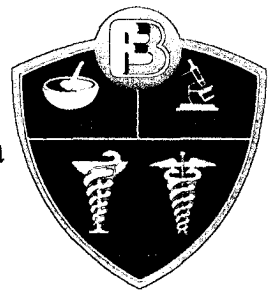




Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Departamento de Microbiología y Parasitología
Maestría en Microbiología, Mención Clínica
Mérida – Venezuela



**“Caracterización molecular de los pili 1 y 2 en cepas de
Streptococcus pneumoniae resistentes a los antimicrobianos,
aisladas en niños con enfermedad invasiva de Lima, Perú”**

Tutora: Dra. Beatriz Quintero Moreno

Tesista: Lcda. Vanessa Rigo

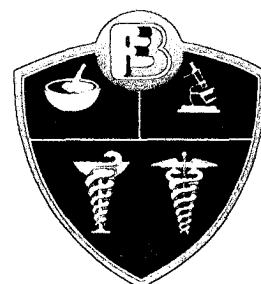
CI: 18.766.541

Mayo, 2013

QR, B2,
S78R,5



Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Departamento de Microbiología y Parasitología
Maestría en Microbiología, Mención Clínica
Mérida – Venezuela



**“Caracterización molecular de los pili 1 y 2 en cepas de
Streptococcus pneumoniae resistentes a los antimicrobianos,
aisladas en niños con enfermedad invasiva de Lima, Perú”**



TRABAJO DE GRADO. REQUISITO INDISPENSABLE PARA OPTAR AL TÍTULO DE *MAGÍSTER*
SCIENTIAE EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA



Tutora: Dra. Beatriz Quintero Moreno

Tesista: Lcda. Vanessa Rigo

CI: 18.766.541

Mayo, 2013

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso: me diste fuerzas para seguir adelante cuando creí que no podría más. Me enseñaste que todo pasa por algo y ese algo siempre es lo mejor.

A mis padres: siempre han tenido palabras de aliento, una mano que acaricia y calma, la forma sabia de hacerme saber que están y estarán allí siempre que los necesite – no matter what -. Gracias por impulsarme siempre a alcanzar las estrellas.

A mi herman“ito”: eres mi ídolo y una gran motivación. Cuando sea chiquita ¡quiero ser como tú! Siempre lucho y lucharé por ti, por darte un buen ejemplo a seguir.

A mi esposo: eres la mayor bendición que busqué y que Dios me regaló. Gracias por tu amor incondicional, incluso en la distancia. Gracias por tener paciencia. Gracias por comprender. Gracias por estar, hasta que la muerte nos separe.

A mis abuelos: sin ustedes no habría llegado hasta aquí. Siempre he querido que estén orgullosos y espero haberlo logrado. Gracias por confiar en mí. Gracias por impulsarme. Gracias por siempre hacerme sentir que vale la pena seguir.

A mis tíos y primos: directa e indirectamente han estado conmigo cada minuto. Gracias por estar siempre al tanto. Gracias por interesarse, preguntar y escuchar ¡aun sin entender de lo que hablo!

A “mi gorda” Eulimar: fuiste tú quien estuvo codo a codo, lágrima a lágrima y, sobre todo, risa a risa, cada hora de cada día, de cada semana y mes en el laboratorio. Tu compañía, guía y apoyo constante fue soporte para buscar la grandeza. Me acercaste a mí misma, a Dios, a mi familia, a mi carrera e incluso, estuviste allí cuando llegó el hombre de mi vida. Gracias mi “miga”, “mi gorda”. ¡Veremos biopelículas por siempre!

A “mamá” Beatriz Quintero: más que mi tutora, usted ha sido mi “mamá” durante este proceso: un proceso que, como bien dice, ha sido duro y arduo, pero que me ha hecho crecer y madurar de muchas maneras. Gracias por su paciencia. Gracias por sus palabras de aliento, tanto en el ámbito profesional como en el personal. Se convirtió en mi mamá científica y mi amiga. No pude pedir un mejor tutor.

A la autora: por no decaer, no desistir. Por perseguir la excelencia. Por pasar noches en vela en casa y jen el laboratorio! Por establecer mis prioridades y apegarme a ellas. Por aceptar los errores y aprender de ellos. Sobre todo, ¡por haberlo logrado!

AGRADECIMIENTOS

Además de las personas a quienes está dedicado este trabajo, quisiera agradecer a:

Universidad de Los Andes: por abrirme una ventana al conocimiento. Gracias por ser mi segunda casa de estudios y darme la dicha de ser otra profesional egresada de esta ilustre universidad.

Grupo Peruano de Investigación de Neumococos: por suministrar la herramienta principal de este trabajo, las cepas de Streptococcus pneumoniae objetivo de estudio. Sin su contribución, este trabajo no habría sido posible.

Dra. María del Carmen Araque: por abrirme las puertas del laboratorio de Biología Molecular. Gracias por tomarse el tiempo para hacer revisiones exhaustivas de los trabajos y, más que corregir, enseñar con pasión.

Dra. Benibelks Albarrán: por su guía, apoyo y soporte durante todo este proceso. Aprendí mucho de usted.

MSc. Beatriz Millán: por diferenciar el trabajo de la amistad. Gracias por hacerme buscar la excelencia.

A todos, de corazón,

¡GRACIAS!

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice de figuras	vii
Índice de tablas	viii
Índice de gráficos.....	ix
Índice de anexos	x
Resumen	1
CAPÍTULO 1: El Problema de investigación	2
1.1. Planteamiento del problema.....	2
1.2. Formulación del problema	5
1.3. Objetivos.....	6
CAPÍTULO 2: Antecedentes de la investigación.....	7
2.1. Generalidades.....	7
2.2. Constitución genética y factores de virulencia	8
2.3. Islas de patogenicidad	18
2.4. Los pili en <i>S. pneumoniae</i>	19
2.4.1. Pilus tipo 1	22
2.4.2. Pilus tipo 2	29
2.5. Relación entre los pili tipo 1 y 2 y las vacunas.....	37
2.6. Antecedentes de la hipótesis	39
2.6.1. Distribución del pilus tipo 1 según serotipos y la resistencia antimicrobiana.....	40

	Página
2.6.2. Distribución del pilus tipo 2 según serotipos y la resistencia antimicrobiana.....	45
2.7. Hipótesis	48
CAPÍTULO 3: Marco metodológico	49
Resultados.....	56
Discusión	66
Conclusiones.....	70
Recomendaciones	71
Anexos	72
Referencias Bibliográficas.....	75

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación circular del genoma de <i>S. pneumoniae</i> TIGR4.....	10
Figura 2. Factores de virulencia en la superficie de <i>S. pneumoniae</i>	11
Figura 3. Representación lineal de la ubicación de la isla de patogenicidad 1 en el genoma de la cepa TIGR4 de <i>S. pneumoniae</i>	20
Figura 4. Representación lineal de la ubicación de la isla de patogenicidad 2 en el genoma de la cepa INV104 de <i>S. pneumoniae</i>	21
Figura 5. Isla de patogenicidad 1 de <i>S. pneumoniae</i>	25
Figura 6. Microscopía inmuno-electrónica del pilus tipo 1.....	26
Figura 7. Estructura del pilus tipo 1.....	27
Figura 8. Microscopía electrónica inmunogold del pilus tipo 2.....	31
Figura 9. Comparación genómica de las islas de patogenicidad 1 y 2 de <i>S. pneumoniae</i>	34
Figura 10. Modelo de la estructura del pilus tipo 2 de <i>S. pneumoniae</i>	36

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados por Basset y col., (2007) en la detección de los genes que conforman el pilus de tipo 1	30
Tabla 2. Oligonucleótidos usados por Bagnoli y col., (2008) para la detección de la isla de patogenicidad 2 de <i>S. pneumoniae</i>	33
Tabla 3. Lista de oligonucleótidos utilizados para la detección del gen <i>lytA</i> , y de los pili tipo 1 y 2	53
Tabla 4. Mezcla de reactivos utilizados para la detección del gen <i>lytA</i> y de los pili tipo 1 y 2.	54
Tabla 5. Condiciones de amplificación para la detección del gen <i>lytA</i> y de los pili tipo 1 y 2.	54
Tabla 6. Distribución de cepas de <i>S. pneumoniae</i> según el tipo de enfermedad invasiva.....	56
Tabla 7. Distribución de serotipos capsulares entre las cepas de <i>S. pneumoniae</i> causantes de enfermedad invasiva	57
Tabla 8. Frecuencia de resistencia a los antimicrobianos en cepas de <i>S. pneumoniae</i> causantes de enfermedad invasiva	58
Tabla 9. Distribución de los genes <i>rrgC</i> y <i>srtC-3</i> codificantes del pilus tipo 1 de acuerdo a los serotipos capsulares.....	61
Tabla 10. Distribución del pilus tipo 2 de acuerdo a los serotipos capsulares.	64

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1. Presencia de los genes <i>rrgC</i> y <i>srtC-3</i> , codificantes del pilus tipo 1, en cepas de <i>S. pneumoniae</i> causantes de enfermedad invasiva.....	59
Gráfico 2. Presencia del pilus tipo 1 en cepas de <i>S. pneumoniae</i> según el tipo de enfermedad invasiva	60
Gráfico 3. Presencia del pilus tipo 1 en cepas de <i>S. pneumoniae</i> en serotipos vacunales y no vacunales.....	61
Gráfico 4. Presencia del pilus tipo 1 en cepas de <i>S. pneumoniae</i> susceptibles y resistentes a los antimicrobianos.	62
Gráfico 5. Presencia del pilus tipo 2 en cepas de <i>S. pneumoniae</i> según el tipo de enfermedad invasiva.	63
Gráfico 6. Presencia del pilus tipo 2 en cepas de <i>S. pneumoniae</i> en serotipos vacunales y no vacunales.....	64
Gráfico 7. Presencia del pilus tipo 2 en cepas de <i>S. pneumoniae</i> en cepas resistentes y sensibles según el antimicrobiano.....	65

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Preparación del gel de agarosa al 1%	72
Anexo 2. Preparación de la solución Tris Acetato EDTA (TAE)	73
Anexo 3. Preparación del buffer de carga (3X) y carga de los amplificados en el gel.	74

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

La diseminación de cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a los antimicrobianos y el reducido impacto de las vacunas polisacárido-conjugadas, ha dificultado el tratamiento y prevención de las infecciones neumocócicas invasivas. Los pili 1 y 2 intervienen en la virulencia de *S. pneumoniae* y el tipo 1, en especial, se considera un posible blanco para el diseño de vacunas. Sin embargo, la escasa información acerca de la distribución de los pili en cepas de *S. pneumoniae* a nivel global, dificulta predecir la cobertura real de una vacuna basada en el pilus tipo 1. Por tal motivo, se detectaron los pili 1 y 2, mediante la amplificación por PCR de los genes *rrgC* y *srtC-3*, y un segmento de la isla de patogenicidad 2, en 41 cepas de *S. pneumoniae* resistentes a los antimicrobianos aisladas en niños ≤ 10 años con enfermedad invasiva de Lima, Perú durante el lapso 2006– 2008. Las cepas con pilus 1 (51%) se distribuyeron de manera similar entre serotipos vacunales y no vacunales ($p=1,000$). La presencia del pilus 2 (17%), se asoció significativamente a los serotipos no vacunales (50%; $p=0,047$). En general, los pili 1 y 2 fueron más frecuentes en cepas resistentes a los antimicrobianos. La presencia de pilus 2 se asoció significativamente con la resistencia a la clindamicina ($p=0,035$). En algunas cepas piliadas no se detectaron los genes *rrgC* o *srtC-3*, sugiriendo posibles variaciones en las secuencias de estos genes. Estos resultados proponen que la detección combinada de ambos genes favorecería el reconocimiento de variantes genéticas de la isla de patogenicidad 1 y la pesquisa del pilus 1 en estudios epidemiológicos. Finalmente, consideramos que en los niños peruanos el uso de una vacuna anti-neumocócica a la que se adicione proteínas del pilus 1, podría reducir las infecciones invasivas incluyendo las producidas por cepas resistentes y con serotipos no vacunales.

