método más confiable y específico de diagnóstico para neumonía neumocócica, pero su sensibilidad es baja (de aproximadamente 15%) (157). En los adultos, el cultivo de sangre es positivo en sólo 10 a 45% de las neumonías neumocócicas y, en niños, la proporción es aún menor (de tan solo un 10%) (99).

El análisis microbiológico de muestras de esputo es un método no invasivo que también debe realizarse antes de la administración de la antibiótico-terapia, pero normalmente sólo se realiza en pacientes adultos, ya que los niños no producen esputo. Otra desventaja de esta técnica es que las muestras se contaminan fácilmente con bacterias presentes en el tracto respiratorio superior, por lo que es necesario efectuar extensiones al Gram para determinar el grado de purulencia y contaminación, fundamentándose en la proporción de leucocitos y células epiteliales: las muestras que contienen más de 5 leucocitos por célula epitelial se consideran purulentas y pueden utilizarse para establecer la etiología de la infección (180).

En ocasiones el cultivo de fluido pleural puede aportar un diagnóstico definitivo, pero en general los métodos invasivos sólo se destinan a pacientes severamente enfermos y a aquellos que no responden a la quimioterapia antibiótica empírica. La aspiración de pulmón percutánea es casi 100% específica y muy sensible y la aspiración transtraqueal también produce resultados confiables pero ambas técnicas presentan el riesgo de complicaciones tales como sangrado y neumotórax (210).

El cultivo también es el método diagnóstico más usado en infecciones neumocócicas no invasivas tales como la otitis media, pero se ha observado que su índice de falsos negativos es elevado. El cultivo de las muestras nasofaríngeas es complicado, por la presencia de portadores asintomáticos;

en este sentido, se ha propuesto la cuantificación de bacterias nasofaríngeas como un método de diagnóstico (191).

Lógicamente, los neumococos se cultivan en agar sangre y crecen típicamente formando colonias translúcidas, redondas, planas y de superficies suaves, con depresiones en el centro, las cuales son rodeadas por halos de hemólisis parcial. Los polisacáridos capsulares contribuyen a la apariencia mucoide de las colonias y el microorganismo se diferencia de otras especies estreptocócicas alfa hemolíticas con base en su sensibilidad a optoquina, la solubilidad en bilis y la reacción capsular con suero anti-neumocócico. La prueba de la optoquina es el criterio de identificación más importante y, por lo tanto, es el comúnmente utilizado por los laboratorios clínicos. Sin embargo, se han aislado neumococos atípicos resistentes a dicha quininao, lo que ha dificultado la identificación definitiva, razón por la cual se han incorporado pruebas moleculares; actualmente se utiliza una sonda específica de ácido nucleico (*AccuProbe*) para confirmar la presencia de los neumococos atípicos en los laboratorios clínicos. Ciertamente, la confirmación también puede lograrse demostrando la presencia de cápsula neumocócica y el método más confiable para ello consiste en la reacción de quellung, también conocida como la prueba de hinchamiento, que se basa en que prácticamente todos los neumococos capsulados se pueden detectar con un suero polivalente. El serotipo capsular en específico se establece de la misma forma, usando sueros monovalentes, aunque se requiere de personal especializado. Otros métodos para realizar la serotipificación incluyen a la

contrainmunolectroforesis (CIEP), la coaglutinación (COA), la aglutinación en látex (LA) y la reacción en cadena de polimerasa (PCR) (181).

Detección antigénica

Las técnicas de detección antigénica se han desarrollado como alternativa al cultivo del neumococo y los antígenos que más buscan son los polisacáridos capsulares neumocócicos presentes en las muestras de esputo, orina, fluido pleural, suero, líquido cefalorraquídeo y fluido de oído medio; las pruebas implicadas son la CIEP, COA, LA, inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA) e inmunocromatografía de membrana (ICT). La detección de antígenos neumocócicos en el esputo constituye un indicador muy útil de infección neumocócica: muestra una sensibilidad de hasta 94% en pacientes con CAP, aún después de iniciada la terapia antibiótica (181).

En este contexto, cuando ya se ha administrado el antibiótico, la contrainmunolectroforesis representa el método más efectivo, pero se ve limitado por la existencia de portadores sanos de neumococos. La detección de antígenos en la orina es aceptable y es un método rápido (15 min) que se realiza por medio de la inmunocromatografía de membrana a partir de muestras de orina; según estudios realizados, su especificidad fue de 97.2%, la detección del antígeno neumocócico ocurrió en 80% de los pacientes con neumonía neumocócica, con una sensibilidad similar tanto en los casos bacterémicos (82%) como en los no bacterémicos (78%) (55). La detección

antigénica en líquido cefalorraquídeo y en orina de los pacientes con sospecha de meningitis bacteriana también ha resultado sensible y específica, además de ser más rápida que los métodos convencionales de diagnóstico. El estado de portador sano y las infecciones en algún otro órgano -además de los pulmones- pueden generar resultados positivos en orina (181).

Serología

Los ensayos de anticuerpos se utilizan generalmente para demostrar infecciones causadas por virus y bacterias atípicas, pero no se utilizan rutinariamente para establecer la presencia de una respuesta inmune (anticuerpos) frente al neumococo, ya que la respuesta anti-polisacáridos capsulares neumocócicos es detectable a partir del séptimo día de la infección pneumocócica en niños. En virtud de que los títulos séricos no son de relevancia en lo que se refiere a la elección de la terapia antimicrobiana, el estudio no se considera relevante en cuanto al diagnóstico y el tratamiento; sin embargo, los estudios epidemiológicos recolectan información muy valiosa a través de ellos, mismos que ponen en evidencia anticuerpos contra antígenos tales como los distintos polisacáridos capsulares, polisacáridos C, la neumolisina y la proteína A superficial (208).

Un método aún más específico que la detección exclusiva de anticuerpos reside en la observación de complejos inmunes específicos para neumococo; éstos sólo se forman cuando antígeno y anticuerpo están presentes en la

circulación a concentraciones óptimas y no reditúan reacciones positivas en portadores sanos. El método es sensible y específico, aunque técnicamente difícil, por lo que no es de uso rutinario (113).

PCR

La reacción en cadena de polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés: *polymerase chain reaction*) es una técnica de biología molecular desarrollada en 1985 por Kary B. Mullis (141) con el objetivo de replicar el ADN enzimáticamente sin la necesidad de usar un organismo vivo como en el pasado se utilizaba a *Escherichia coli* o levaduras. En esta técnica, al igual que en la amplificación utilizando organismos vivos, se logra amplificar exponencialmente una pequeña cantidad de la molécula de ADN pero al tratarse de una técnica *in vitro*, puede ser llevada a cabo sin restricciones en la forma del ADN y puede modificarse para permitir realizar diversas manipulaciones genéticas (141).

Esta técnica se utiliza comúnmente en la investigación médica y genética ya sea para detectar enfermedades hereditarias, identificar los marcadores genéticos individuales, el diagnóstico de enfermedades infecciosas, la clonación de genes, pruebas de determinación de paternidad, etc (173).

La PCR se utiliza para amplificar una pequeña pero bien definida parte de una hebra de ADN. Esta parte puede ser un gen o sólo una parte de éste. A

diferencia de lo que sucede en organismos vivos, el proceso únicamente puede copiar fragmentos cortos de ADN, normalmente de 10 kb aunque existen métodos que pueden copiar fragmentos de hasta 47 kb de tamaño que sigue siendo mínimo en comparación con el ADN cromosómico de una célula humana que contiene aproximadamente tres billones de pares de bases (76, 173).

La PCR requiere de varios componentes básicos que son, la porción de ADN que contiene la región del ADN que se quiere amplificar, dos iniciadores o primers que son secuencias cortas de unos veinte nucleótidos y que se usan para determinar el inicio y el fin de la región a amplificar, una polimerasa de ADN que copia la región a ser amplificada en dirección 5' -► 3', desoxinucleotidos trifosfatados a partir de los cuales la ADN polimerasa construirá el nuevo ADN y un medio amortiguador o buffer que proporciona un medio químicamente favorable para el funcionamiento de la ADN polimerasa. El proceso de PCR se lleva a cabo en un aparato llamado termociclador que efectúa el calentamiento y enfriamiento de los tubos en los cuales se lleva a cabo la reacción a las temperaturas precisas requeridas en cada paso de la misma (76, 141).

Los fragmentos de ADN que se quieren amplificar se determinan seleccionando los iniciadores. Estos son hebras cortas y artificiales de ADN que son complementarias al inicio o final del fragmento de ADN que se amplificara y se adhieren al ADN molde en estos puntos en donde la ADN

polimerasa se une e inicia la síntesis de una nueva hebra de ADN. La longitud óptima de un primer es de 15 a 40 nucleótidos con una temperatura de fusión entre 55°C y 65°C (141, 173).

