

ARTICULO ORIGINAL

Prevalencia de serotipos y resistencia a antibióticos betalactámicos de *Streptococcus pneumoniae* en menores de 6 años. Paraguay 2000 a 2008***Streptococcus pneumoniae* isolated in Paraguay in children under six years old from 2000 to 2008: serotypes and antibiotic resistance****Chamorro G¹, León M¹, Kawabata A¹, Franco R¹, Gómez G², Quiñónez B³, Ortellado J⁴, Ortiz H⁴, Rivas M⁵, Blasco R⁶, Ayala E⁷, Irala J⁷, Leguizamón M⁸**¹Laboratorio Central de Salud Pública²Hospital Nacional³Hospital General Pediátrico⁴Centro Materno Infantil⁵Hospital de Clínicas⁶Hospital Regional de Alto Paraná⁷Instituto de Medicina Tropical⁸Instituto de Previsión Social**RESUMEN**

Este estudio describe la distribución de los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en menores de seis años en Paraguay desde 2000 a 2008 y el perfil de sensibilidad a los antibióticos betalactámicos. Estudio observacional descriptivo retrospectivo, basado en la revisión de fichas de los pacientes del estudio mencionado. El estudio se llevó a cabo en ocho centros asistenciales del Paraguay que forman parte de la red de Vigilancia Centinela de meningitis y neumonías bacterianas (VIMENE) e incluye a 732 menores de seis años con infección invasiva por *S. pneumoniae* que asistieron a alguno de los ocho centros médicos. Los medios de cultivo utilizados fueron agar sangre de carnero, agar nutritivo y BHI; para pruebas complementarias se utilizaron Desoxicolato de Sodio al 10% para demostrar la solubilidad en bilis, discos diferenciales de optoquina. La serotipificación del microorganismo se realizó usando el suero Omni, (mezcla de sueros polivalentes producido en conejos), kit con 83 antisueros anti-*S. pneumoniae* (Statens Serum Institut de Copenhagen, Dinamarca). Para la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) de penicilina se empleó Epsilon-test, interpretados según los criterios de la CLSI, incluimos 765 cepas identificadas como *Streptococcus pneumoniae*. El serotipo 14 es el más frecuentemente aislado y el que presenta los más altos índices de resistencia a la penicilina. El desarrollo de cepas resistentes a la penicilina es un proceso gradual en el que intervienen sucesivas mutaciones genéticas de la bacteria, y presión selectiva, la cual se genera por el uso indiscriminado de antibióticos. Con los criterios actuales de la CLSI, no se encuentran cepas de alto nivel de resistencia, por lo que este antibiótico sigue siendo efectivo sobre todo para casos de neumonías de la comunidad. Estudios con estas características son necesarios para conocer el comportamiento de éste agente patógeno con el tiempo, con el fin de aportar al conocimiento epidemiológico y de acuerdo a ello elaborar las mejores estrategias aplicables a los programas de prevención.

Palabras claves: *S. pneumoniae*, serotipos, resistencia antibiótica, Paraguay.

ABSTRACT

We determined the frequency and distribution of *S. pneumoniae* serotypes in children under six years old in Paraguay from 2000 to 2008 and the sensibility profile to penicillin.

***Autor Correspondiente:** Dr. Gustavo Chamorro, Departamento de Bacteriología, Sección de Patógenos Respiratorios y Meningeos, Laboratorio Central de Salud Pública. Av. Venezuela y Florida. Tel.: 595-21-292653 int. 111. Asunción –Paraguay. E-mail: chamorroga@hotmail.com. Fecha de Recepción: marzo de 2011, Fecha de aceptación: abril de 2011.