PALABRAS CLAVE: *Streptococcus pneumoniae*, pilus tipo 1, pilus tipo 2, infecciones neumocócicas, serotipos, resistencia antimicrobiana.

CAPÍTULO 1: EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Streptococcus pneumoniae, también conocido como neumococo, es el agente etiológico que posee una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. Es la causa principal de la neumonía adquirida en la comunidad, la otitis media aguda e infecciones invasivas tales como la meningitis, sepsis y las neumonías asociadas a bacteriemias en niños (Vesga y Cortés L., 2006; Romero Cabello, 2007; Weiser, 2010).

A nivel mundial se ha estimado que *S. pneumoniae* causa 1,2 millones de muertes anuales por neumonía y que el 40% de esas muertes afectan a menores de 5 años de edad (Obaro y Adegbola, 2002). Cada año *S. pneumoniae* causa 70.000 muertes por meningitis y un número similar de muertes por sepsis y otras infecciones en niños pequeños en países con recursos limitados, como Venezuela y Perú (Obaro y Adegbola, 2002). La neumonía y la meningitis neumocócicas tienen una alta tasa de letalidad de aproximadamente 20 y 50%, respectivamente (Bogaert y col., 2004). Para el año 2009, se estima que en Latinoamérica *S. pneumoniae* causó entre 980.000 a 1.500.000 casos de neumonía y entre 2.600 a 6.800 casos de meningitis, y que en la región fallecieron entre 12.000 a 28.000 personas por alguna infección neumocócica (Valenzuela y col., 2009).

Para el año 2007, la neumonía ocupó el noveno lugar entre las causas de mortalidad en Venezuela, siendo responsable de 3.044 muertes. Estas cifras se traducen en la muerte de un paciente por neumonía cada 3 horas (Ministerio del Poder Popular para la Salud, 2009; OMS, 2010). En Perú, se ha observado una tasa de mortalidad por neumonías más elevada que la observada en Venezuela. Así para el año 2008, la tasa de mortalidad en niños menores de 5 años en Perú fue del 15%, un 5% mayor que el registrado en Venezuela para el mismo año (OMS, 2010). Con respecto a las enfermedades neumocócicas invasivas, la media anual

estimada para niños menores de 24 meses fue de 18.4/100,000 sólo en la ciudad de Lima, mientras que la misma en niños menores de 60 meses fue de 7,7/100,000 (Ochoa y col., 2010).

En las últimas tres décadas, la resistencia *in vitro* de *S. pneumoniae* a los agentes antimicrobianos ha aumentado dramáticamente alrededor del mundo lo que ha complicado el tratamiento de las infecciones neumocócicas y, ha destacado la importancia de la prevención de las mismas (Lynch y Zhanel., 2009). Por el momento, la prevención de las infecciones neumocócicas en el grupo etario más afectado, los niños menores de 2 años, se realiza mediante la vacunación con proteínas polisacárido conjugadas que incluyen un número muy reducido de serotipos neumocócicos de entre 7 y 13 (Gorrotxategui Gorrotxategui e Iturrioz Mata, 2010).

No obstante, las vacunas neumocócicas conjugadas han mostrado ser una solución parcial y temporal para disminuir la incidencia de las infecciones y la resistencia antimicrobiana en *S. pneumoniae*. Esto se debe en gran medida a que, en algunas regiones geográficas, luego de la introducción de la vacuna conjugada heptavalente, se ha observado un reemplazo de los serotipos incluidos en las formulaciones vacunales conjugadas por cepas igualmente virulentas y/o resistentes como agentes causales de las infecciones neumocócicas. Este fenómeno ha llevado a que, en los últimos años, las investigaciones se hayan dirigido al desarrollo de vacunas más efectivas basadas en otros componentes celulares diferentes a la cápsula neumocócica (Pelton y col., 2007; Henriques-Normark y col., 2008; Huang y col. 2009).

Recientemente, se ha descubierto la presencia de dos tipos diferentes de pili en *S. pneumoniae*, los cuales no están presentes en todas las cepas. El primer tipo de pilus es codificado por los genes para las proteínas estructurales *rrgA*, *B*, y *C*, para las sortasas *srtC-1*, *2*, y *3* y un regulador el *rtrA* (Aguiar y col., 2008). Al parecer, las cepas de *S. pneumoniae* que presentan pilus de tipo 1 tienen mayor facilidad para adherirse a las células epiteliales, colonizar y causar enfermedad invasiva en ratones, en comparación con las cepas no piliadas (Barocchi y col., 2006). Además, el pilus tipo 1 estimula de manera eficiente la respuesta inflamatoria por lo que ha sido considerado como candidato para la formulación de vacunas neumocócicas (Gianfaldoni y col., 2007; Harfouche y col, 2011). Un segundo tipo de pilus,

del cual se conoce menos acerca de su potencial patogénico y distribución epidemiológica, esta codificado por la isla de patogenicidad 2. Experimentos *in vitro* con células respiratorias humanas han proporcionado evidencia de que el pilus de tipo 2 está involucrado en la adhesión de *S. pneumoniae* a las células del tracto respiratorio (Bagnoli y col., 2008).

Las investigaciones destinadas a conocer la distribución de los pili en cepas de neumococos han sido limitadas debido a los costos relacionados con la microscopía electrónica. Sin embargo, algunos estudios epidemiológicos que han utilizado la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, como siglas derivadas del inglés *Polimerase Chain Reaction*) para la detección de algunos genes ubicados dentro de las islas de patogenicidad 1 y 2, han mostrado ser sensibles y específicos para detectar la presencia de los pili en *S. pneumoniae*. Esos estudios han revelado que los pili son una característica variable pero frecuente entre cepas de neumococos con gran potencial patogénico y de resistencia, lo que sugieren que el uso de una vacuna basada en los pili podría reducir la incidencia de enfermedad neumocócica y de resistencia a los antimicrobianos (Basset y col., 2007; Bagnoli y col., 2008).

De la misma manera en que la distribución de los serotipos y la resistencia en neumococo varía geográficamente, la distribución de cepas piliadas parece variar entre los diversos serotipos y cepas resistentes. Actualmente, no se dispone de datos relacionados con la frecuencia y distribución de pili en cepas causantes de enfermedad neumocócica en niños latinoamericanos. Este hecho tiene gran relevancia debido a que el verdadero potencial de cobertura de una vacuna neumocócica basada en pili y su influencia sobre la reducción de la resistencia, solo puede establecerse conociendo ampliamente la distribución de las cepas piliadas entre los diversos serotipos y cepas resistentes causantes de enfermedad en cada región geográfica.

Por esta razón, en este estudio se planteó detectar los genes *rrgC* y *srtC-3* codificantes del pilus tipo 1, la isla de patogenicidad 2 indicativa de la presencia del pilus tipo 2 y determinar su distribución en cepas de *S. pneumoniae* resistentes a los antimicrobianos aisladas de niños con enfermedad invasiva de Lima, Perú, durante el lapso 2006 – 2008.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

En la colección de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a los antimicrobianos aisladas de niños con enfermedad invasiva de Lima, Perú, durante el lapso 2006- 2008 se formularon los siguientes problemas:

1. ¿Estaban presentes los genes *rrgC* y *srtC-3* codificantes del pilus tipo 1 y la isla de patogenicidad 2 indicativa de la presencia del pilus tipo 2?
2. ¿Cuál fue la distribución de los genes *rrgC* y *srtC-3* codificantes del pilus tipo 1 y la isla de patogenicidad 2 indicativa de la presencia del pilus tipo 2, según el tipo de enfermedad, los serotipos capsulares y la resistencia a los antimicrobianos?

www.bdigital.ula.ve

1.3. OBJETIVOS

Objetivo general

1. Caracterizar molecularmente los pili 1 y 2, mediante la amplificación de los genes de las islas de patogenicidad 1 y 2, en cepas de *S. pneumoniae* resistentes a los antimicrobianos aisladas en niños con enfermedad invasiva de Lima, Perú durante el lapso 2006– 2008.

Objetivos específicos

1. Determinar molecularmente la presencia del pilus tipo 1 mediante la amplificación por PCR de los genes *rrgC* y *srtC-3* de la isla de patogenicidad 1 en las cepas de estudio.
2. Detectar molecularmente la presencia del pilus tipo 2 a través de la amplificación por PCR de un segmento interno de la isla de patogenicidad 2 en las cepas de estudio.
3. Conocer la distribución de los pili 1 y 2 según el tipo de enfermedad invasiva meningea y no meningea en las cepas de estudio.
4. Establecer la distribución de los pili 1 y 2 según los serotipos vacunales y no vacunales heptavalentes en las cepas de estudio.
5. Establecer la distribución de los pili 1 y 2 en cepas con resistencia a penicilina, ceftriaxona, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina y trimetoprim/sulfametoxazol en las cepas de estudio.

CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. GENERALIDADES

S. pneumoniae ha sido uno de los microorganismos más estudiados desde que Sternberg y Pasteur, en 1881, obtuvieron información de invaluable aporte a la ciencia basando su investigación en los datos obtenidos con esta bacteria (Romero Cabello, 2007). Así, por ejemplo, está el descubrimiento del ADN como portador del material genético por Avery, McLeod y McCarthy en 1944, apoyado en los estudios de Griffith en 1928 (Romero Cabello, 2007). De igual forma, *S. pneumoniae* fue objeto de estudios sobre el efecto terapéutico de la penicilina, el papel de la cápsula en la inhibición de la fagocitosis, la producción de anticuerpos por el polisacárido y la utilización del mismo para la producción de vacunas, entre muchos otros experimentos (AlonsoDeVelasco y col., 1995).

S. pneumoniae pertenece a la familia *Streptococcaceae* y el género *Streptococcus*, conformado por un grupo de cocos grampositivos, catalasa y citocromo-oxidasa negativos (Organización Panamericana de la Salud, 2004). *S. pneumoniae* es un diplococo lanceolado, que crece en pares o en cadenas cortas. Su tamaño varía de 0,7 a 1,4 micras, es inmóvil y capaz de formar una cápsula de gran espesor si las condiciones son favorables. No posee flagelos ni produce esporas y es anaerobio facultativo (Romero Cabello, 2007; Mandell y col., 2010). Es un microorganismo exigente para su cultivo *in vitro* ya que requiere de medios con sangre y condiciones de microaerofilia para su crecimiento (Organización Panamericana de la Salud, 2004).