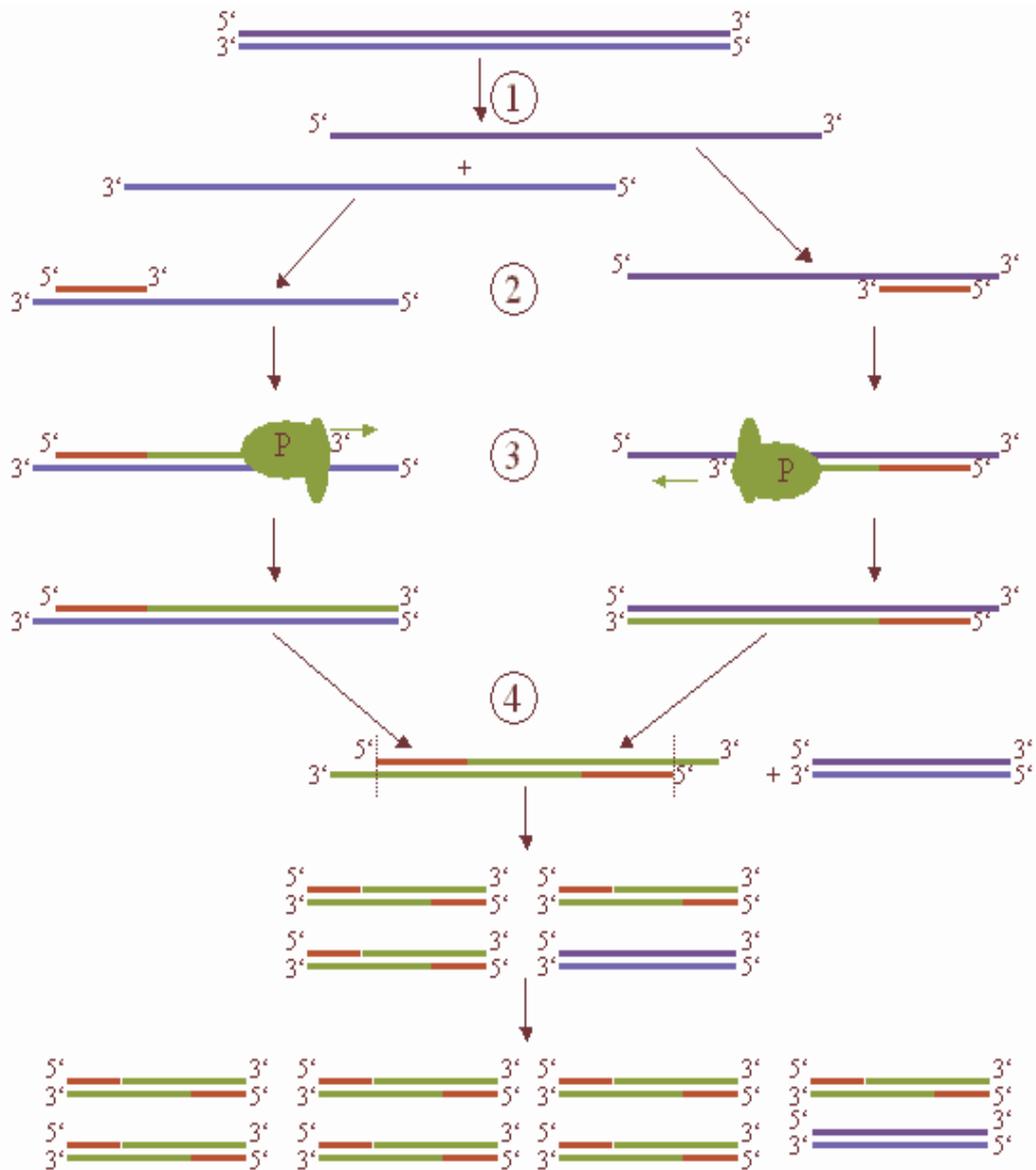
El procedimiento normalmente se efectúa en series de 20 a 35 ciclos y cada ciclo conlleva 3 pasos: El ADN de doble hélice debe incubarse a una temperatura de 94-96°C para separar las dos hebras. Este paso se llama desnaturalización y lo que ocurre es que se rompen los enlaces de hidrógeno que conectan ambas hebras del ADN. Previo al primer ciclo, la desnaturalización se efectúa por un período de tiempo más largo de lo normal para asegurar que tanto el ADN molde como los primers se separen por completo (173).

Después de separar el ADN se disminuye la temperatura para la hibridación es decir, los primers se unen al molde de ADN por medio de enlaces hidrógeno a las terminaciones 3' complementarias que flanquean el fragmento a amplificar y así forman un polinucleótido de doble hebra. La temperatura en este paso depende de los primers y es aproximadamente 5°C menor a la temperatura de fusión de los mismos (45-60°C). Si la temperatura usada no es la correcta se corre el riesgo de que los primers no se unan al ADN molde o se unan en sitios incorrectos (173).

Finalmente la ADN polimerasa debe copiar el ADN. Esta copia se inicia en el primer y avanza por toda la hebra de ADN y se produce la síntesis de una

cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5' -> 3' en donde la polimerasa incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde. Este paso se llama elongación y la temperatura a la cual se lleva a cabo depende de la polimerasa utilizada (141, 173).

A continuación se resumen los pasos de la técnica de PCR



(1) Desnaturalización a 94 - 96°C

(2) Hibridación a 68°C

(3) Elongación a 72°C (P=Polimerasa)

(4) El primer ciclo está completo. Las dos hebras de DNA resultantes son el molde para el siguiente ciclo y por tanto la cantidad de DNA que se duplica en cada ciclo es el doble del anterior

El desarrollo del método de PCR (*polymerase chain reaction*) o reacción en cadena de polimerasa, ha hecho posible el detectar cantidades aún mínimas de ADN por medio de la amplificación (10^6) de una secuencia definida (141).

Este método es capaz de detectar pequeñas cantidades de patógenos presentes en muestras clínicas y de mejorar el diagnóstico de enfermedades infecciosas. La PCR no depende de la presencia de organismos viables o cultivables y por tanto puede utilizarse en aquellos casos en la que se ha iniciado la terapia antibiótica. Hasta la fecha se han desarrollado numerosos ensayos basados en esta técnica para detectar *S. pneumoniae* en muestras clínicas pero estos métodos sólo se utilizan en la investigación y no en el diagnóstico rutinario del neumococo (56, 120, 181).

Los métodos PCR que se utilizan para la detección de ADN pneumocócico se basan en la amplificación de los fragmentos normalmente bien conservados de los genes de neumolisina o de autolisina aunque también se han desarrollado métodos que amplifican el gen codificador para la proteína 2B de enlace a penicilina, el gen codificador de PsaA (adhesina A de superficie pneumocócica) y los genes para ARN ribosomal. La ventaja de los ensayos PCR bacterianos combinados con la secuenciación de ADN es que permiten la detección de otros patógenos además del neumococo. Existen métodos de PCR destinados a detectar ADN pneumocócico a partir de muchas diferentes muestras clínicas como: sangre entera (120), diferentes fracciones sanguíneas (56), orina (55, 142), líquido cefalorraquídeo (38), fluido

pleural (60), esputo (74, 214), aspirados pulmonares (211), fluído de oído medio (181), secreciones nasofaríngeas etc (82).

En uno de los primeros estudios se observó que al utilizar muestras de pacientes con neumonía pneumocócica ya confirmada por medio de un cultivo, la sensibilidad del método PCR fue de un 75% para el primer de neumolisina y un 63% para el primer de autolisina. Cuando se utilizó sangre entera, la sensibilidad fue menor a un 40% para ambos primers aunque en otros estudios más recientes con un mayor número de muestras se han encontrado sensibilidades de 55% además de una especificidad superior a 95%. Al utilizar muestras de suero, todas las muestras provenientes de pacientes con neumonía confirmada por medio de cultivo directo fueron positivas para PCR en el que se amplificó un fragmento del gen codificador de neumolisina, sin embargo en el estudio de Murdoch, se demostró que la prueba de PCR para el gen codificador de neumolisina, no mejoró el diagnóstico de CAP causada por *S. pneumoniae* (143).

El uso de sangre entera o fracciones de sangre constituye un problema en el método de PCR, ya que la sangre contiene inhibidores de PCR que son muy difíciles de eliminar (56). Además la baja densidad del ADN microbiano comparado con la densidad del ADN humano puede causar falsos negativos en la prueba. Al utilizar muestras de fluído de oído medio de niños con otitis media, el 91% de las muestras que dieron un cultivo positivo resultaron positivas en PCR también pero el uso de PCR incrementó la cantidad de

muestras positivas de un 18% (únicamente cultivo) a un 30% (cultivo y PCR) (181).

Se observó también que el ADN encontrado en muestras de oído medio que fueron negativas en cultivo, proviene de bacterias viables pero también se ha visto que hay microorganismos como *S. mitis* que pueden contener genes codificadores para factores de virulencia de *S. pneumoniae* y por tanto pueden causar falsos positivos en PCR (181). En general se ha observado que la PCR efectuada a partir de muestras de sangre es un método útil para el diagnóstico de neumonía pneumocócica aún en pacientes no bacterémicos, con una buena sensibilidad y especificidad pero aún hace falta refinar el método para eliminar imperfecciones (56, 120).