It was an observational descriptive and retrospective study carried out through the revision of the clinical records of the patients included in the study. The study was carried out in eight health care centers of Paraguay from the Sureveillance Network and included 732 children under six years old with invasive *S. pneumoniae* infection that attended one of eight medical centers. The culture mediums used were sheep blood agar, nutrient agar and BHI; for complementary tests bile salts were used to demonstrate solubility and differential optoquine disks. Micro-organisms serotyping was made using Omni serum (mixture of polyvalent sera produced I rabbits) kit with 83 anti-*S. pneumoniae* sera (Statens Seruminstitut from Copenhagen, Denmark). For the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of penicillin, the Epsilon - test was used and interpreted according to CLSI criteria. We included 765 strains identified as *Streptococcus pneumoniae*. Serotype 14 was the most prevalent and the one that presented the highest indexes of penicillin resistance. The development of penicillin resistant strains is a gradual process in which successive genetic mutations of the bacterium and a selective pressure generated by the indiscriminate use of antibiotics intervene. There was a low frequency of penicillin resistant *S. pneumoniae* and high-level resistance strains were not found. Therefore, we can conclude that this antibiotic should still be the first choice. Studies with these characteristics are necessary to know the epidemiological reality of our countries and elaborate the best strategies applicable to the prevention programs.

Keywords: *S. pneumoniae*, serotypes, antibiotic resistance, Paraguay.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones de vías respiratorias continúan siendo una de las 10 primeras causas de morbilidad y mortalidad en los menores de seis años de edad. El *Streptococcus pneumoniae* es un patógeno de gran importancia en patología humana y causa infecciones como otitis media, sinusitis o neumonía, que pueden ir acompañadas de otras enfermedades invasoras como meningitis y bacteriemia (1).

Streptococcus pneumoniae es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo que, asociado con el desarrollo de resistencia a los antibióticos, se constituye en uno de los principales problemas de salud pública (2).

Existen 92 serotipos de *S. pneumoniae*, de los cuales casi la mitad han sido implicados en distintas enfermedades, lo que ha complicado el desarrollo de una vacuna con cobertura total de los serotipos (3).

Un problema que complicó el manejo de las infecciones neumocócicas es el incremento de la resistencia a penicilina y otros antibióticos lo que ha provocado un renovado interés en la biología del microorganismo. Esto plantea situaciones que deben ser reanalizadas en función de ofrecer alternativas para el tratamiento y la prevención de este agente oportunista (4). El incremento de aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la penicilina se favorece por la presión selectiva del antibiótico y la dispersión clonal (5). Este trabajo tuvo por objetivo determinar la frecuencia y distribución de los serotipos de *S. pneumoniae* en menores de seis años de edad en Paraguay desde 2000 a 2008 y determinar el perfil de sensibilidad a la penicilina y cefotaxima.

MATERIALES Y METODOS

Es un diseño observacional descriptivo retrospectivo, basado en la revisión de fichas de los pacientes del estudio mencionado. El análisis estadístico se realizó con EPIINFO 6 y el programa WHONET de OMS.

El estudio se llevó a cabo en ocho centros asistenciales del Paraguay (Hospital Nacional, Hospital General Pediátrico, Centro Materno Infantil, Hospital de Clínicas, Instituto de Previsión Social, Hospital Regional de Alto Paraná, Instituto de Medicina Tropical).

De las fichas epidemiológicas se obtuvieron datos como edad, sexo, perfil de sensibilidad a los antibióticos betalactámicos.

La población de estudio estuvo constituida por 732 pacientes menores de seis años con infección invasiva por *S. pneumoniae* que asistieron a uno de los ocho centros médicos y de quienes fueron aislados una cepa de *Streptococcus pneumoniae* a partir de una muestra clínica obtenida de un sitio normalmente estéril como líquido cefalorraquídeo, líquido pleural y hemocultivo.

Aislamientos: los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* incluidos fueron referidos por los laboratorios de los centros de atención médica que aceptaron colaborar en el estudio y que llenaron los requisitos de inclusión del protocolo, tales como: proceder de un caso clínico con un cuadro invasivo como neumonía o meningitis, aislados de niños menores de 6 años y haberse obtenido el aislamiento a partir de una muestra representativa de un sitio normalmente estéril.