La morfología colonial de *S. pneumoniae* en agar sangre puede variar, dependiendo de la presencia o ausencia de cápsula. Las colonias capsuladas tienen mayor tamaño y una apariencia mucosa, mientras que las cepas no capsuladas son más pequeñas, aplanadas y secas. Indiferentemente de la presencia o no de cápsula, todas las colonias son grisáceas o

blanquecinas, miden de 0,5 a 2 mm de diámetro, son α -hemolíticas y se autolisan con el paso del tiempo, lo que crea un hoyuelo en el centro de la colonia que es característico de las cepas de *S. pneumoniae* cuando crecen en agar suplementado con 5% sangre de carnero (Murray y col., 2009).

En el laboratorio, estos microorganismos se identifican siguiendo cuatro pruebas básicas: (i) α -hemólisis en agar sangre; (ii) negatividad en la prueba de la catalasa; (iii) susceptibilidad a la optoquina y (iv) solubilidad en las sales biliares. Como prueba alterna, se puede utilizar la detección por PCR del gen *lytA* que codifica para la autolisina que poseen todos los *S. pneumoniae*. La presencia de este gen confirma, a nivel molecular, la identificación de la especie (Mandell y col., 2010).

El neumococo, a pesar de ser un comensal habitual de la nasofaringe humana, también puede convertirse en un patógeno oportunista que afecta, principalmente, a los niños menores de dos años y a los adultos mayores de 65 años. Para poder sobrevivir durante la permanencia en el hospedero, *S. pneumoniae* debe poseer mecanismos de adaptación que incluyan factores de adherencia y colonización. Se considera que estos factores están ligados a la capacidad de virulencia del microorganismo puesto que la colonización es el primer paso para que se desarrolle una enfermedad neumocócica (Tuomanen y col., 1995; Weiser, 2010).

2.2. CONSTITUCIÓN GENÉTICA Y FACTORES DE VIRULENCIA

El genoma de *S. pneumoniae* está constituido por un cromosoma circular de 2.160.837 pares de bases (pb) que consta de una composición G + C de 39.7% (Tettelin y col., 2001) y con 2302 genes identificados hasta la fecha (National Center for Biotechnology Information). En este genoma se ubican los genes encargados de permitir la expresión de proteínas necesarias para la supervivencia del microorganismo.

El avance de la tecnología ha permitido descifrar el genoma de varias cepas de *S. pneumoniae*, entre ellas se ubican las cepas TIGR4, D39 y R6. La cepa TIGR4 es una cepa invasiva serotipo 4, la cepa D39 es de serotipo 2 y la cepa R6 es un derivado no capsulado y no virulento de la cepa D39. Las cepas TIGR4 y D39 son virulentas y generan enfermedad invasiva al ser inoculadas por vía intranasal en distintas cepas de ratones. Por otro lado, las cepas TIGR4 y R6 divergen en su composición genética con una variabilidad del 10% de sus genes (Albiger y col., 2008).

La diversidad genética de *S. pneumoniae* ha sido confirmada mediante análisis de microarreglos e hibridación genómica comparativa. De hecho, existe entre un 8% - 10% de diversidad entre los genomas de distintas cepas en comparación con el genoma de la cepa TIGR4 (Albiger y col., 2008). Gran parte de esta diversidad se organiza en regiones de diversidad (RD). Hasta el año 2008 se habían identificado 25 RD en distintos genomas de aislados clínicos al compararse con la cepa TIGR4 (Figura 1) (Albiger y col., 2008).

Son muchos los factores de virulencia descritos en *S. pneumoniae*. Dependiendo de la función que ejercen, algunos factores se ubican en la capa más externa del microorganismo formando estructuras, mientras que otros se liberan de la célula neumocócica. Estos factores facilitan la colonización del hospedero y el desarrollo de la posterior enfermedad. A continuación se pueden observar, de manera gráfica, algunas de los factores de virulencia de *S. pneumoniae* (Figura 2).

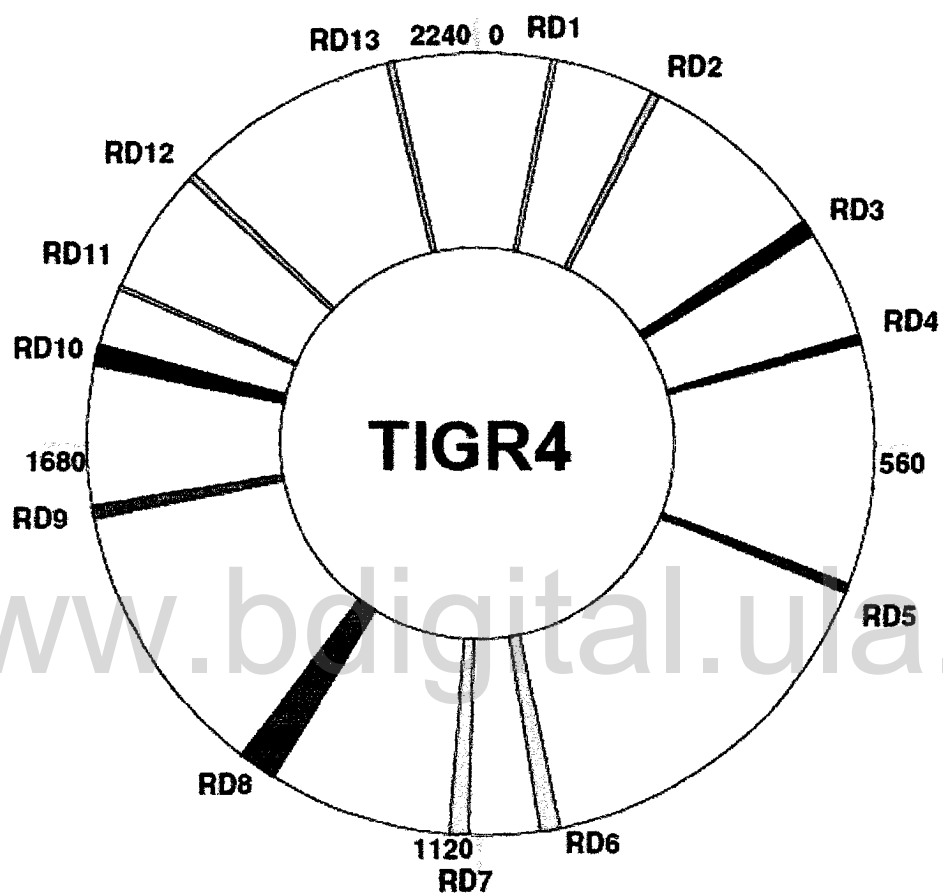


Figura 1. Representación circular del genoma de *S. pneumoniae* TIGR4.

El genoma de la cepa TIGR4 posee 2.236 marcos de lectura abierta. Mediante hibridación genómica comparativa, se han identificado 13 regiones de diversidad (RD) entre las cepas TIGR4 y r6. Estas RD se representan en la figura (tomado de Albiger y col., 2008).

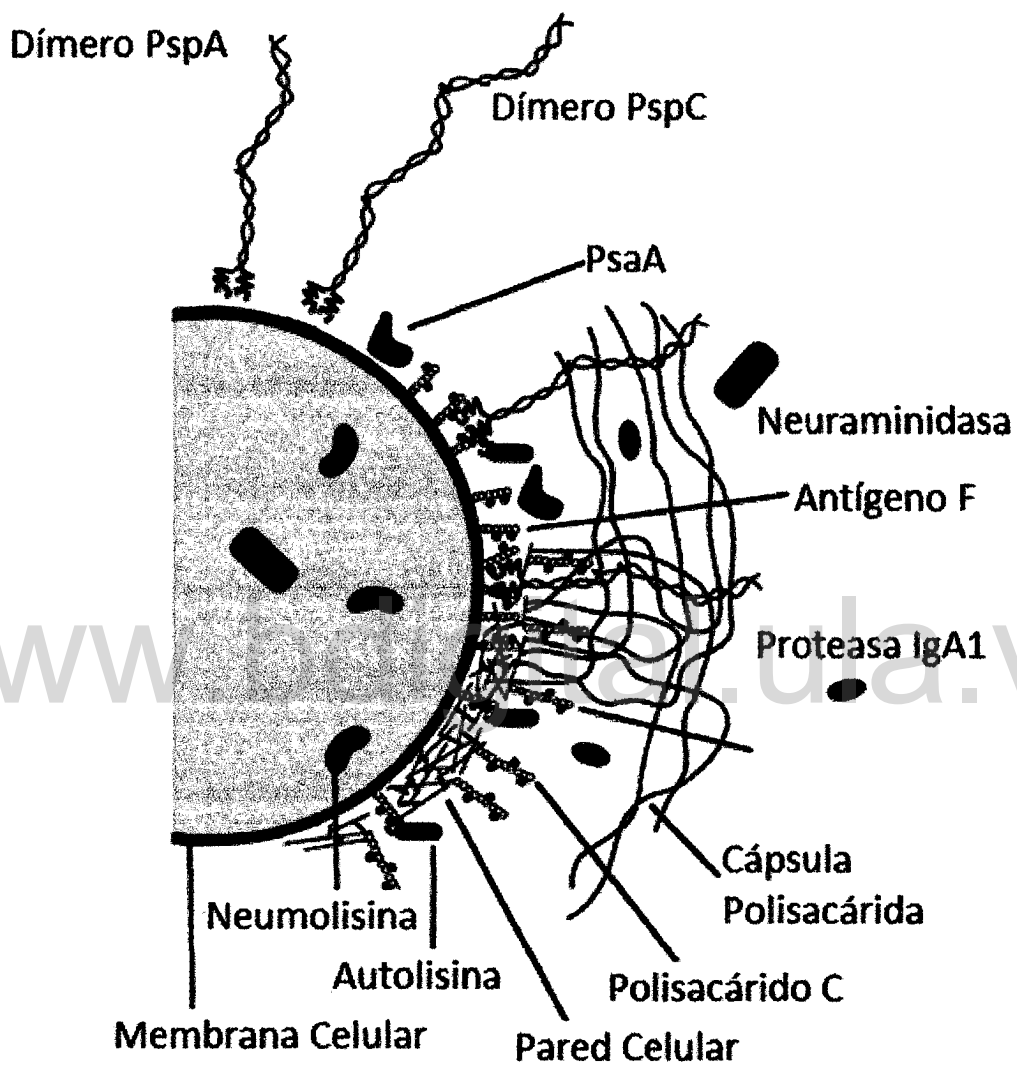


Figura 2. Factores de virulencia en la superficie de *S. pneumoniae*.