La técnica de PCR también se ha utilizado para detectar neumococos resistentes a penicilina basándose en la amplificación de los genes pneumocócicos codificadores para proteínas enlazantes de penicilina. También existen métodos de PCR para la serotipificación de los neumococos y estos usan primers específicos para los diferentes serotipos (104).

PCR en tiempo real o cuantitativa

Esta es una modificación a la PCR tradicional y se describió por primera vez a finales de los años 90s. En esta técnica, la amplificación y la detección de los productos de la amplificación ocurre simultáneamente mediante la

incorporación de un lector de fluorescencia al termociclador en donde se efectúa la PCR y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales en los que se realice la amplificación y con ello se conoce y registra en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (218).

El ADN amplificado puede detectarse utilizando colorantes que se enlacen a ADN, agentes intercalantes o sondas de hibridación de secuencia específica marcadas con fluorocromos que se diseñan de manera especial. Los colorantes detectan todos los ADN de doble hélice, incluyendo los productos no deseados pero utilizando colorantes específicos y midiendo la fluorescencia continuamente durante un ciclo de temperatura, la desnaturalización de los productos puede ser observada y se pueden obtener curvas de fusión de ADN que pueden usarse para distinguir productos de amplificación separados por menos de 2°C de diferencia de temperatura de fusión (176).

Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen al ADN de doble hélice. El más empleado en la PCR cuantitativa es el SYBR Green I. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. La ventaja de este sistema es que las condiciones de la reacción son fáciles y es más económico que las sondas específicas pero su principal inconveniente es su baja especificidad pues se une a productos inespecíficos

y a dímeros del primer que son sumamente frecuentes en esta técnica. Para mejorar la especificidad se deben emplear condiciones de reacción óptimas y muy controladas y una selección cuidadosa de los primers para reducir el riesgo de la formación de dímeros. También se recomienda iniciar la reacción a temperaturas elevadas para disminuir el riesgo de amplificaciones inespecíficas y para ello se deben usar polimerasas recombinantes modificadas que funcionan sólo mediante la activación a temperaturas elevadas o que tienen bloqueado su centro activo con anticuerpos que se desnaturalizan frente a alta temperatura y así liberan a la polimerasa permitiendo su actividad (43, 218).

La mayoría de los equipos para PCR a tiempo real tienen la posibilidad de determinar la temperatura de fusión de los fragmentos amplificados (T_m =temperatura a la que el 50% del ADN de la molécula está desnaturalizado). Cada fragmento amplificado tiene una T_m característica, que depende sobre todo de su longitud y de la composición de sus bases. Esta aplicación permite comprobar, aunque no siempre con absoluta garantía, la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR (43).

Las sondas de hibridación específicas son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan, las sondas llamadas molecular beacons y las sondas FRET (43).

Las sondas de hidrólisis son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar próximas. Además, el espectro de emisión de la primera debe estar en el mismo rango del espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de ADN molde, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como ahora el donador y el aceptor se encuentran alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector de fluorescencia (43, 89).

Los llamados molecular beacons son sondas parecidas a las anteriores. Tienen una molécula donadora en el extremo 5' y una aceptora en el extremo 3' pero, además, presentan una estructura secundaria en forma de asa, en la que reside la secuencia de unión específica con el ADN diana. Los extremos permanecen plegados cuando la sonda no está hibridada, lo que conlleva que donador y aceptor estén muy cerca uno de otro. En esta conformación la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor y no es captada por el lector del equipo. Sin embargo, al hibridar con el ADN diana la

sonda se abre, alejándose donador y aceptor, pudiendo ser detectada la fluorescencia emitida por el primero (43, 89).

Sondas FRET. El sistema se compone de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN diana. Una de las sondas lleva un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas, los dos fluorocromos están próximos. Al ser excitado, el donador transfiere su energía al aceptor que, a su vez, emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo. En todos estos sistemas, el incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales, pero su coste es más elevado que el SYBR Green y la optimización de las condiciones de la reacción resulta más difícil (76, 181).

En los sistemas que utilizan sondas (fragmentos de ADN complementario a una parte intermedia del ADN que queremos amplificar), esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra que inhibe esta fluorescencia, de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa, la molécula fluorescente se libera y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de PCR será proporcional a la cantidad de ADN amplificado. Para que esta técnica sea válida, se requiere realizar en paralelo

una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN amplificado. Existen distintos sistemas comerciales que utilizan diferentes sondas y marcadores fluorescentes unidos en los distintos extremos de la molécula de ADN pero su propósito y fundamento es básicamente el mismo ya descrito (76, 181).

El monitoreo de la acumulación de productos de la PCR permite realizar un análisis cuantitativo relativo o absoluto en las muestras estudiadas utilizando estándares externos o internos. La exactitud de la cuantificación al usar estándares externos, dependerá de éstos (173).

A partir de la introducción de la PCR en tiempo real, se han publicado un gran número de aplicaciones para detectar diferentes microorganismos y también se ha utilizado la técnica para determinar la susceptibilidad de los microorganismos frente a antibióticos (104).

Por lo que respecta a la detección específica de *S. pneumoniae*, se han descrito diferentes métodos para su detección utilizando PCR en tiempo real. En uno de ellos se utilizó la técnica para detectar ADN neumocócico en 12 muestras de líquido cefalorraquídeo y se encontró que todas las muestras que habían resultado positivas en cultivo fueron detectadas por la PCR en tiempo real y además 2 muestras que fueron negativas en el cultivo pero con un resultado positivo en aglutinación con látex se detectaron también mediante esta técnica y 3 muestras más con resultados negativos en cultivo y

aglutinación látex fueron positivas en PCR. En este método se utilizó como blanco el gen de neumolisina y se basó en la transferencia de energía fluorescente (103).

En otro estudio se detectó simultáneamente a *S. pneumoniae* junto con *N. meningitidis* y *H. influenzae* en casos en los que se sospechaba meningitis y septicemia. Al analizar las muestras clínicas (Líquido cefalorraquídeo, suero, plasma y sangre) de aquellos casos confirmados mediante cultivo bacteriano, la sensibilidad de la prueba para el neumococo fue de un 91.8%. Esta prueba también identificó 46 casos previamente no detectados de enfermedad neumocócica en el análisis de 4113 muestras que daban cultivos negativos. Estos datos sugieren que el 1% de todos los casos de meningitis se debieron a más de un patógeno. Los métodos tradicionales de laboratorio como el cultivo bacteriano pueden no detectar a múltiples patógenos en una muestra y aquellos microorganismos no predominantes pueden pasar desapercibidos (42).

Existe otro estudio en el cual se detectaron neumococos en secreciones nasofaríngeas. Este método utilizó primers específicos para el gen de neumolisina y una sonda TaqMan y detectó ADN en mezclas en las cuales la cantidad de ADN fue de 1 a 10^6 células. La sensibilidad y especificidad del método comparado con el cultivo bacteriano fue de 100% y 96% respectivamente además de ser considerablemente más rápido que los métodos de cultivo e identificación convencionales (82).

Uno de los retos principales para la identificación de *S. pneumoniae* mediante PCR es la existencia de los 90 serotipos del microorganismo y es por ello que los métodos de diagnóstico deben enfocarse a detectar los genes o productos de ellos que son comunes a todas las cepas del microorganismo. La proteína A de superficie neumocócica, la adhesina A de superficie neumocócica y la neumolisina son factores de virulencia expresados por todos los serotipos de *S. pneumoniae* y por tanto se deben desarrollar métodos de diagnóstico enfocados a la identificación de ellos (82).

CONCLUSIONES

1. Los neumococos incluyen aproximadamente 90 serotipos con base en la estructura de sus polisacáridos capsulares, si bien la mayoría de las infecciones invasivas son causadas por sólo 23 de ellos.

2. Los principales factores de virulencia de *Streptococcus pneumoniae* son la cápsula, pared celular, neumolisina, proteínas A y C de superficie neumocócica (PspA y PspC) y autolisina (LytA). Sus funciones consisten en favorecer la colonización, proliferación y supervivencia microbiana dentro del hospedero, todo lo cual se sustenta en sus propiedades antifagocitarias, en la modulación de la respuesta inmune y en la promoción de la adherencia, la lisis celular y el daño tisular.

3. *Streptococcus pneumoniae* es uno de los patógenos humanos más importantes causando enfermedad a nivel mundial. El microorganismo afecta principalmente a menores de 2 años y a adultos mayores de 65 años.

4. *S. pneumoniae* es el microorganismo que más comúnmente ocasiona neumonía bacteriana en cualquier edad, otitis media en niños y meningitis en adultos; además, provoca hasta dos terceras partes de las neumonías adquiridas en la comunidad (CAP), el 33% de las sinusitis bacterianas, del 65 al 75% de las bacteremias ocultas y el 20% de las artritis sépticas en adultos, siendo la segunda causa de este padecimiento en niños mayores de 6 años.