Medios de cultivo: los medios de cultivo para el estudio, fueron los convencionales para este tipo de trabajo bacteriológico, básicamente se utilizó agar sangre de carnero, agar nutritivo y BHI; para pruebas complementarias se utilizaron sales biliares para demostrar la solubilidad, discos diferenciales de optoquina (6).

Sueros tipificadores: La confirmación del microorganismo se realizó usando el suero Omni, el cual es una mezcla de sueros polivalentes producido en conejos, este suero es empleado en la reacción capsular o prueba de Neufeld Quellung. El suero contiene 83 antisueros anti-*S.pneumoniae* y es producido por el Statens Seruminstitut de Copenhagen, Dinamarca.

Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de penicilina se empleó la técnica del Epsilon-test o E-test (AB Biodisk). Esta técnica consiste en la aplicación sobre una placa de agar, de una tira de papel impregnada con una gradiente exponencial, predefinido y estable de un antibiótico. Luego de la incubación se observa un elipsoide simétrico de inhibición del crecimiento. La zona de intersección del crecimiento y la tira determina el valor de MIC en $\mu\text{g/ml}$ (7), la interpretación se realizó utilizando los criterios de la CLSI (8).

RESULTADOS

Un total de 8 instituciones que forman parte de la Red de Vigilancia Centinela de las meningitis y neumonías bacterianas VIMENE colaboraron en el estudio y un total de 732 cepas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas en dichos centros fueron incluidos en el presente trabajo.

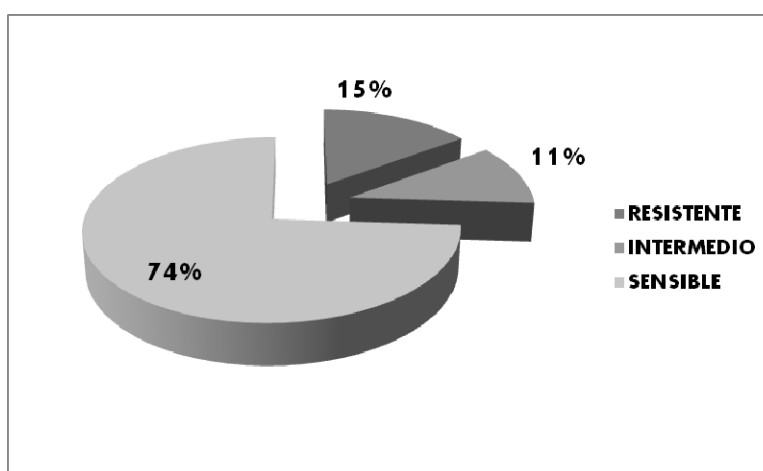
La frecuencia de los serotipos de *S. pneumoniae* se dio de la siguiente manera (tabla 1): serotipo 14 con 34,3%, serotipo 5 con 15,4%, otros serotipos con 16,1%, serotipo 1 con 10,1%, serotipo 6B con 6,6 %, serotipo 9V con 3,8%, serotipo 6A con 3,0%, serotipo 23F con 2,6%, serotipo 19A con 2,0%, serotipo 7F con 1,8%, serotipo 4 con 1,6%, serotipo 19F con 37%, serotipo 18C con 0,68 % y el serotipo 3 con 0,55 %.

Tabla 1. Serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en menores de seis años en Paraguay desde el año 2000 hasta el año 2008.

| SEROTIPOS | Nro de aislamientos | % |
|--------------|---------------------|------------|
| 14 | 251 | 34 |
| 5 | 113 | 15 |
| 1 | 74 | 10 |
| 6B | 48 | 7 |
| 9V | 28 | 4 |
| 6A | 22 | 3 |
| 23F | 19 | 3 |
| 4 | 12 | 2 |
| 7F | 13 | 2 |
| 19A | 15 | 2 |
| 3 | 4 | 1 |
| 18C | 5 | 1 |
| 19F | 10 | 1 |
| Otros | 118 | 16 |
| Total | 732 | 100 |

La tasa global de sensibilidad disminuida a penicilina (SDP) fue 26 %, correspondiendo 11% a resistencia intermedia y 15% a resistencia alta (figura 2 y figura 3).