(Modificado de Melin, 2011)

La cápsula

S. pneumoniae puede crear una cápsula de gran espesor cuando se dan las condiciones ambientales apropiadas, lo que corresponde a su mayor factor de virulencia. La cápsula consiste de polímeros largos de alto peso molecular hechos a partir de unidades repetidas de oligosacáridos, comprendidos por 2 a 8 monosacáridos como la glucosa, galactosa, ramnosa, glucosamina, entre otras. Este polisacárido capsular rodea por completo a la célula bacteriana y le confiere un valor significativo en la virulencia, puesto que posee capacidad antifagocítica, previene la eliminación de las mucosas, reduce la exposición a los antibióticos y limita la autólisis (Miyashita, 2012). Estas características le permiten al microorganismo evadir la respuesta del sistema inmune y multiplicarse en los tejidos del hospedero (Romero Cabello, 2007; Winn y col., 2008). De hecho, se ha comprobado que las cepas capsuladas son aproximadamente 10^5 veces más virulentas que las no capsuladas (Prado Marugán, 2008) y éstas últimas raramente causan enfermedades invasivas en humanos, además que pueden atenuarse en modelos animales de enfermedad (Brueggemann y col., 2003).

La composición y forma en la que los monosacáridos (azúcares) se unen para formar el polisacárido capsular ha permitido la diferenciación y clasificación de al menos 94 tipos capsulares, denominados serotipos (Wyres y col., 2012). La técnica utilizada con mayor frecuencia para serotipificar los aislados de *S. pneumoniae* se denomina Reacción de Quellung y se basa, específicamente, en las diferencias inmunoquímicas entre los polisacáridos capsulares expresados por cepas diferentes (Hanage y col., 2005). La reactividad de los distintos polisacáridos se reconoce con un suero específico para los distintos serotipos (Aanensen y col., 2007). Existen dos sistemas de nomenclatura: el sistema americano asigna serotipos siguiendo una secuencia de números, que van desde el 1 hasta 94 que son los que existen hoy en día. El sistema danés agrupa los serotipos en serogrupos en base a su similitud antigénica. Como ejemplo, en el sistema americano los serotipos 19, 57, 58 y 59 son conocidos como integrantes del serogrupo 19 del sistema danés y se identifican como serotipos 19F, 19A, 19B y 19C, respectivamente (Musher, 1992). Este último sistema es el más utilizado actualmente.

La pared celular

La pared celular de *S. pneumoniae* está compuesta por una estructura de peptidoglicano de tres capas, que fija el polisacárido capsular, el polisacárido de la pared celular y otras proteínas (AlonsoDeVelasco y col., 1995). El peptidoglicano está formado por una serie de cadenas de glicano que alternan entre los ácidos residuales *N*-acetilglucosamina y *N*-acetilmurámico, unidos entre sí a través de cadenas enlaces glucosídicos y entre capas por oligopéptidos que poseen la alanina unida al ácido *N*-acetilmurámico como primer residuo (AlonsoDeVelasco y col., 1995).

Los neumococos tienen tanto ácidos teicoicos como ácidos lipoteicoicos en su pared celular. Los ácidos teicoicos, también conocidos como polisacárido C, están unidos covalentemente, mediante enlaces fosfodiéster, al peptidoglicano de la pared celular. Los ácidos lipoteicoicos o antígeno F, están unidos a la membrana celular y provocan una respuesta inmune inflamatoria en el hospedero (Ries, 2007). Independientemente del serotipo neumocócico, todas las cepas conocidas de *S. pneumoniae* tienen ambos antígenos y éstas moléculas sirven para la unión de muchas de las proteínas de la pared celular (Ries, 2007; Winn y col., 2008).

Existen productos celulares de *S. pneumoniae* que le confieren protección ante la respuesta inmune del hospedero y a su vez median los procesos de adherencia a otras células o superficies. A continuación se describen algunas estructuras externas relacionadas con la virulencia del microorganismo (Boulnois, 1992; AlonsoDeVelasco y col., 1995; Winn y col., 2008; Orihuela, 2008):

Autolisina (lytA) y el antígeno de Forssman (antígeno F)

El ácido *N*-acetilmurámico-L-alanina amidasa o autolisina, codificada por el gen *lytA*, es una enzima que hidroliza el enlace entre la alanina y el ácido *N*-acetilmurámico del peptidoglicano. Su sitio de acción se encuentra en los residuos de fosforilcolina del polisacárido de la pared celular. La autolisina promueve la liberación de otros factores como la

neumolisina y la neuraminidasa, ubicados en el citoplasma, al inducir la lisis del neumococo en determinadas condiciones. Principalmente, funciona en conjunto con la enzima glucosidasa para separar las células durante la división celular (Winn y col., 2008). De igual manera, la autolisina se segrega en la fase estacionaria de crecimiento, por lo que todas las cepas de *S. pneumoniae* poseen y expresan el gen *lytA* (Boulnois, 1992).

Durante la fase estacionaria, los neumococos también segregan el antígeno de Forssman. Este antígeno es un ácido lipoteicoico insertado en la membrana plasmática a través de su porción lipídica y también contiene fosforilcolina (AlonsoDeVelasco, 1995). Este antígeno es un potente inhibidor de la autolisina que interactúa con la enzima a través de sus residuos de fosforilcolina. A pesar de su importancia, estudios sugieren que la inmunización de ratones con este antígeno no los protege de una infección por *S. pneumoniae* (AlonsoDeVelasco, 1995).

Neumolisina

La neumolisina es una proteína intracelular que interactúa con el colesterol en las membranas celulares del hospedero y forma poros que lisan estas células (Winn y col., 2008). Este factor causa la coloración verdosa característica de *S. pneumoniae* en los medios de cultivo que contienen sangre (Romero Cabello, 2007).

La neumolisina es capaz de inhibir el sistema de defensa del cuerpo mediante diversos mecanismos. Uno de los mecanismos consiste en inhabilitar el movimiento ciliar en el epitelio del tracto respiratorio humano, lo que afecta directamente el sistema de defensa del hospedero. Esto permite el avance del microorganismo al tracto respiratorio inferior. Otra de las formas de evasión se basa en inhibir la actividad bactericida de los neutrófilos al reducir la fagocitosis. Además, la neumolisina liberada activa la acción del complemento y esto lo mantiene alejado de la superficie bacteriana (Melin, 2011).

Proteína de superficie A (PspA)

Esta proteína de superficie está en casi todos los aislados clínicos de *S. pneumoniae* (Bergmann y Hammerschmidt, 2006) y su estructura es única en comparación con otros microorganismos grampositivos (Boulnois, 1992). La PspA juega un papel importante en la adquisición de hierro por *S. pneumoniae*, ya que actúa como receptor específico de la lactoferrina a través de su terminal N (Gillespie y Balakrishnan, 2000). La lactoferrina es una proteína de defensa no específica y es liberada por los neutrófilos. La forma con hierro reducido de esta molécula, llamada apolactoferrina, es importante en el sistema inmune innato del hospedero puesto que tiene propiedades bacteriostáticas y bactericidas (Rodríguez-Franco y col., 2005). Al unirse la apolactoferrina al PspA se inhibe el efecto bactericida de la molécula (Bergmann y Hammerschmidt, 2006).

Estudios realizados han demostrado que al inactivar el gen *pspA* se logra atenuar la virulencia de *S. pneumoniae* incluso hasta hacerlos avirulentos. Además, la inmunización pasiva con anticuerpos monoclonales y policlonales contra la proteína PspA recombinante de un serotipo de neumococo puede conferir protección a ratones que han sido inoculados con diferentes serotipos de *S. pneumoniae*. Esto supone que la protección se debe a que distintos serotipos de *S. pneumoniae* comparten epítopes comunes de PspA (Melin, 2011). Por esta razón, esta proteína puede también considerarse como un blanco para la producción de vacunas.

Neuraminidasa

La neuraminidasa es una enzima que facilita la adherencia de *S. pneumoniae* a las células epiteliales del hospedero al romper el enlace entre el ácido siálico de los glicolípidos, glicoproteínas y oligosacáridos del hospedero. Este proceso daña el tejido del hospedero y expone los receptores para las adhesinas neumocócicas (Bergmann y Hammerschmidt, 2006).

Hialuronidasa (Hyl)

La hialuronidasa es una enzima que despolimeriza el ácido hialurónico de la matriz extracelular. El ácido hialurónico forma parte importante de las barreras polisacáridas protectoras. Al desintegrar este polisacárido viscoso, *S. pneumoniae* aumenta su potencial invasivo y se ve favorecida su propagación por los tejidos del hospedero (Boulnois, 1992).

Proteasa IgA1 (Iga)

La proteasa IgA1 es específica para la inmunoglobulina humana A1 (IgA1) que ocupa más del 90% de la vía respiratoria del humano. Esta proteasa facilita la adherencia del neumococo a las células epiteliales en modelos de colonización, ya que limita la efectividad de la respuesta humoral del hospedero (Melin y col., 2011). Debido a la acción de la proteasa IgA1, *S. pneumoniae* puede ser eliminado por anticuerpos únicamente luego de que otras clases y subclases de inmunoglobulinas se acumulan en suficientes cantidades (Kadioglu y col., 2008).

Fosforilcolina (ChoP)

La fosforilcolina es un componente de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos que se extienden de la pared celular y de la membrana de la bacteria (Cundell y col., 1995). Muchos patógenos del tracto respiratorio expresan esta adhesina en su superficie. Ésta es usada para adherirse al receptor del factor activador de plaquetas (PAFr) en las células pulmonares del hospedero para ser internalizado (Cundell y col., 1995). Como mecanismos de defensa, el individuo puede desarrollar anticuerpos contra la fosforilcolina. Éstos, en conjunto con la proteína C-reactiva, se unen a la fosforilcolina en el tracto respiratorio superior del hospedero evitando la adherencia del microorganismo a las células. De esta manera se previene la infección (Gould y Weiser, 2002).

Proteínas de Adhesión a la Colina (CBPs)

Éstas son proteínas de adhesión asociadas a la pared celular. Se unen a la fosforilcolina de manera no-covalente a través de dominios de adhesión a la colina ubicados en el segmento C-terminal de las proteínas. De esta manera, la porción efectora queda hacia afuera de la bacteria, lo que le permite estar libre para interactuar. La CBPs que ha mostrado mayor importancia en la adhesión de *S. pneumoniae* a las células hospedero es la proteína de Adhesión a la Colina A (PspC), también conocida como CbpA o SpsA (Orihuela, 2008).

La proteína PspC es capaz de unirse al receptor polimérico de inmunoglobulinas (pIgR) en el tracto respiratorio superior (Zhang y col., 2000). Estudios realizados por Orihuela y col., (2004) han mostrado que la eliminación del PspC disminuye la habilidad de la bacteria de establecer una infección del tracto respiratorio inferior. La unión con las células del hospedador bloquea los residuos de colina de la pared celular evitando el ataque de estos por citoquinas humanas activadas y evadiendo así la fagocitosis (Prado Marugán, 2008).

Adhesinas con secuencia motivo LPxTG

Las secuencias motivo LPxTG retienen los polipéptidos unidos a la membrana celular con la ayuda de una proteína de membrana llamada Sortasa. Esta proteína, cataliza la formación de uniones entre las intersubunidades de los isopéptidos (Liddington, 2010). El mecanismo por el cual trabaja la secuencia motivo LPxTG consta en la unión de las proteínas de superficie de la pared celular del neumococo a la membrana celular del hospedero. Esta secuencia consta de Leucina-Prolina-X-Threonina-Glicina, donde X es cualquier aminoácido. La LPxTG está seguida de un dominio hidrofóbico de cerca de 20 aminoácidos y una cola de aminoácidos cargados positivamente (Cossart y Jonquieres, 2000).