5. Los aspectos básicos que sustentan la identificación de los neumococos incluyen a la prueba de sensibilidad a la optoquina, previa realización de frotis al Gram y observación de las características culturales en gelosa sangre.

6. Los métodos de laboratorio utilizados para identificar a *S. pneumoniae* incluyen técnicas de índole microbiológica, inmunológica, cromatográfica y molecular. Las pruebas de detección antigénica y las serológicas no muestran una uniformidad en cuanto a su sensibilidad y especificidad. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es rápida, específica y más sensible que el cultivo tradicional, pero aún no ha sido estandarizada y es más costosa.

7. Los antibióticos beta-lactámicos representan los de primera elección para combatir a este microorganismo, destacando las penicilinas, cefalosporinas, monobactam y carbapenem. No obstante, también se utilizan la vancomicina, eritromicina, sulfonamidas y fluoroquinolonas, opciones para confrontar la aparición, cada vez más frecuente, de cepas multirresistentes.

8. La creciente aparición de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a antibióticos complica el tratamiento y manejo de la enfermedad neumocócica, por lo que la mejor estrategia contra ésta consiste en la prevención a través de la vacunación. En la actualidad, las únicas vacunas aprobadas para prevenir la enfermedad invasiva por neumococo son la vacuna heptavalente conjugada PNCRM7 y la 23-valente (23PS), entre las cuales la primera resulta más efectiva y segura, aún en lactantes y niños.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------|---|
| 23PS* | Vacuna neumocócica frente a polisacáridos 23-valente |
| °C | Grados centígrados |
| µg | Microgramos |
| µL | Microlitros |
| ACIP-CDC* | Comité Asesor sobre Inmunización de los Centros para el control de enfermedades |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| CAP* | Neumonía adquirida en la comunidad |
| CbpA* | Proteína A de unión a colina |
| CIEP* | Contrainmunolectroforesis |
| COA* | Coagulación |
| EIA* | Ensayo inmunoenzimático |
| EPOC | Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica |
| FDA* | Administración de Medicinas y Alimentos |
| FRET* | Transferencia de energía de resonancia fluorescente |
| g | Gramos |
| h | Horas |
| ICs* | Complejos inmunes circulantes |
| ICT* | Inmuncromatografía de membrana |
| IgA | Inmunoglobulina tipo A |
| IgG | Inmunoglobulina tipo G |
| IgM | Inmunoglobulina tipo M |
| IL | Interleucina |
| IM | Intramuscular |
| IV | Intravenosa |
| kb | Kilo base |
| kg | Kilogramos |
| LA* | Aglutinación en látex |
| LCR | Líquido cefalorraquídeo |
| LytA* | Autolisina neumocócica |
| mg | Miligramos |
| mL | Mililitros |
| mm | Milímetros |
| MHC II* | Moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad |

* por sus siglas en inglés

| | |
|-----------------|---|
| MIC* | Concentración mínima inhibitoria |
| mL | Mililitro |
| NK* | Células Asesinas Naturales |
| nm | Nanómetros |
| OPS | Organización Panamericana de la Salud |
| PAF* | Factor de Activación plaquetaria |
| PBP* | Proteínas de unión a penicilinas |
| PCR* | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PMNs* | Leucocitos polimorfonucleares |
| PNCRM7* | Vacuna neumocócica heptavalente conjugada |
| Pnc-D* | Toxide Diftérico |
| Pnc-OMP* | Complejo proteico de membrana externa de <i>N. meningitidis</i> |
| Pnc-T* | Toxide Tetánico |
| PsaA* | Adhesina A de superficie neumocócica |
| PspA* | Proteína A de Superficie neumocócica |
| PspC* | Proteína C de Superficie neumocócica |
| RIA* | Radio inmuno ensayo |
| SIREVA | Sistema Regional de Vacunas |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| TI* | Timo independiente |
| TCR* | Receptor de células T |
| Tm | Temperatura media de desnaturalización del ADN |
| TNF- α * | Factor de necrosis tumoral |
| U | Unidades Internacionales |
| VIH | Virus de inmunodeficiencia humana |

*por sus siglas en inglés

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Albanese BA, Roche JC, Pass M, et al. Geographic, demographic, and seasonal differences in penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Baltimore. Clin Infect Dis. 2002; 34:15-21.
- 2) Alexander JE, Lock RA, Peeters CCAM, Poolman JT, Andrew PW, Mitchell TM, Hansman D, and Paton JC. Immunization of mice with pneumolysin toxoid confers a significant degree of protection against at least nine serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun. 1994; 62: 5683–5688.
- 3) American Thoracic Society. Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2001; 163:1730-1754.
- 4) Anderson EL, Kennedy DJ, Geldmacher KM, Donnelly J, Mendelman PM. Immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in infants. J Pediatr. 1996; 128:649-653.
- 5) Andersson, B., J. Dahmen, T. Frejd, H. Leffler, G. Magnusson, G. Noori, and C. S. Eden. Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells. 1983. J. Exp. Med. 158:559–570
- 6) Angel, C. S., M. Ruzek, and M. K. Hostetter. Degradation of C3 by *Streptococcus pneumoniae*. J. Infect. Dis. 1994; 170:600–608.

- 7) Appelbaum, P. C. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. Clin. Infect. Dis. 1992; 15:77–83.
- 8) Austrian R. The enduring pneumococcus: Unfinished business and opportunities for the future. Microb Drug Resist 1997; 3(2):111-115.
- 9) Avery, O. T., and R. Dubos. The protective action of a specific enzyme against type III pneumococcus infection in mice. J. Exp. Med. 1931; 54:73–89.
- 10) Avery, O. T., and W. F. Goebel. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins. II. Immunological specificity of synthetic sugar-protein antigens. 1929. J. Exp. Med. 1929; 50:533–550.
- 11) Avery, O. T., C. M. Macleod, and M. McCarty. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal serotypes: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. J. Exp. Med. 79:137–157
- 12) Baker, P. J. Regulation of the magnitude of the antibody response to bacterial polysaccharide antigens by thymus-derived lymphocytes. Infect. Immun. 1990; 58:3465–3468.
- 13) Baraboutis I, Skoutelis A: *Streptococcus pneumoniae* septic arthritis in adults. Clin Microbiol Infect 2004; 10(12): 1037-9

- 14) Bartlett JG, Dowell SF, Mandell LA, File TM Jr, Musher DM, Fine MJ. Practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2000;31:347-382
- 15) Bazhuni MF, Sant'Anna C, Alves A, Cocco A. Investigación sobre Infecciones Respiratorias Agudas (IRA). 2003. Cap. 3, 189:290.
- 16) Berry A M, Paton JC. Sequence heterogeneity of PsaA, a 37 kilodalton putative adhesion essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun 1996; 64:5255-5262.
- 17) Berry, A. M., J. Yother, D. E. Briles, D. Hansman, and J. C. Paton. Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun. 1989; 57:2037–2042.
- 18) Berry, A. M., R. A. Lock, D. Hansman, and J. C. Paton. Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun. 1989; 57:2324–2330.
- 19) Beuvery, E. C., F. Van Rossum, and J. Nagel. Comparison of the induction of immunoglobulin M and G antibodies in mice with purified pneumococcal type 3 and meningococcal group C polysaccharides and their protein conjugates. Infect. Immun. 1982; 37:15–22.
- 20) Black S, Shinefield H, Fireman B, Lewis E, Ray P, Hansen JR *et al*. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. Pediatr Infect Dis J 2000; 19(3):187-195

- 21) Black S, Shinefield H. Issues and challenges: Pneumococcal vaccination in pediatrics. *Pediatr Ann* 1997; 26(6):355-360.
- 22) Borgoño, J. M., A. A. Mclean, P. P. Vella, A. F. Woodhour, I. Canepa, W. L. Davidson, and M. R. Hilleman. Vaccination and revaccination with polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccines in adults and infants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1978; 157:148–154.
- 23) Boulnois, G. J. Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* 1992; 138:249–259.
- 24) Brandileone MC, Vieira VS, Casagrande ST, Zanella RC, Guerra ML, 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(2):141-146.
- 25) Briles DE, Hollingshead S, Brooks-Walter A, Nabors GS, Ferguson L, Schilling M *et al.* The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection. *Vaccine.* 2000; 18(16):1707-1711
- 26) Briles DE, Hollingshead S, Swiatlo E, Brooks-Walter A *et al.* Pneumococcal proteins PspA and PspC: Their potential for use as vaccines. En: Tomasz A, ed. *Streptococcus pneumoniae*. Molecular Biology & Mechanisms of Disease. Nueva York, NY: Mary Ann Liebert, Inc, 2000: 253-260.