En promedio la alta resistencia a la penicilina 12,1 % corresponde a cepas provenientes de casos de neumonías y 3 % corresponde a cepas aisladas de meningitis. Mientras que la alta resistencia a la cefotaxima es del 3,2 % en los casos de neumonías y 0,85 % en las cepas de meningitis.

**Figura 2.** Perfil de sensibilidad de *S. pneumoniae* en niños menores de seis años en Paraguay. n=732

En la siguiente figura se detalla la evolución de la resistencia del *Streptococcus pneumoniae* en los años de estudio, se puede apreciar una brusca caída de la resistencia a la penicilina a partir del año 2008, esto se puede explicar por el cambio en el rango de interpretación por la CLSI (8).

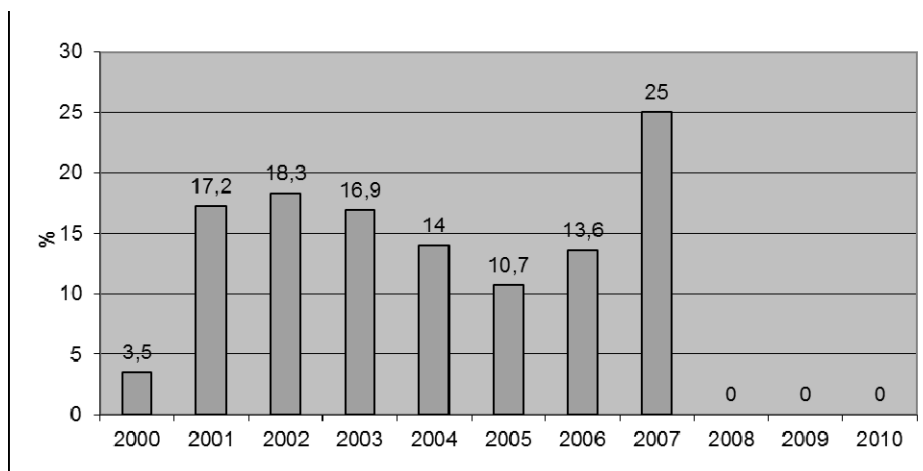


Figura 3. Evolución de la resistencia del *Streptococcus pneumoniae* a la penicilina. n= 732

En la siguiente figura podemos apreciar la evolución de la resistencia del *Streptococcus pneumoniae* frente a la cefotaxima, que se mantuvo siempre por debajo de 10%, se aprecia también una brusca caída de la resistencia a partir del año 2008, esto se puede explicar por el cambio en el rango de interpretación por el CLSI(8).

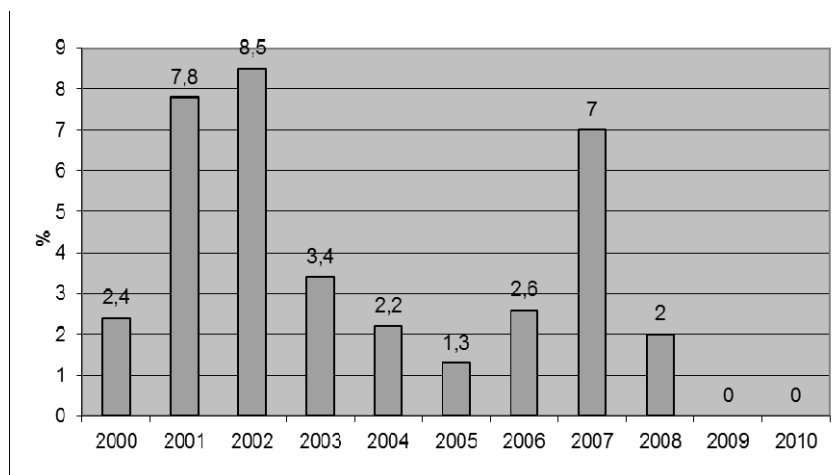


Figura 4. Evolución de la resistencia del *Streptococcus pneumoniae* a la cefotaxima. N= 732

Se observó una resistencia global promedio del 4,05 % a la cefotaxima en el tiempo de estudio.