2.3. ISLAS DE PATOGENICIDAD

Las bacterias tienden a adaptarse rápidamente a nuevos ambientes mediante cambios genómicos que abarcan la pérdida o adquisición de genes. Estas modificaciones afectan radicalmente la forma en la que los microorganismos viven y evolucionan. La adquisición y pérdida de genes constituye una de las primeras formas por las cuales las poblaciones bacterianas divergen y forman especies distintas. La capacidad de cambio está determinada por la plasticidad del genoma, el grado de expresión genotípica y la presión selectiva generada por el ambiente (Hacker y Carniel, 2001). Algunos de los mecanismos de transmisión de genes en *S. pneumoniae* incluyen la transformación, la adquisición de genes de virulencia mediante recombinación homóloga o transposones y las islas genómicas (Schmidt y Hensel, 2004).

Los bloques de ADN con elementos genéticos móviles que pueden transferirse de un microorganismo a otro son denominados Islas Genómicas. Las islas genómicas que poseen la función de aumentar la salud bacteriana, directa o indirectamente, son llamadas islas saludables. Estas islas pueden dividirse en diversos subtipos: islas ecológicas, islas saprofíticas, islas simbióticas y las islas de patogenicidad (PAI o PI, por sus siglas en inglés) (Hacker y Carniel, 2001).

Las islas de patogenicidad son las mejor conocidas hasta ahora. Estas PI contienen agrupamiento de genes de virulencia cuyos productos contribuyen con la patogenicidad de la bacteria que los posee. En el caso de *S. pneumoniae*, este microorganismo posee dos islas de patogenicidad que codifican para dos tipos de pili, denominados “pilus tipo 1” y “pilus tipo 2”. Una isla de patogenicidad denominada 1 (también conocida como isla de patogenicidad *rhlA* o PI-1) de 14 kb, contiene los genes codificantes del pilus tipo 1 (Barocchi y col., 2006; Basset y col., 2007), mientras que la isla de patogenicidad 2 (PI-2) que mide de 6 a 7 kb, codifica para el pilus tipo 2 (Bagnoli y col., 2008; Zahner y col., 2010).

Albiger y col., (2008) señalan la ubicación de la isla de patogenicidad 1, que codifica para el pilus tipo 1, en la región de diversidad 4 (RD4) entre los marcos de lectura abierta SP0460 –

SP0469 en las cepas TIGR4 (Figura 3). La isla de patogenicidad 2, que codifica para el pilus de tipo 2, se ubica entre los marcos de lectura abierta INV104_086070 - INV104_08740 de las cepas INV104 (Figura 4) (National Center for Biotechnology Information).

2.4. LOS PILI EN *S. pneumoniae*

Entre las estructuras externas a la pared celular se encuentra las fimbrias o pili. Los pili son organelos alargados que se extienden a través de la cápsula polisacárida. Ton-That y Schneewind en el 2003, fueron los primeros en sugerir que la formación del pilus en grampositivos podría estar relacionada a un mecanismo en el cual se hacen uniones cruzadas entre pilinas con el uso de sortasas específicas. Estas sortasas dividen las proteínas precursoras de acuerdo a determinadas señales e involucran los grupos amino de los motivos de pilinas para generar enlaces covalentes entre sus subunidades. La comprensión del proceso de formación del pilus planteado por estos investigadores, facilitó la detección de esta estructura en otras bacterias grampositivas, entre las que se encuentra *S. pneumoniae* (Ton-That y Schneewind, 2003).

Entre las técnicas mayormente utilizadas por los investigadores a nivel mundial para la detección de los pili en *S. pneumoniae* se encuentran la PCR y la microscopía electrónica. La PCR ha permitido detectar, con alta sensibilidad y especificidad, la presencia de los genes implicados en la formación de los pili en las cepas estudiadas. Con el uso de la PCR es posible amplificar exponencialmente una pequeña cantidad de ADN diana, lo que hace que la técnica sea sensible. De igual manera, se diseñan oligonucleótidos particulares para el área que se desea amplificar, por lo que es también una técnica específica. Así, la PCR nos provee resultados de forma rápida, sencilla, con alta especificidad y sensibilidad. El relativo bajo costo de la técnica de PCR frente a otros métodos más avanzados y costosos, como la microscopía electrónica, permite su aplicación en laboratorios convencionales y en la mayoría de los laboratorios de investigación (Winn y col., 2008).

NCBI Reference Sequence: NC_003028.3

[GenBank](#) [FASTA](#)

[Link To This Page](#) | [Feedback](#)

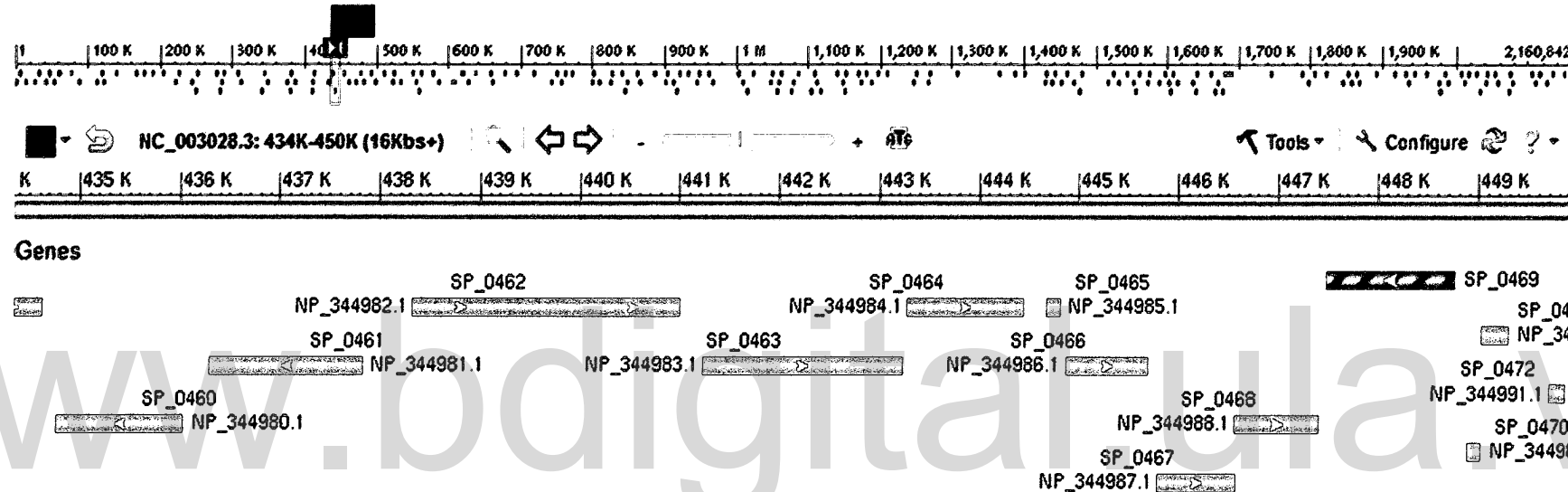


Figura 3. Representación lineal de la ubicación de la isla de patogenicidad 1 en el genoma de la cepa TIGR4 de *S. pneumoniae*.

En la figura se muestra, en la parte superior, la representación lineal del genoma completo de la cepa TIGR4. En el centro, ubicados entre los 434 – 450 Kbs, se muestran los genes que codifican para: (I) SP_0460: IS1167, transposasa; (II) SP_0461: regulador transcripcional; (III) SP_0462 – SP_0464: familia de la proteína de anclaje a la superficie de la pared celular; (IV) SP_0465: proteína hipotética; (V) SP_0466 – SP_0468: sortasas; (VI) SP_0469: IS1167, transposasa.

Tomado de la página web del Centro Nacional para la Información de Biotecnología (National Center for Biotechnology Information).

GenBank FQ312030.1

GenBank FASTA

[Link To This Page](#) | [Feedback](#)

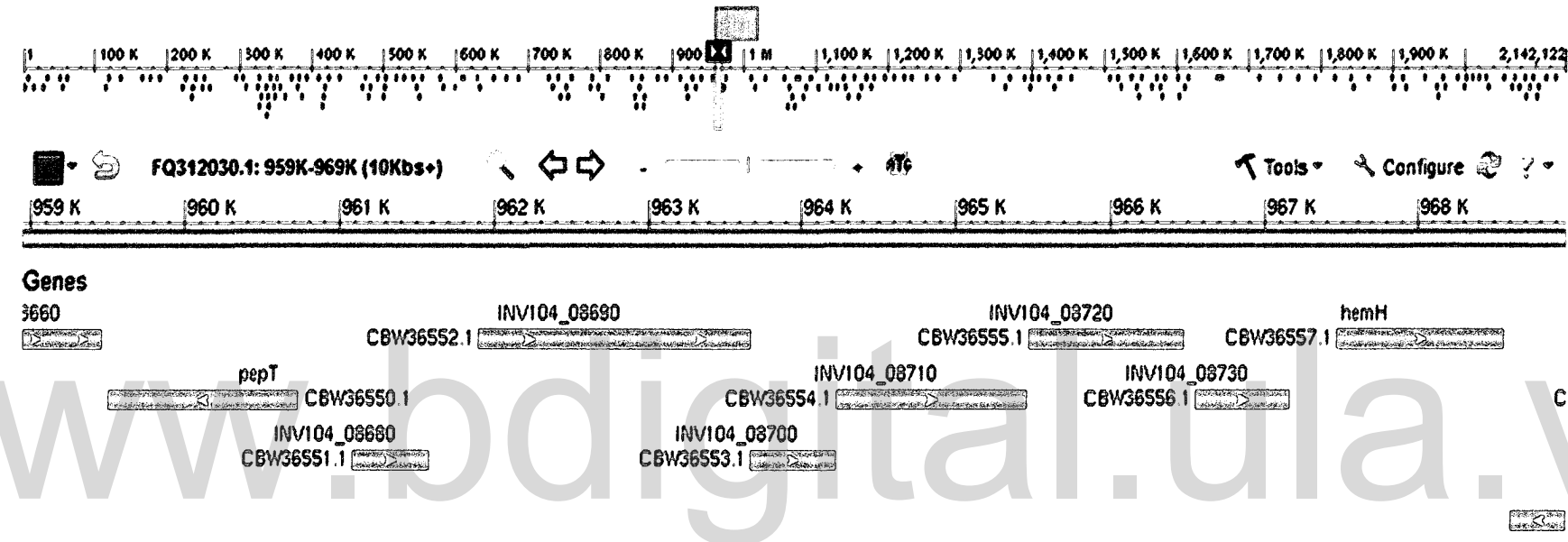


Figura 4. Representación lineal de la ubicación de la isla de patogenicidad 2 en el genoma de la cepa INV104 de *S. pneumoniae*.

En la figura se muestra, en la parte superior, la representación lineal del genoma completo de la cepa INV104. En el centro, ubicados entre las 959 – 968 Kbs, se muestran los genes que codifican para: (I) *pepT*: peptidasa; (II) INV104_08680 – INV104_08690: proteína hipotética; (III) INV104_08700: señal de peptidasa i; (IV) INV104_08710: subunidad estructural de fimbria; (V) INV104_08720 – INV104_08730: sortasas; (VI) *hemH*: ferroquelatasa.