- 27) Briles DE, Paton JC, Swiatlo E, Nahm MH. Pneumococcal Vaccines. Grampositive Pathogens. American Society for Microbiology, 2000.
- 28) Briles, D. E., J. L. Claffin, K. Schroer, and C. Forman. Mouse IgG3 antibodies are highly protective against infection with *Streptococcus pneumoniae*. Nature (London) 1981; 294:88–90.
- 29) Briles, D. E., J. Yother, and L. S. McDaniel. Role of pneumococcal surface protein A in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Rev. Infect. Dis. 1988; 10 (Suppl. 2):S372–S374.
- 30) Brooks-Walter, A., D. E. Briles, and S. K. Hollingshead. The *pspC* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a polymorphic protein, PspC, which elicits cross-reactive antibodies to PspA and provides immunity to pneumococcal bacteremia. Infect. Immun. 1999; 67:6533-6542
- 31) Bruyn, G. A. W., B. J. M. Zegers, and R. Van Furth. Mechanisms of host defense against infection with *Streptococcus pneumoniae*. Clin. Infect. Dis. 1992; 14:251–262.
- 32) Butler JC, Breiman RF, Lipman HB, Hofmann J, Facklam RR. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in the United States, 1978-1994: Implications for development of a conjugate vaccine. J Infect Dis 1995; 171(4):885-889.

- 33) Carlsen, B. D., M. Kawana, C. Kawana, A. Tomasz, and G. S. Giebink. Role of the bacterial cell wall in middle ear inflammation caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 1992; 60:2850–2854.
- 34) Centers for Disease Control and Prevention. *Streptococcus pneumoniae* disease. Available at www.cdc.gov.
- 35) Centers for Disease Control and Prevention, Guidelines, August 2004.
- 36) Centers for Disease Control and Prevention. Preventing pneumococcal disease among infants and young children: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 2000; 49, 1-34. 10-6-2000. 2000.
- 37) Chen DK, McGeer A, de Azavedo JC, Low DE. Decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. *N Engl J Med.* 1999; 341:233-239.
- 38) Cherian T, Lalitha MK, Manoharan A, Thomas K, Yolken RH & Steinhoff MC. PCR-Enzyme immunoassay for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in cerebrospinal fluid samples from patients with culture-negative meningitis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3605-3608.
- 39) Chudwin, D. S., S. G. Artrip, A. Korenblit, G. Schiffman, and S. Rao. Correlation of serum opsonins with in vitro phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 1985; 50:213–217.

- 40) Coffey TJ, Enright MC, Daniels M, et al. Recombinational exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*. 1998; 27:73-83
- 41) Cohen J, Powderly WG, Infectious Diseases. 2nd Ed. New York. Elsevier 2004
- 42) Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ & Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real time PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1553-1558.
- 43) Costa J. Formación Médica Continuada. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Servicio de Microbiología. Hospital Clínic i Provincial. Barcelona. España. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22(5):299-305
- 44) Cottagnoud, P., and A. Tomasz. Triggering of pneumococcal autolysis by lysozyme. *J. Infect. Dis.* 1993; 167:684–690.
- 45) Crain, M. J., W. D. Waltman II, J. S. Turner, J. Yother, D. F. Talkington, L. S. McDaniel, B. M. Gray, and D. E. Briles. Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all 600 clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 1990; 58:3293–3299.

- 46) Cundell, D. R., B. J. Pearce, J. Sandros, A. M. Naughton, and H. R. Masure. Peptide permeases from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eucaryotic cells. *Infect. Immun.* 1995; 63:2493–2498.
- 47) Dagan R, Givon-Lavi N, Yagupsky P *et al.* Effect of a 9-valent vaccine conjugated to CRN197 (PncCRM9) on nasopharyngeal (NP) carriage of vaccine type and non-vaccine type *S. pneumoniae* (Pnc) strains among day care center (DCC) attendees. Program and Abstracts of the 38th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998.
- 48) Dagan R, Melamed R, Zamir O, Leroy O. Safety and immunogenicity of tetravalent pneumococcal vaccines containing 6B, 14, 19F and 23F polysaccharides conjugated to either tetanus toxoid or diphtheria toxoid in young infants and their boosterability by native polysaccharide antigens. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16(11):1053-1059.
- 49) Dagan, R., M. Isaachson, R. Lang, J. Karpuch, C. Block, and J. Amir for the Israeli Pediatric Bacteremia and Meningitis Group. Epidemiology of pediatric meningitis caused by *Haemophilus influenzae* type b, *Streptococcus pneumoniae*, and *Neisseria meningitidis* in Israel: a 3-year nation- wide prospective study. *J. Infect. Dis.* 1994;169:912–916.
- 50) Diekema DJ, Brueggemann AB, Doern GV. Antimicrobial-drug use and changes in resistance to *Streptococcus pneumoniae*. *Emerg Infect Dis.* 2000; 6:552-556.

- 51) Dillard JP, Vandersea MW, Yother J. Characterization of the cassette containing genes for type 3 capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. J Exp Med. 1995; 181:973-983
- 52) Dintilhac A, Alloing G, Granadel C, Claverys JP. Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of metal permeases. Mol. Microbiol. 1997; 25:727-739.
- 53) Doern GV, Pfaller MA, Kugler K, Freeman J, Jones RN. Prevalence of antimicrobial resistance among respiratory tract isolates of *Streptococcus pneumoniae* in North America: 1997 results from the SENTRY antimicrobial surveillance program. Clin Infect Dis 1998; 27(4):764-770.
- 54) Doern GV. Antimicrobial use and emergence of antimicrobial resistance with *Streptococcus pneumoniae* in the United States. Clin Infect Dis. 2001; 33 (Suppl. 3):S187-S192.
- 55) Domínguez J, Galí N, Blanco S, Pedroso P, Prat C, Matas L & Ausina V. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen by rapid immunochromatographic assay in urine samples. Chest. 2001; 119: 243-249.
- 56) Dominguez, J., N. Gali, L. Matas, P. Pedroso, S. Blanco, M. Gimenez, C. Prat, N. Sopena, M. Sabria, and V. Ausina. PCR detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in serum samples for pneumococcal pneumonia diagnosis. Clin. Microbiol. Infect. 2001; 7:164-166.

- 57) Douglas, R. M., J. C. Paton, S. J. Duncan, and D. J. Hansman. Antibody response to pneumococcal vaccination in children younger than five years of age. *J. Infect. Dis.* 1983; 148:131–137.
- 58) Duane, P. G., J. B. Rubins, H. R. Weisel, and E. N. Janoff. Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells. *Infect. Immun.* 1993; 61:4392–4397.
- 59) Dykewics M.S. Rhinitis and Sinusitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 111:S520-S529.
- 60) Falguera M, Lopez A, Nogues A, Porcel JM & Rubio-Caballero M. Evaluation of the polymerase chain reaction method for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in pleural fluid samples. *Chest.* 2002; 122: 2212-2216.
- 61) Fedson DS. Pneumococcal vaccination for older adults: The first 20 years. *Drugs Aging* 1999; 15 Suppl 1:21-30.
- 62) Feikin DR, Schuchat A, Kolczak M, et al. Mortality from invasive pneumococcal pneumonia in the era of antibiotic resistance, 1995 to 1997. *Am J Public Health.* 2000; 90:223-229.
- 63) Feldman, C., T. J. Mitchell, P. W. Andrew, G. J. Boulnois, R. C. Read, H. C. Todd, P. J. Cole, and R. Wilson. The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium in vitro. *Microb. Pathog.* 1990; 9:275–284.

- 64) Felton, M. D., G. Kauffmam, B. Prescott, and B. Ottinger. Studies on the mechanism of immunological paralysis induced in mice by pneumococcal polysaccharides. *J. Immunol.* 1955; 74:17–26.
- 65) Ferrante, A., B. Rowan-Kelly, and J. C. Paton. Inhibition of in vitro human lymphocyte response by the pneumococcal toxin pneumolysin. *Infect. Immun.* 1984; 46:585-589.
- 66) Fine, D. P. Pneumococcal type-associated variability in alternate complement pathway activation. *Infect. Immun.* 1975; 12:772–778.
- 67) Fiore AE, Moroney JF, Farley MM, et al. Clinical outcomes of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* in the era of antibiotic resistance. *Clin Infect Dis.* 2000; 30:71-77.
- 68) Fowler Jr. VG, Scheld WM, Bayer AS: Endocarditis and intravascular infections. In: Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Elsevier Churchill Livingstone; 2005; 975-1022
- 69) García-Leoni, M. E., E. Cercenado, P. Rodeño, J. C. L. Bernaldo de Quiroz, D. Martínez-Hernández, and E. Bouza. Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin: a prospective microbiological and clinical study. *J. Infect. Dis.* 1992; 14:427–435.
- 70) Geelen, S. P. M., C. Neeleman, P. C. Aerts, M. R. Daha, T. E. Mollnes, J. J. Roord, A. Fler, and H. Van Dijk. Complement activation and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*: inverse relation with factor H binding. Submitted for publication.