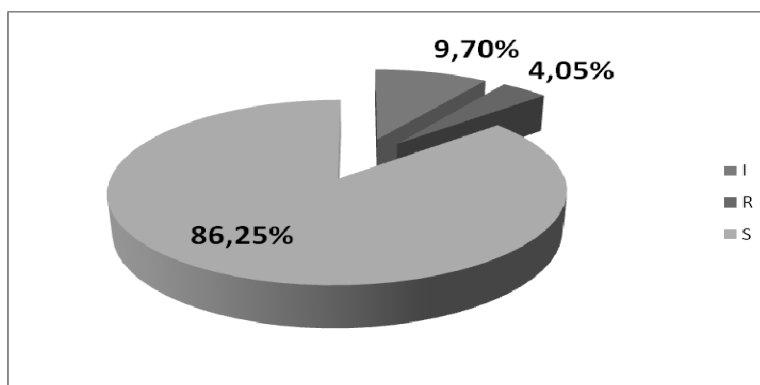


Figura 5. Perfil de susceptibilidad a la Cefotaxima en cepas de *S. pneumoniae* en menores de seis años en Paraguay. N= 732

DISCUSIÓN

A pesar de los progresos logrados en el tratamiento con antimicrobianos y la modernización de los servicios hospitalarios, *S. pneumoniae* sigue siendo una causa significativa de mortalidad y, por lo tanto, constituye un problema importante de salud pública.

En Paraguay, la resistencia a la penicilina en aislamientos invasores de *S. pneumoniae* recuperados de niños menores de 6 años no ha tenido un incremento significativo a través del tiempo, manteniéndose entre el 10% y el 15% en este periodo de estudio. Así mismo, la resistencia a la cefotaxima es relativamente baja (4%), en relación a otros países de la región como Argentina 23%(9), Chile 20%(9), Colombia 35% (9) y similares a Uruguay 2%(9) y Brasil 4%(9) a pesar de que el serotipo 14 que está relacionado con resistencia a éstos antibióticos sea el más frecuentemente aislado.

En el mundo, el incremento en la prevalencia de aislamientos de *S. pneumoniae* resistentes a la penicilina se ha asociado con la naturaleza clonal de ciertas cepas resistentes, las cuales se han establecido como clones endémicos (10,11), o con la evolución local de aislamientos resistentes que, por medio de transformación genética y recombinación homóloga, adquieren marcadores de resistencia y por el efecto de la presión selectiva del antibiótico pueden proliferar y establecerse como una población clonal (12,11).

Los estudios de serotipificación tienen importancia epidemiológica ya que tienen por objeto determinar la distribución geográfica de los mismos, dato importante para conocer los serotipos circulantes en el país y la región que pueda aportar a la producción de una vacuna con la mezcla de los serotipos de *S. pneumoniae* que más frecuentemente se aíslan.

Es importante conocer y mantener una vigilancia del comportamiento de las cepas de *S. pneumoniae* frente a los antibióticos, debido al incremento de la resistencia en el mundo, lo que incide en una pobre respuesta terapéutica de las cepas con alto nivel de resistencia.

El desarrollo de cepas resistentes a penicilina es un proceso gradual en el que intervienen sucesivas mutaciones genéticas de la bacteria, y presión selectiva, la cual se genera por el uso indiscriminado de antibióticos (13, 14).