Tomado de la página web del Centro Nacional para la Información de Biotecnología (National Center for Biotechnology Information).

La microscopía electrónica ha ayudado a observar las estructuras ya formadas. Sin embargo, su elevado costo dificulta su implementación en laboratorios convencionales, e incluso de investigación. Mediante el uso de éstos implementos tecnológicos se han logrado hacer los aportes más significativos acerca de la presencia de ambos tipos de pili, incluyendo su conformación genética y molecular (Hilleringman y col., 2009).

2.4.1. PILUS TIPO 1

Barocchi y col., (2006) fueron los primeros en evidenciar la presencia del pilus de tipo 1 en *S. pneumoniae*. Estos investigadores determinaron que este tipo de pilus está codificado en la isla de patogenicidad 1, presente en algunos pero no todos los aislados clínicos. Mediante el uso de microscopía electrónica de transmisión, Barocchi y col. (2006) encontraron que las cepas de *S. pneumoniae* (cepa T4 y cepa ST162) podrían expresar el pilus tipo 1. El papel del pilus tipo 1 en la patogénesis es dual: por una parte, la expresión del pilus potencia la adherencia inicial de la bacteria; por otra parte, promueve la colonización en la nasofaringe (Barocchi y col., 2006).

La adhesión de las cepas que poseen pilus de tipo 1 a células epiteliales cultivadas se evidenció en el estudio de Barocchi y col., (2006) mediante el uso de Western blot. De igual manera, se compararon cepas no capsuladas sin la isla de patogenicidad 1 con esas mismas cepas mutadas, a las que se les insertó la isla de patogenicidad. Las cepas mutantes con la isla de patogenicidad 1 presente tenían la capacidad de adherirse de forma similar a como lo hizo la cepa piliada T4. Esta misma cepa T4 también se mutó, se le extrajo la isla de patogenicidad y al compararla con la cepa piliada original, la mutante T4 no mostró señales de adherencia a las células (Barocchi y col., 2006).

Barocchi y col. (2006) no sólo mostraron el papel del pilus en la adherencia del microorganismo, sino que también realizaron pruebas para determinar su efecto en la colonización. Estos investigadores realizaron modelos de infección en ratones C57BL/6

mediante inoculaciones intranasales, para imitar la ruta natural de infección, utilizando cepas piliadas y no piliadas. Sus resultados, estimados mediante lavados intranasales-traqueales postmortem, indicaron que las cepas con pilus de tipo 1 eran más virulentas que aquellas que no poseían dicha estructura. Además, al inocular cepas piliadas y no piliadas en conjunto, las cepas que poseían el pilus tipo 1 sobrepasaban los niveles de recuperación en sangre, vías respiratorias altas y pulmones, en relación a las no piliadas. Todos estos datos sugieren que esta estructura juega un papel importante en la colonización, desarrollo de neumonía y de la enfermedad invasiva (Barocchi y col., 2006).

La isla de patogenicidad 1 posee 7 genes (Aguiar y col., 2008), entre los cuales, los genes *rrgA*, *rrgB* y *rrgC* codifican para las proteínas de superficie con un motivo LPxTG denominadas RrgA, RrgB y RrgC, respectivamente (Figura 5). Estas proteínas son parecidas a los componentes de superficie microbiana que reconocen las moléculas adhesivas de la matriz (MSCRAMMs). Las proteínas secretadas por los otros tres genes, *srtC-1*, *srtC-2* y *srtC-3* (previamente identificadas como *srtB*, *srtC* y *srtD*), son homólogas a las sortasas y catalizan la unión covalente de las proteínas con un motivo LPxTG, a la pared celular (Mazmanian y col., 2001; Hava y Camilli, 2002; LeMieux y col., 2008).

Por su parte, el gen *rlrA* codifica para la proteína RlrA, un regulador transcripcional. Este regulador transcripcional reconoce los promotores presentes en la isla de patogenicidad e induce la expresión de los genes estructurales del pilus y las sortasas asociadas (Aguiar y col., 2008). Sin embargo, fuera de la isla de patogenicidad 1 se encuentra el gen *mgrA* que actúa como un represor transcripcional y puede silenciar el locus en ausencia de la proteína RlrA (Hemsley y col., 2003). De manera interesante, Hemsley y col. (2003) refieren que este gen represor se encuentra distribuido en todas las cepas de *S. pneumoniae* aún cuando no posean la isla de patogenicidad. Estos hallazgos sugieren que es poco probable que el rol principal de este regulador sea reprimir la expresión de la isla de patogenicidad 1 (Hemsley y col., 2003).

Gracias a los estudios realizados por Hilleringman y col. (2009), con la utilización de microscopía electrónica, hoy en día se conoce la estructura del pilus tipo 1 de *S. pneumoniae* (Figura 6). El pilus tipo 1 está compuesto por la pilina mayor RrgB, que forma la vara, y dos

pilinas menores RrgA y RrgC ubicadas a los lados de RrgB (Figura 7). La RrgC actúa como proteína de anclaje y une la pilina mayor a la pared celular. La RrgA se ubica en la punta de la vara, es decir, en el extremo más lejano de la pared de *S. pneumoniae* y actúa como proteína de adhesión a las células del hospedero (Hilleringman y col., 2009; Liddington, 2010).

Hava y Camilli (2002) observaron que las tres proteínas RrgA, RrgB y RrgC, parecían estar involucradas en la adherencia de *S. pneumoniae* a la superficie mucosa. Estudios realizados por estos autores reflejaron que las cepas mutantes defectivas de *rrgA* poseían una virulencia disminuida en los modelos de neumonía y colonización de nasofaringe, más no en aquellos modelos de bacteriemia. Además, concluyeron que una o más sortasas podrían estar involucradas en los procesos infecciosos, debido a que observaron que una mutación de *srtD* (actualmente *srtC-3*) afectaba severamente la capacidad de *S. pneumoniae* de causar infección pulmonar en ratones (Hava y Camilli, 2002).

Es de relevancia destacar que no todas las cepas de *S. pneumoniae* poseen este pilus tipo 1, ya que la isla de patogenicidad 1 no se ha encontrado en algunas cepas. Además, los genes que codifican para el pilus tipo 1 no son necesarios para el crecimiento de este microorganismo “*in vitro*” (Hava y Camilli, 2002). Sin embargo, el papel importante que juegan como factor de virulencia y su relación con el serotipo capsular se soporta con diversos estudios realizados a nivel mundial. Además, la presencia de pilus promueve la colonización de aquellas cepas que los poseen, por lo que puede ser esencial para el éxito clonal (Sjöström y col., 2007). Sjöström y col. (2007) sugieren que las cepas sin pilus pueden ser desplazadas por las cepas piliadas al momento de colonizar la nasofaringe.

La ausencia de la isla de patogenicidad 1 en algunos aislados neumocócicos sugiere que pudo ser adquirida por transferencia horizontal (Tettelin y col., 2001). Esta idea es factible puesto que la isla está flanqueada por dos secuencias de inserción *IS1167* móviles. Estos elementos transponibles están caracterizadas por la presencia de secuencias repetidas inversas en forma imperfecta que permiten la integración del elemento móvil al genoma mediante recombinación homóloga o transposición (Hemsley y col., 2003; Moschioni y col., 2008).

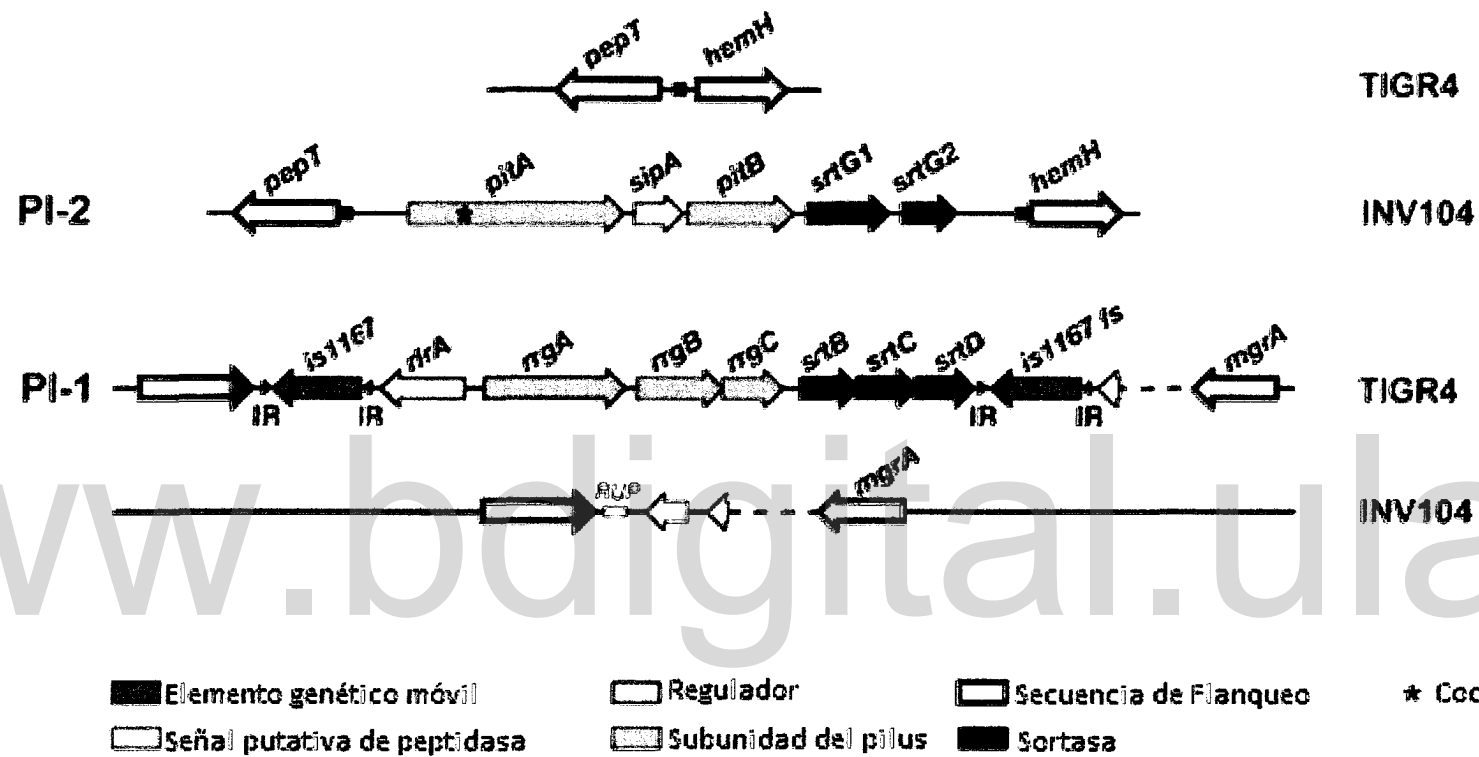


Figura 9. Comparación genómica de las islas de patogenicidad 1 y 2 de *S. pneumoniae*.