- 71) Geelen, S., C. Bhattacharyya, and E. Tuomanen. The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells. *Infect. Immun.* 1993; 61:1538–1543.
- 72) Giebink, G. S., J. Verhoef, P. K. Peterson, and P. G. Quie. Opsonic requirements for phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* types VI, XVIII, XXIII, and XXV. *Infect. Immun.* 1977; 18:291–297.
- 73) Gillespie, S. H. Aspects of pneumococcal infection including bacterial virulence, host response and vaccination. *J. Med. Microbiol.* 1989; 28:237–248.
- 74) Gillespie, S. H., C. Ullman, M. D. Smith, and V. Emery. Detection of *Streptococcus pneumoniae* in sputum samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32:1308-1311
- 75) Glaister D. Early detection of lower respiratory tract infection: the value of the Gram-stained sputum smear. *Med Lab Sci.* 1991; 48: 175-177.
- 76) Gloffke W. Quantitative PCR update. Reviewing the latest trends and applications in quantitative, real-time PCR. *The Scientist.* 2003; 17: 41-43.
- 77) Gómez-Barreto D, Calderón-Jaimes E, Rodríguez RS, Espinosa de los Monteros LE, Juárez M. Características clínico-microbiológicas de la meningitis por *Streptococcus pneumoniae* resistente a la penicilina. *Salud Pública Mex* 1999; 41:397-404.

- 78) Gómez-Barreto D, Rodríguez RS, Calderón-Jaimesi E, Espinosa LE., Bases fisiopatológicas para la prevención de las infecciones por *Streptococcus pneumoniae*., Bol Med Hosp Infan Mex 2001; 58(12): 866-878.
- 79) Gómez-Barreto D. Ponencia XI Congreso del INSP. Instituto Nacional de Salud Pública. 2005
- 80) Gray, B. M., G. M. Converse III, and H. C. Dillon, Jr. Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing disease. J. Infect. Dis. 1979; 140:979–983.
- 81) Gray, B. M., G. M. Converse III, and H. C. Dillon, Jr. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. J. Infect. Dis. 1980; 142:923–933.
- 82) Greiner, O., P. J. R. Day, P. P. Bosshard, F. Imeri, M. Altwegg, and D. Nadal. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal secretions by real-time PCR. J. Clin. Microbiol. 2001; 39:3129-3134.
- 83) Hamilos D. L. Chronic Sinusitis. J Allergy Clin Immunol. 2000; 106:213-227.
- 84) Hansman D, Bullen MM. A resistant pneumococcus. Lancet. 1967; ii:264-265.

- 85) 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(1):122-140.
- 86) Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: Implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000; 30(1):100-121.
- 87) Henrichsen, J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1995; 33, 2759–2762
- 88) Hof, D. G., J. E. Repine, G. S. Giebink, and J. R. Hoidal. Productions of opsonins that facilitate phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* by human alveolar macrophages or neutrophils after vaccination with pneumococcal polysaccharide. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1981; 124:193–195.
- 89) Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA* 1991; 88:7276-80.
- 90) Hooper DC. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2:530-538.

- 91) Horne, D., and A. Tomasz. Pneumococcal Forssman antigen: enrichment in mesosomal membranes and specific binding to the autolytic enzyme of *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. 1985; 161:18–24.
- 92) Hortal M, Ruvinsky R, Rossi A, Agudelo CI, Castañeda E, Brandileone C. Impacto de *Streptococcus pneumoniae* en las neumonías del niño latinoamericano. Grupo SIREVA-Vigía. 2000;185-195
- 93) Hostetter, M. K. Serotypic variations among virulent pneumococci in deposition and degradation of covalently bound C3b: implications for phagocytosis and antibody production. J. Infect. Dis. 1986; 153:682–693.
- 94) Houldsworth, S., P. W. Andrew, and T. J. Mitchell. Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 by human mononuclear phagocytes. Infect. Immun. 1994; 62:1501–1503.
- 95) Jennings, H. J., C. Lugowski, and N. M. Young. Structure of the complex polysaccharide C-substance from *Streptococcus pneumoniae* type 1. Biochemistry. 1980; 19:4712–4719.
- 96) Johnson M., Medical Microbiology, Indiana University School of Medicine, January 2003.
- 97) Johnson, M. K. Cellular location of pneumolysin. FEMS Microbiol. Lett. 1977; 2:243-245.

- 98) Johnston, R. B., Jr. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. Rev. Infect. Dis. 1991;13(Suppl. 6):S509–S517.
- 99) Juvén T, Mertsola J, Waris M, Leinonen M, Meurman O, Roivainen M, Eskola J, Saikku P & Ruuskanen O. Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalised children. Pediatr Infect Dis J. 2000; 19: 293-298.
- 100) Kalin M. Pneumococcal serotypes and their clinical relevance. Thorax. 1998; 53:159-162
- 101) Karlowsky JA, Draghi DC, Thornsberry C, Jones ME, Critchley IA, Sahm DF. Antimicrobial susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in two successive respiratory seasons in the US. Intern J Antimicrob Agents. 2002;20:76-85
- 102) Kauffmann, F., E. Mørch, and K. Schmith. On the serology of the pneumococcus-group. J. Immunol. 1940; 39:397–426.
- 103) Kearns A M, Freeman R, Murphy OM, Seiders PR, Steward M & Wheeler J. Rapid PCR-based detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in cerebrospinal fluid [letter]. J Clin Microbiol 1999; 37: 3434.
- 104) Kearns AM, Graham C, Burdess D, Heatherington J & Freeman R. Rapid real-time PCR for determination of penicillin susceptibility in pneumococcal meningitis, including culture-negative cases. J Clin Microbiol 2002; 40: 682-684.

- 105) Kellogg J. A., Bankert D. A., Elder C.J., Gibbs J. L., Smith M. C. Identification of *Streptococcus pneumoniae* Revisited. J Clin Microbiol. 2001; 39 (9): 3373–3375.
- 106) Kelly, T., J. P. Dillard, and J. Yother. Effect of genetic switching of capsular type on virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun. 1994; 62:1813–1819.
- 107) Kertesz DA, Di Fabio JL, Cunto Brandileione MC, Castañeda E, Echaniz-Avilés G, Heitmann I. Invasive *S. pneumoniae* infection in Latin American children: Results of the Pan American Health Organization Surveillance Study. Clin Infect Dis. 1998;26(6):1355-1361.
- 108) Klein DL. Pneumococcal disease and the role of conjugate vaccines. Microb Drug Resist 1999; 5:147-157
- 109) Koedel U, Scheld WM, Pfister H-W. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. Lancet Infect Dis. 2002; 2:721-736.
- 110) Kornfeld, S. J., and A. G. Plaut. Secretory immunity and bacterial IgA proteases. Rev. Infect. Dis. 1981; 3:521–534.
- 111) Krivan, H. C., D. D. Roberts, and V. Ginsburg. Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc 1-4Gal found in some glycolipids. Proc. Natl. Acad. Sci. 1988; 85:6157–6161.
- 112) Kuppermann, N. Occult bacteremia in young febrile children. Pediatr Clin North Am 1999; 46:1073-1109.

- 113) Leinonen M & Mäkelä PH. Diagnosis of pneumococcal pneumonia. Clin Infect Dis 2001; 33:1440-1441.
- 114) Lieu TA, Black SB, Ray GT, Martin KE, Shinefield HR, Weniger BG. The hidden costs of infant vaccination. Vaccine 2000; 19(1):33-41.
- 115) Lieu TA, Ray GT, Black SB, Butler JC, Klein JO, Breiman RF *et al.* Projected cost-effectiveness of pneumococcal conjugate vaccination of healthy infants and young children. JAMA 2000; 283(11):1460-1468.
- 116) Lindsten, T., and B. Andersson. Studies on functional subpopulations of B cells in mice. Correction of the immune defect of CBA/N mice by transfer of C3 receptor-bearing B cells. Cell. Immunol. 1981; 61:386–396.
- 117) Lipsky BA, Boyko EJ, Inui TS, Koepsell TD. Risk-factors for acquiring pneumococcal infections. Arch Intern Med. 1986; 146:2179-2185
- 118) Lock, R. A., D. Hansman, and J. C. Paton. Comparative efficacy of autolysin and pneumolysin as immunogens protecting mice against infection by *Streptococcus pneumoniae*. Microb. Pathog. 1992; 12:137–143.
- 119) Lock, R. A., J. C. Paton, and D. Hansman. Comparative efficacy of pneumococcal neuraminidase and pneumolysin as immunogens protective against *Streptococcus pneumoniae*. Microb. Pathog. 1988; 5:461–467.

- 120) Lorente, M. L., M. Falguera, A. Nogues, A. R. Gonzalez, M. T. Merino, and M. R. Caballero. Diagnosis of pneumococcal pneumonia by polymerase chain reaction (PCR) in whole blood: a prospective clinical study. *Thorax*. 2000; 55:133-137.
- 121) Louisiana State University Medical Center. "*Streptococcus pneumoniae*." Bug Bytes January , 1996
- 122) Lund, E. On the nomenclature of the pneumococcal types. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1970; 20:321–323.
- 123) Lund, E., and J. Henrichsen. Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*, p. 241–262. *In* T. Bergan and J. R. Norris (ed.), *Methods in microbiology*. Academic Press, London. 1978.
- 124) Magee, A. D., and J. Yother. Requirement for capsule in colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 2001; 69:3755-3761
- 125) Marfin AA, Sporrer J, Moore PS, Siefkin AD. Risk factors for adverse outcome in persons with pneumococcal pneumonia. *Chest* 1995;107:457-462
- 126) Maroney JF, Fiore AE, Harrison LH, et al. Clinical outcomes of bacteremic pneumococcal pneumonia in the era of antibiotic resistance. *Clin Infect Dis.* 2001; 33:797-805.