Los estudios de vigilancia han contribuido al mejor conocimiento de la epidemiología de las enfermedades infecciosas y son importantes para el control de la dispersión de la resistencia a los antibióticos que, además, de establecer la situación actual, también

permiten evaluar el impacto de cualquier medida de intervención dirigida a disminuir la infección, aplicando las mejores estrategias en los programas de prevención.

Una de ellas es la inmunización de la población infantil con una vacuna conjugada, la cual ha comprobado ser efectiva en la reducción de las infecciones invasoras en niños causadas por aislamientos resistentes a la penicilina y disminuir en los portadores nasofaríngeos los serotipos contenidos en la vacuna (15). Por consiguiente, la vacunación puede tener consecuencias en la distribución y prevalencia de grupos clonales, una consideración adicional que enfatiza la necesidad de mantener activa la vigilancia de los aislamientos invasores de *S. pneumoniae*.

Agradecimientos: A todo el personal técnico del Departamento de Bacteriología en las personas de Lorena Rodríguez, Rocío Viveros, Héctor Fariña, Estela Castro, Amalia Cantero.

A la Oficina local de la OPS/OMS en la persona del Dr. Raúl Montesano por su apoyo a nuestro trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Mufson MA. Enfermedades Infecciosas. En: Mandell G, Douglas R, Bennett J, Dolin R, editores. Principios y Prácticas. Buenos Aires, Argentina, Ed. Médica Panamericana, 1991, p. 1625-30.
2. Doern GV. Antimicrobial use and the emergence of antimicrobial resistance with *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *Clin Infect Dis*. 2001;33(Suppl.3):S187-92.
3. Ruvinsky R, Gentile A, Regueira M, Corso A, Pace J, Bakir J y col. Infecciones invasivas por *Streptococcus pneumoniae*: Estudio epidemiológico e importancia del desarrollo de un sistema de vigilancia. *Rev Chil Pediatr*. 2004; 75(1):77-9.
4. Calderón JE. Resistencia a los fármacos antimicrobianos. En: Espinosa LR, ed. Terapéutica en enfermedades infecciosas. 2a. edición. México, D.F.: Impresora y Litografía Universal, 1999:23-40.
5. 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 Publica Mex* 1999;41:397-404.
6. Diagnóstico Microbiológico. Koneman, E.W.; Allen S.D.; Janda W.M.; Editorial Médica Panamericana. Quinta edición. Año 1999. Bs. As. –Argentina.
7. Moreno J, Phandanouvong V, Castañeda E,. Vigilancia molecular de aislamientos invasores de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la penicilina en niños colombianos menores de 5 años. *BIOMEDICA* 2004; 24; 296-301
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth Informational Supplement. CLSI Document M100-S19. (ISBN 1-56238-690-5). Clinical and Laboratory standard Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2009.
9. Informe Regional de SIREVA II: Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* en procesos invasores, 2000-2005. (ISBN 978-92—7-532794-4), Washington, DC.: OPS, 2007.
10. Telli M, Eyigör M, Gültekin B, Aydın N. Evaluation of resistance mechanisms and serotype and genotype distributions of macrolide-resistant strains in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Aydın, Turkey. *J Infect Chemother*. 2011 Apr 2. [Epub ahead of print]
11. Tomasz A. New faces of an old pathogen: emergence and spread of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Am J Med* 1999;107:55S-62S.
12. Coffey TJ, Dowson C, Daniels M, Zhou J, Martin C, Spratt G et al. Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microb* 1991;5:2255-60.
13. Baquero F. Pneumococcal resistance to B-lactam antibiotics: a global geographic overview. *Microb. Drug Resist.*, 1: 115-20, 1995.
14. Dowson CG, Coffey TJ, Spratt BG. Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding-protein mediated resistance to beta-lactam antibiotics. *Trends Microbiol.*, 2: 361-6, 1994.
15. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Lynfield R, et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med* 2003; 348:1737-46.