(Modificado de Bagnoli y col., 2008)

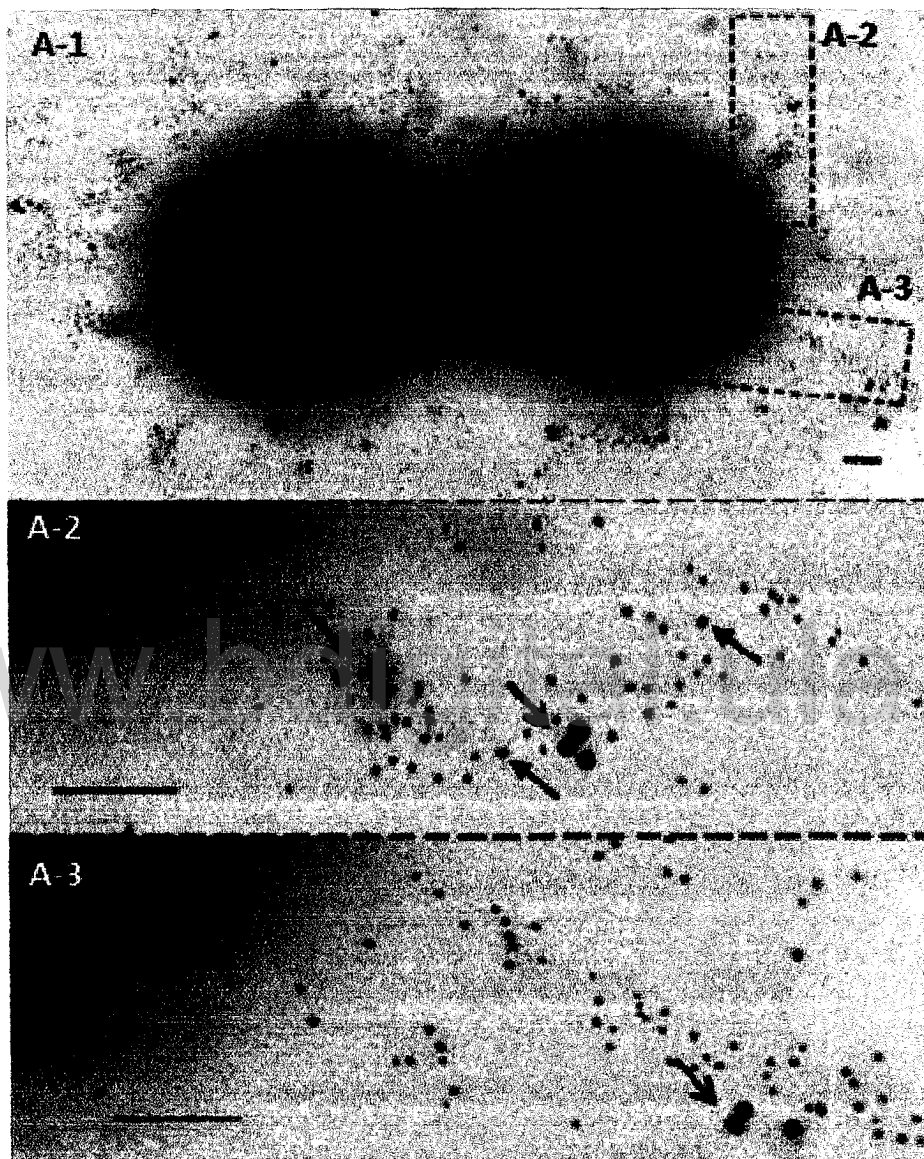


Figura 6. Microscopía inmuno-electrónica del pilus tipo 1.

(Modificado de Hilleringmann y col., 2009). En la figura se observa la columna del pilus (RrgB) teñida con anticuerpos etiquetados con oro (A-1). Las flechas abiertas indican agregados de RrgA distribuidos a lo largo de todo el pilus (A-2, A-3). Las flechas cerradas indican proteínas de anclaje RrgC solitarias o en conjunto con los agregados de RrgA (A-3).

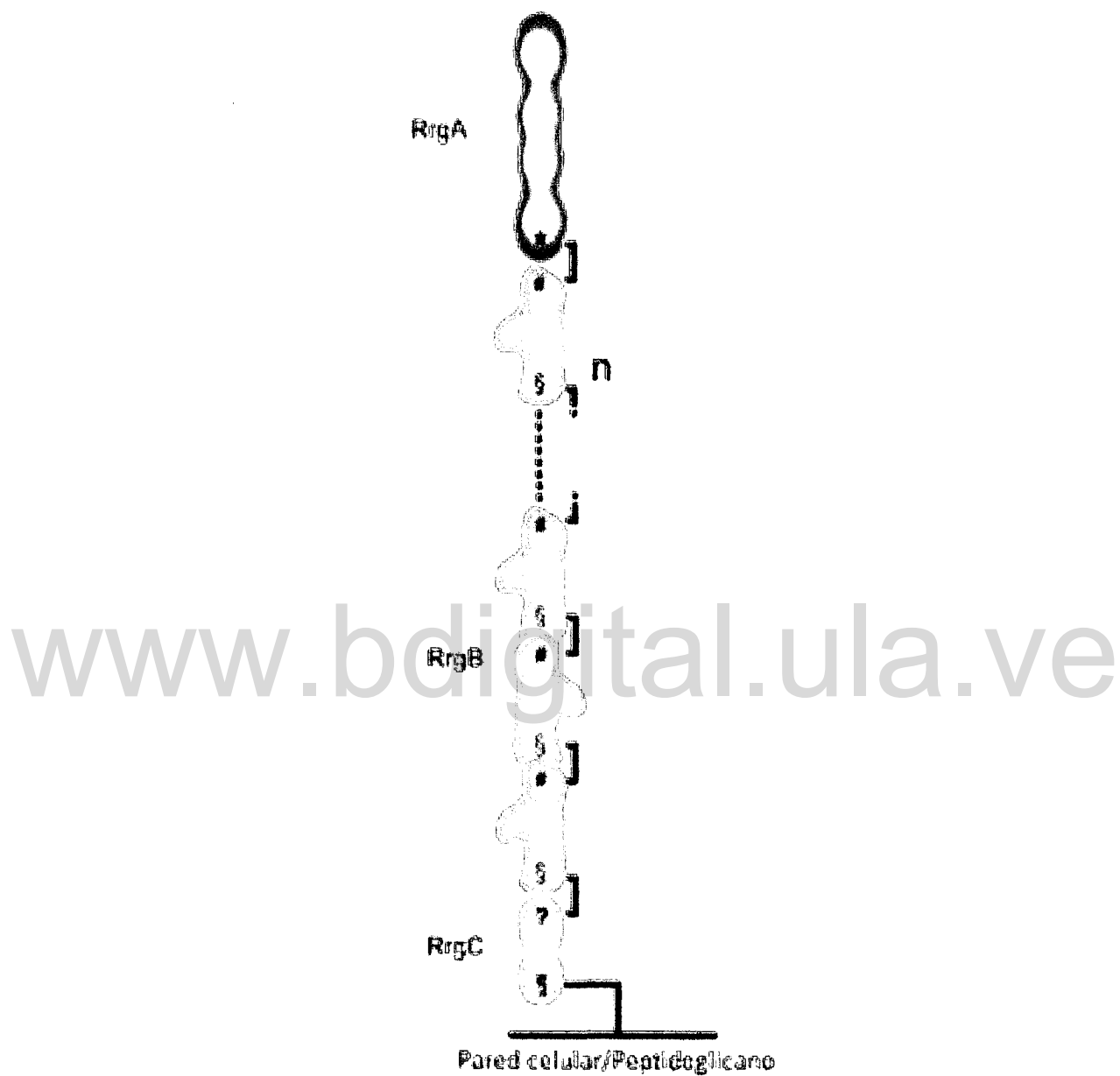


Figura 7. Estructura del pilus tipo 1.

(Modificado de Hilleringman y col., 2009)

Un análisis filogenético molecular realizado por Muzzi y col. (2008) sobre los distintos genes de la isla de patogenicidad 1, mostró que estos genes tienen genealogías incompatibles. Este hecho sugiere que la isla de patogenicidad 1 ha sufrido varias recombinaciones. Las recombinaciones pueden ocurrir como resultado de intercambios al azar de secuencias cortas de ADN. Este mecanismo de evolución se correlaciona con su función en la síntesis y formación del pilus (Muzzi y col., 2008).

La acción de diversos factores del sistema inmune del hospedero influyen en cambios sobre porciones del genoma bacteriano. En muchas ocasiones se originan cambios en la estructura antigénica de un microorganismo a fin de asegurar su permanencia en un determinado nicho ecológico (Winn y col., 2008).

Los distintos alelos que conforman un gen se identifican como clades y estos clades organizan la variabilidad de los genes *rrgA* y *rrgB*. Estos genes son mucho más variables puesto que el sistema inmune del hospedero ejerce una selección positiva sobre estas estructuras (Muzzi y col., 2008). Así, la gran cantidad de diferencias entre clades sugiere una evolución independiente de subpoblaciones (Muzzi y col., 2008).

El gen *rrgA* es el mayor determinante de adhesión *in vitro* asociada al pilus tipo 1. Existe en 2 variantes (Clade I y Clade II) que poseen una capacidad de adhesión similar. Además, se ha demostrado que las proteínas secretadas por ambos clades confieren reacción e inmunización cruzada en modelos de ratones mediante inmunización pasiva, lo que las hace buenas candidatas para la producción de vacunas (Moschioni y col., 2010 a).

El gen *rrgB* es el mas variable de todos y se han identificado y secuenciado 3 clades (I, II y III) que coexisten en las cepas circulantes. Muzzi y col. (2008) encontraron evidencias significativas de selección positiva para los clades I y II, mientras que la evidencia es menor para el clade III. Por los momentos, la recombinación es el mecanismo principal de diversidad.

Los genes *rrgC*, *srtC-1*, *srtC-2* y *srtC-3* no se han diferenciado en clades, en contraste con los genes *rrgA* y *rrgB*. De hecho, se ubican con proximidad a la secuencia de inserción IS1167

en el extremo 3'. Debido a dicha cercanía, los genes *rrgC*, *srtC-1*, *srtC-2* y *srtC-3* se intercambian entre las distintas cepas como unidades discretas. Se ha determinado que el gen *rrgC* y las sortasas C-1, 2 y 3, comparadas con los genes *rrgA* y *rrgB*, poseen un grado de variabilidad muy escaso lo que las hace herramientas útiles para la detección del pilus de tipo 1 (Muzzi y col., 2008).

Basset y col. (2007) hicieron diversos aportes de importancia con respecto a determinadas características del pilus de *S. pneumoniae*. Uno de los aportes fue estandarizar la técnica de detección por PCR de los genes que conforman el pilus tipo 1, incluyendo las secuencias a detectar (Tabla 1). Además, estos autores propusieron que dentro de los genes que constituyen el pilus tipo 1, el gen *rrgC* es el que posee menor variabilidad, por lo que tiene mayor grado de similitud entre dos cepas. Esto permite su fácil detección en cualquier aislado que posea pilus tipo 1 (Basset y col., 2007).