- 127) Martinez E, Miro JM, Almirante B, et al. Effect of penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* on the presentation, prognosis, and treatment of pneumococcal endocarditis in adults. Clin Infect Dis. 2002; 35:130-139.
- 128) Matthay, K. K., W. C. Mentzer, D. W. Wara, H. K. Preisler, N. B. Lameris, and A. J. Ammann. Evaluation of the opsonic requirements for phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* serotypes VII, XIV, and XIX by chemiluminescence assay. Infect. Immun. 1981; 31:228–235.
- 129) McCarthy P L: Fever without apparent source on clinical examination. Curr Opin Pediatr 2004; 16(1): 94-106
- 130) McDaniel, L. S., J. Yother, M. Vijayakumar, L. McGarry, W. R. Guild, and D. E. Briles. Use of insertional activation to facilitate studies of biological properties of pneumococcal surface protein A (PspA). J. Exp.Med. 1987; 165:381–394.
- 131) Merck Manual of Diagnosis and Therapy. (2006) Sec. 5, Ch. 54.
- 132) Merck Manual of Diagnosis and Therapy. (2006) Sec. 6, Ch. 73.
- 133) Merck Manual of Diagnosis and Therapy. (2006) Sec. 7, Ch. 84.
- 134) Merck Manual of Diagnosis and Therapy. (2006) Sec. 7, Ch. 86.
- 135) Merck Manual of Diagnosis and Therapy. (2006) Sec. 13, Ch. 156, 157.

- 136) Merck Manual of Diagnosis and Therapy. (2006) Sec. 14, Ch. 176.
- 137) Merck Manual of Diagnosis and Therapy. (2006) Sec. 16, Ch. 208.
- 138) Metlay JP, Schulz R, Li YH, et al. Influence of age on symptoms at presentation in patients with community-acquired pneumonia. Arch Intern Med 1997;157:1453-1459
- 139) Mitchell, T. J., J. E. Alexander, P. J. Morgan, and P. W. Andrew. Molecular analysis of virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. J. Appl. Microbiol. 1997;83:62S-71S
- 140) Mosier, D. E., and B. Subbarao. Thymus-independent antigens: complexity of B-lymphocyte activation revealed. Immunol. Today. 1982; 3:217–222.
- 141) Mullis KB & Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 1987; 155: 335-350.
- 142) Murdoch, D. R., R. T. Laing, G. D. Mills, N. C. Karalus, G. I. Town, S. Mirrett, and L. B. Reller. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in urine samples from adults with community-acquired pneumonia. J. Clin. Microbiol. 2001;39:3495-3498

- 143) Murdoch, D. R., T. P. Anderson, K. A. Beynon, A. Chua, A. M. Fleming, R. T. Laing, G. I. Town, G. D. Mills, S. T. Chambers, and L. C. Jennings. Evaluation of a PCR assay for the detection of *Streptococcus pneumoniae* in respiratory and nonrespiratory samples from adults with community-acquired pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:63-66.
- 144) Murray P. R., *Medical Microbiology, Fourth Edition Chapters 22 and 23*, 2001.
- 145) Murray PR and Washington JA. Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clin Proc* 1975; 50: 339-44.
- 146) Musher DM, Groover JE, Reichler MR, et al. Emergence of antibody to capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* during outbreaks of pneumonia: association with nasopharyngeal colonization. *Clin Infect Dis.* 1997;24:441-446
- 147) Musher DM, Montoya R, Wanahita A. Diagnostic value of microscopic examination of Gram-stained sputum and sputum cultures in patients with bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis* 2004;39:165-169
- 148) Musher, D. M. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin. Infect. Dis.* 1992; 14: 801–809.
- 149) Musher, D. M., D. A. Watson, and R. E. Baughn. Does naturally acquired IgG antibody to cell wall polysaccharide protect human subjects against pneumococcal infection? *J. Infect. Dis.* 1990; 161:736–740.

- 150) Nahm MH, Olander JV, Magyarlaki M. Identification of cross-reactive antibodies with low opsonophagocytic activity for *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis 1997; 176(3):698-703.
- 151) NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard-6th edition. NCCLS document M7-A6. 1993.
- 152) Neeleman, C., S. Geelen, P. Aerts, M. Van Tilburg, D. Watson, J. Verhoef, A. Fler, and H. Van Dijk. Virulence of *Streptococcus pneumoniae* is associated with a regulator factor H, abstr. 548, p. 219. In Program and abstracts of the 33rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993.
- 153) Nielsen, S. V., U. B. S. Sørensen, and J. Henrichsen. Antibodies against pneumococcal C-polysaccharide are not protective. Microb. Pathog. 1993; 14:299–305.
- 154) Normark BH, Novak R, Ortqvist A, Kallenius G, Tuomanen E, Normark S. Clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* that exhibit tolerance of vancomycin. Clin Infect Dis. 2001;32:552-558
- 155) Nuorti JP, Butler JC, Farley MM, et al. Cigarette smoking and invasive pneumococcal disease. N Engl J Med. 2000; 342:681-689
- 156) Ofek, I., and N. Sharon. Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. Infect. Immun. 1988; 56:539–547.

- 157) Ortvist A, Hedlund J, Kalin M. *Streptococcus pneumoniae*: Epidemiology, Risk factors and clinical features. *Semin Respir Crit Care Med* 2006; 26(6): 563-574.
- 158) Overturf GD and the Committee on Infectious Diseases. American Academy of Pediatrics. Technical report: Prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines and antibiotic prophylaxis. *Pediatrics* 2000; 106:367-376.
- 159) Overweg K., Pericone C., Verhoef G., Weiser J., Meiring H., De Jong, J.M., De Groot R., Hermans P., Differential Protein Expression in Phenotypic Variants of *Streptococcus pneumoniae*., *Infection and Immunity*, August 2000, p. 4604-4610, Vol. 68, No. 8
- 160) Paton JC, Berry AM, Lock RA. Molecular analysis of putative pneumococcal virulence proteins. *Microb Drug Resist.* 1997; 3:3-10.
- 161) Paton JC, Lock RA, Lee CJ, Li JP, Berry AM, Mitchell TJ, Andrew PW, Hansman D Bulnois GJ. Purification and immunogenicity of genetically obtained pneumolysin toxoids and their conjugation to *Streptococcus pneumoniae* type 19F polysaccharide. *Infect immun* 1991; 59:2297-2304.
- 162) Paton, J. C., and A. Ferrante. Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by pneumolysin. *Infect. Immun.* 1983; 41:1212–1216.
- 163) Patterson M.J., *Medical Microbiology, Section I, Streptococcus Chapter*, Fourth edition, 2000.

- 164) Peltola H, Booy R, Schmitt HJ. What can children gain from pneumococcal conjugate vaccines?. *Eur J Pediatr.* 2004; 163:509-516
- 165) Peterson LR. Penicillins for treatment of pneumococcal pneumonia: does in vitro resistance really matter?. *Clin. Infect. Dis.* 2006;42(2):234-7
- 166) Pfaller MA, Ehrhardt AF, Jones RN. Frequency of pathogen occurrence and antimicrobial susceptibility among community-acquired respiratory tract infections in the respiratory tract surveillance program study: microbiology from the medical office practice environment. *Am J Med.* 2001; 111(suppl 9A):4S-12S.
- 167) Philajamaki M, Kotilainen P, Kaurila T, et al. Macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* and use of antimicrobial agents. *Clin Infect Dis.* 2001; 32:483-488.
- 168) Plotkowski, M.-C., E. Pluchelle, G. Beck, J. Jaquot, and C. Hannoun. Adherence of type I *Streptococcus pneumoniae* to tracheal epithelium of mice infected with influenza A/PR8 virus. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1986;134:1040–1044
- 169) Prescott L.M.M., Klein D. A., Harley J.P., *Microbiology*, Fifth Edition, July 2001.
- 170) Programa de Actualización Continua en pediatría. Parte B, Libro 2, México, Merck División Pediatría 2006.

- 171) Quagliarello VJ, MW Scheld. "Drug Therapy: Treatment of Bacterial Meningitis." *The New England Journal of Medicine*. 1997; 336:708-16.
- 172) Raad J; Peacock JE: Septic arthritis in the adult caused by *Streptococcus pneumoniae*: a report of 4 cases and review of the literature. *Semin Arthritis Rheum*. 2004; 34(2):559-569.
- 173) Rasmussen R. Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S, Wittwer, C., Nakagawara, K. Rapid cycle real-time PCR. *Methods and applications*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 21-34. 2001.
- 174) Richter SS, Heilmann KP, Coffman SL, et al. The molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 1994-2000. *Clin Infect Dis*. 2002; 34:530-539.
- 175) Riesenfeld-Orn, I., S. Wolpe, J. F. Garcia-Bustos, M. K. Hoffmann, and E. Tuomanen. Production of interleukin-1 but not tumor necrosis factor by human monocytes stimulated with pneumococcal cell surface components. *Infect. Immun*. 1989; 57:1890–1893.
- 176) Ririe KM, Rasmussen RP & Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997; 245: 154-160.
- 177) Robbins JB, Austrian R, Lee CJ, Rastogi SC, Schiffman G, Henrichsen J *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(6):1136-1159

- 178) Rosenow, C., P.Ryan, J. Weiser, S. Johnson, P.Fontan, A. Ortqvist, and H. Masure. Contribution of a novel choline binding protein to adherence, colonization, and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. Mol. Microbiol. 1997; 25:819-829.
- 179) Rubins, J. B., P. G. Duane, D. Clawson, D. Charboneau, J. Young, and D. E. Niewoehner. Toxicity of pneumolysin to pulmonary alveolar epithelial cells. Infect. Immun. 1993; 61:1352–1358.
- 180) Salo P & Leinonen M. Microbiological investigations. Semin Respirat Infect. 1999; 14: 128-134.
- 181) Saukkoriipi, A. Detection of pneumococcus by PCR. Oulu: Oulun yliopisto, 2003. 85 p. (Acta Universitatis Ouluensis D 767/2003).
- 182) Scott JA, Hall AJ, Dagan R, et al. Serogroup-specific epidemiology of *S. pneumoniae*: associations with age, sex and geography in 7000 episodes of invasive disease. Clin Infect Dis. 1996;22:973-988
- 183) Shaheen MA, Frerichs RR, Alexopoulos N, Rainey JJ. Immunization coverage among predominantly Hispanic children, aged 2-3 years, in central Los Angeles. Ann Epidemiol 2000; 10(3):160-168.
- 184) Shapiro ED, Berg AT, Austrian R, Schroeder D, Parcels V, Margolis A et al. The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine. N Engl J Med 1991; 325(21):1453-1460.

- 185) Shortridge VD, Doern GV, Brueggemann AB, Beyer SM, Flamm RK. Prevalence of macrolide resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* isolates from a multicenter antibiotic resistance surveillance study conducted in the United States in 1994-1995. Clin Infect Dis. 1999; 29:1186-1188.
- 186) Shrag SJ, Beall B, Dowell SF. Limiting the spread of resistant pneumococci: Biological and epidemiologic evidence for the effectiveness of alternative interventions. Clin Microbiol Rev 2000; 13:588-601.
- 187) Siegel M, Timpone J. Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* endocarditis: a case report and review. Clin Infect Dis. 2001; 32:972-974.
- 188) Sih TM, Acute Otitis Media in Children: Analysis of microbiology and antimicrobial susceptibility. Annals of Otol. Rhinol & Laryngol. 2001; 110, 7: 662-666.
- 189) Silvenoinen-Kassinen, S., and M. Koskela. Optimal conditions for the opsonophagocytosis test with *Streptococcus pneumoniae* serotypes 3, 6A, 7F and 19F and human granulocytes. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 1986; Sect. C 94:105–111.
- 190) Smit P, Oberholzer D, Hayden Smith S, Koornhof HJ, Hilleman MR. Protective efficacy of pneumococcal polysaccharide vaccines. JAMA 1977; 238:2613-2616.

- 191) Solórzano F, LA Ortiz, MG Miranda, G Echaniz, A Soto, H Guiscafré. 2005. Serotipos prevalentes de *S. pneumoniae* colonizadores de nasofaringe en niños. *Salud Publica Mex.* 2005; 47:276-281.
- 192) Sørensen, U. B. S., J. Blom, A. Birch-Andersen, and J. Henrichsen. Ultrastructural localization of capsules, cell wall polysaccharide, cell wall proteins, and F antigen in pneumococci. *Infect. Immun.* 1988; 56:1890–1896.
- 193) Sørensen, U. B. S., R. Agger, J. Bennedsen, and J. Henrichsen. Phosphorylcholine determinants in six pneumococcal capsular polysaccharides detected by monoclonal antibody. *Infect. Immun.* 1984; 43:876–878.
- 194) Spector S.L., Bernstein I.L., Li J.T. Parameters for the diagnosis and management of sinusitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1998; 102:S107-S144.
- 195) Stáb, F., F. Austrup, and E. Köölsch. Regulation of the anti- (1-3) dextran IgG antibody response of BALB/c mice by idiotype-specific T suppressor lymphocytes. *J. Immunol.* 1990; 144:53–59.
- 196) Stein CR, Weber DJ, Kelley M. Using hospital antibiogram data to assess regional pneumococcal resistance to antibiotics. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9:211-216.
- 197) Summary of the Notifiable Diseases. Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Department of Health and Human Services. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* 2002; 51: 1-88.

- 198) The Centers for Disease Control and Prevention. "Drug-Resistant *Streptococcus pneumoniae* (DRSP) Disease." FACTSHEETS. February 1999.
- 199) Todar K., Textbook of Bacteriology, University Of Wisconsin, Dep. of Bacteriology, Chapter 4, June 2004.
- 200) Tomasz, A. Surface components of *Streptococcus pneumoniae*. Rev. Infect. Dis. 1981; 3:190–211.
- 201) Torres JM, Cardenas O, Vasquez A, Schlossberg D. *Streptococcus pneumoniae* bacteremia in a community hospital. Chest 1998;113:387-390
- 202) Tuomanen EI, R Austrian, HR Masure. "Pathogenesis of Pneumococcal Infection." The New England Journal of Medicine. 1995; 332(19):1280-4.
- 203) Tuomanen, E., A. Tomasz, B. Hengstler, and O. Zak. The relative role of bacterial cell wall and capsule in the induction of inflammation in pneumococcal meningitis. J. Infect. Dis. 1985; 151:535-540.
- 204) Tuomanen, E., H. Liu, B. Hengstler, O. Zak, and A. Tomasz. The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. J. Infect. Dis. 1985; 151:859-868
- 205) Tuomanen, E., R. Rich, and O. Zak. Induction of pulmonary inflammation by components of the pneumococcal cell surface. Am. Rev. Respir. Dis. 1987; 135:869–874.

- 206) Van Dam, J. E. G., A. Fleer, and H. Snippe. Immunogenicity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides. *Antonie Leeuwenhoek*. 1990; 58:1–47.
- 207) Van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, et al: Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 2004 Oct 28; 351(18): 1849-59
- 208) Virolainen A, Russell W, Crain MJ, Rapola S, Käyhty H & Briles DE. Human antibodies to pneumococcal surface protein A in health and disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2000; 19: 134-138.
- 209) Virolainen A, Russell W, Rapola S, Briles DE, Kayhty H. Human antibodies to pneumococcal surface protein A (PspA). Abstr. G-38, pl. 150 American Society for Microbiology, Washington D.C. 1996.
- 210) Vuori-Holopainen E & Peltola H. Reappraisal of lung tap: review of an old method for better etiologic diagnosis of childhood pneumonia. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 715-726.
- 211) Vuori-Holopainen E, Salo E, Saxen H, Hedman K, Hyypia T, Lahdenpera R, Leinonen M, Tarkka E, Vaara M & Peltola H. Etiological diagnosis of childhood pneumonia by use of transthoracic needle aspiration and modern microbiological methods. *Clinical Infectious Diseases* 2002; 34: 583-590.
- 212) Watson DA, Musher DM, Jacobson JW, Verhoef J. A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery. *Clin Infect Dis* 1993; 17:913-924

- 213) Watson, D. A., and D. M. Musher. Interruption of capsule production in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 by insertion of transposon Tn916. *Infect. Immun.* 1990; 58:3135–3138.
- 214) Wheeler, J., R. Freeman, M. Steward, K. Henderson, M. J. Lee, N. H. Piggott, G. J. Eltringham, and A. Galloway. Detection of pneumolysin in sputum. *J. Med. Microbiol.* 1999; 48:863-866.
- 215) Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med.* 2000; 343:1917-1924.
- 216) Winkelstein, J. A., and A. Tomasz. Activation of the alternative pathway by pneumococcal cell walls. *J. Immunol.* 1977; 118:451–454.
- 217) Winkelstein, J. A., and A. Tomasz. Activation of the alternative complement pathway by pneumococcal cell wall teichoic acid. *J. Immunol.* 1978; 120:174–178.
- 218) Wittwer C T, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA & Balis UJ. The LightCycler T M : a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques.* 1997; 22: 176-181.
- 219) Wu HY, Nahm M, Guo Y, Russell M, Briles DE. Intranasal immunization of mice with PspA can prevent intranasal carriage and infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1997; 175:893-896.