2.4.2. PILUS TIPO 2

El pilus tipo 2 tiene ciertas diferencias con otros pili expresados por distintos microorganismos y el pilus tipo 1 de *S. pneumoniae*. El segundo tipo de pilus parece estar presente como una sola estructura por bacteria, a diferencia de la multitud de pili en las células bacterianas de otros microorganismos, y tiene una conformación más gruesa que el pilus tipo 1 de *S. pneumoniae* (Figura 8). Además, se cree que podría estar involucrado tanto en el proceso de transferencia del material genético como en el de adherencia (Facciotti, 2010). La presencia de diferentes tipos de pili refuerza la teoría de que estas estructuras podrían conferir una ventaja selectiva crítica para *S. pneumoniae* (Bagnoli y col., 2008).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados por Basset y col., (2007) en la detección de los genes que conforman el pilus de tipo 1

Nombre del oligonucleótido original	Gen a detectar	Tamaño del Amplificado (pb)	Secuencia 5'- 3'
pQE30C5	<i>rrgC</i>	360	ATCAGGATCCGCTCTGTGTTTTTCTCTTGTATGG
pQE30C3			ATCCGCATGCATCAATCCGTGGTCGCTTGTTATTTTA
pQE30A5			ATTAGGATCCAAGATATTTTCAGAAGGCAGTTGCA
pQE30A3	<i>rrgA</i>	837	TTAAGCATGCTTCTCTCTTTGGAGGAATAGGTTC
pQE30B5	<i>rrgB</i>	594	ATTAGGATCCCTTGCTGCCTTATTACTGA
pQE30B3			TATTGCATGCGATAGTGATTTTTTTGTTGAC
TTM301	<i>srtC-3</i>	469	ACTTGTTGATGTTGGTAGCCTGTT
TTM302			TTCCGACGGTAAAATAATCTCTGT

(Tomado de Basset y col., 2007)



Figura 8. Microscopía electrónica inmunogold del pilus tipo 2.

(Tomado de Bagnoli y col., 2008). En la figura se observa la estructura del pilus tipo 2. El recuadro superior muestra un segmento del pilus amplificado.

Bagnoli y col. (2008) fueron los primeros en caracterizar la organización genética de la segunda isla de patogenicidad (PI-2), que codifica para el pilus tipo 2, y evidenciar su presencia mediante el uso de la PCR y la microscopía inmunogold. Los datos de este estudio sugirieron que la presencia de esta isla de patogenicidad PI-2 favorece la adhesión del microorganismo a las células del hospedero. Para detectar la PI-2 utilizaron una serie de amplificaciones simultáneas. El primer par de oligonucleótidos (1008for y 1009rev) flanquean el operón (cuando la PI-2 está ausente, un pequeño fragmento podía ser detectado); en la segunda y tercera amplificación se utilizaron los pares de oligonucleótidos 1008for-INTrev y INTfor-1009rev, en los que INTfor e INTrev se alinean dentro de los fragmentos de la isla comprendidos entre 1008for y 1009rev (sólo se observó una banda si la isla estaba presente); una cuarta amplificación se realizó con los oligonucleótidos internos INTfor-INTrev, detectando un fragmento si existía presencia de la isla (Tabla 2). De hecho, la amplificación de los segmentos internos de la isla de patogenicidad 2, se considera tan sensible y específica como la amplificación completa de esta isla de patogenicidad para determinar la presencia del pilus tipo 2 (Bagnoli y col., 2008).

Bagnoli y col. (2008) fueron los primeros en describir la ubicación y conformación de la isla de patogenicidad 2. La PI-2 se ubica entre dos genes conservados: el gen *pepT* que codifica para la peptidasa T (PepT) y el gen *hemH* que codifica para la ferroquelatasa (HemH), además de dos sitios de inserción putativos de 7 pb (TCCTTTT). La región que abarca la PI-2 se compone de 5 genes: *pitA*, *pitB*, *sipA*, *srtG1* y *srtG2*, mediante los cuales la bacteria puede expresar 2 proteínas de superficie PitA y PitB, una proteína parecida a una peptidasa (SipA) y 2 sortasas (SrtG1 y SrtG2), respectivamente (Figura 9). Estos investigadores obtuvieron datos en los que la secuencia se encontró idéntica en un 99% en los aislados neumocócicos, por lo que se determinó que esta isla de patogenicidad tiene un inusual alto nivel de conservación de su secuencia. Además, en todas las cepas analizadas, la PI-2 estuvo presente en el mismo sitio de inserción (Bagnoli y col., 2008; Zahner y col., 2010).

Tabla 2. Oligonucleótidos usados por Bagnoli y col., (2008) para la detección de la isla de patogenicidad 2 de *S. pneumoniae*.

Nombre del oligonucleótido original	Gen a detectar	Tamaño del amplificado (pb)	Secuencia 5'- 3'
1008For	Pilus 2		GCTGGATCGAGTTTGAAACCAGAA
	Flanquea	1048	
1009Rev	PI-2		TAAGGATCACCAAAGTCCAAGGCA
INTFor	Pilus 2	INT-F – 1009r 1094pb	ATGGCTTCAGGGGCTATGTTCCGGTG
INTRev	Secuencia interna de PI-2	1008f-INT-R 1052pb	TTTCAGTGTATGTTTTAGTGCTTCA

(Tomado de Bagnoli y col., 2008)

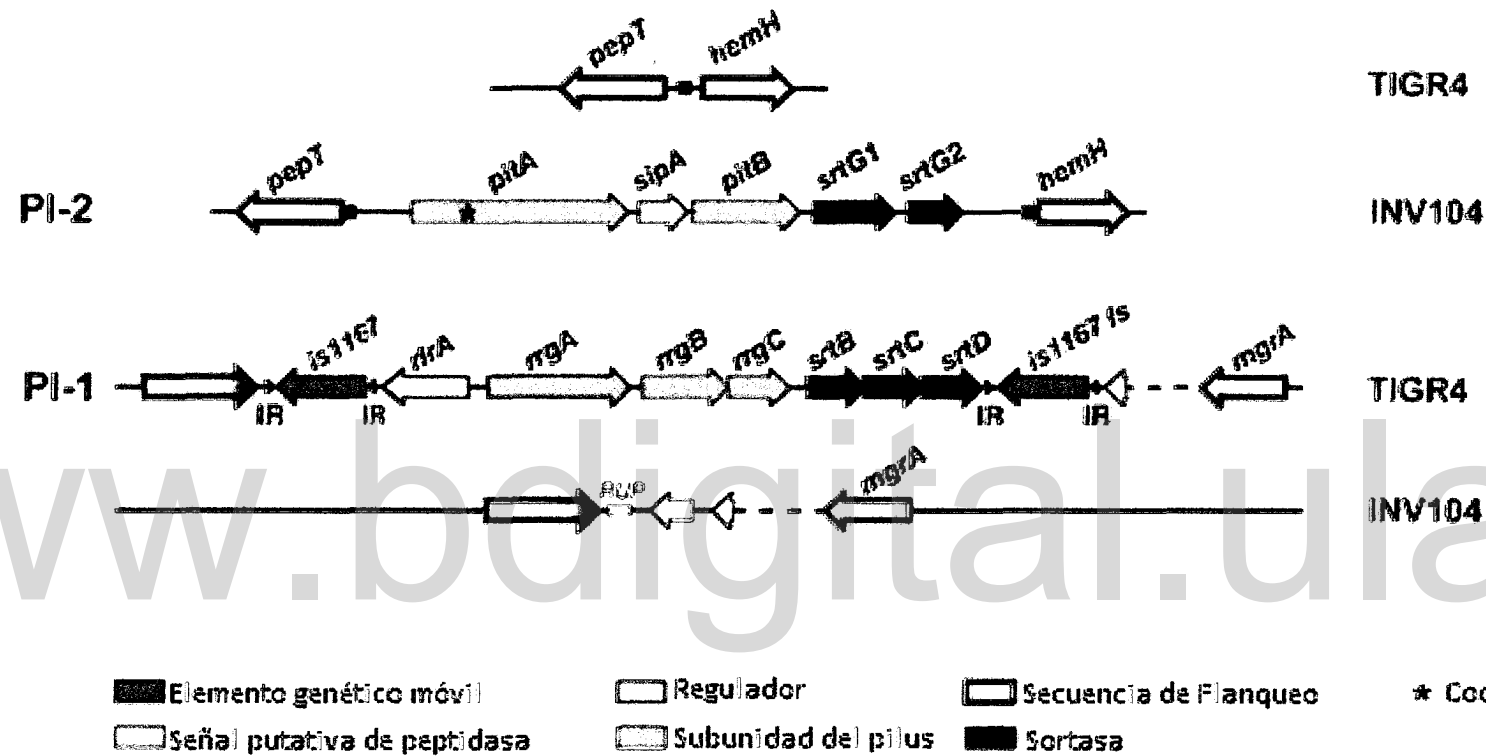


Figura 9. Comparación genómica de las islas de patogenicidad 1 y 2 de *S. pneumoniae*.

(Modificado de Bagnoli y col., 2008)

La estructura del pilus tipo 2 está compuesta principalmente por polímeros de la proteína mayor de pilus PitB. Estudios sugieren que estos polímeros median la adhesión de *S. pneumoniae* a las células eucariotas (Bagnoli y col., 2008; Facciotti, 2010). Sin embargo, el gen *pitA* que codifica la proteína putativa de anclaje PitA contiene un codón de parada (UGA) que causa su término prematuro, lo que lo hace un pseudogen incapaz de codificar la proteína de manera funcional (Bagnoli y col., 2008; Facciotti, 2010).

El gen *pitA* no es el único pseudogen que existe en la PI-2. El gen de la sortasa SrtG2 (*srtG2*) puede presentarse también como un pseudogen aunque se conserva en un 99,2% de los aislados. Sin embargo, se ha determinado que en algunos casos a este gen le falta la región C-terminal o una inserción de dinucleótidos en la región 5', lo que inhibe la expresión de su proteína haciéndolo un gen disfuncional (Bagnoli y col., 2008). No obstante, la proteína PitB se polimeriza en la estructura que conforma el pilus en un proceso dependiente de SrtG1 y SipA, mas no de PitA ni SrtG2. Aun cuando la polimerización de PitB se vea afectada por la falta de SrtG1, su expresión permanece activa y puede encontrarse como monómero en extractos celulares. Esto sugiere que SrtG1 es la sortasa involucrada en la polimerización del pilus tipo 2 (Bagnoli y col., 2008).

La organización estructural del pilus tipo 2 fue evaluada por Bagnoli y col. (2008) y mediante el uso de microscopía electrónica de tinción negativa y la microscopía electrónica inmunogold. Con estas técnicas se pudo observar que el pilus de tipo 2 es tan largo como el pilus de tipo 1, midiendo hasta 1µm. Sin embargo, el grosor es distinto, alcanzando entre 40 y 80nm (versus 30nm del pilus tipo 1). Además, el pilus tipo 2 no tiene una ubicación específica en la superficie bacteriana y está formado por varias copias de una estructura delgada que forma filamentos en paralelo. Esta diferencia estructural le permitió a estos investigadores sugerir una función distinta a la del pilus tipo 1 (Facciotti, 2010). La única representación gráfica del pilus tipo 2 disponible hasta la fecha fue realizada por Facciotti y col. (2010) (Figura 10).

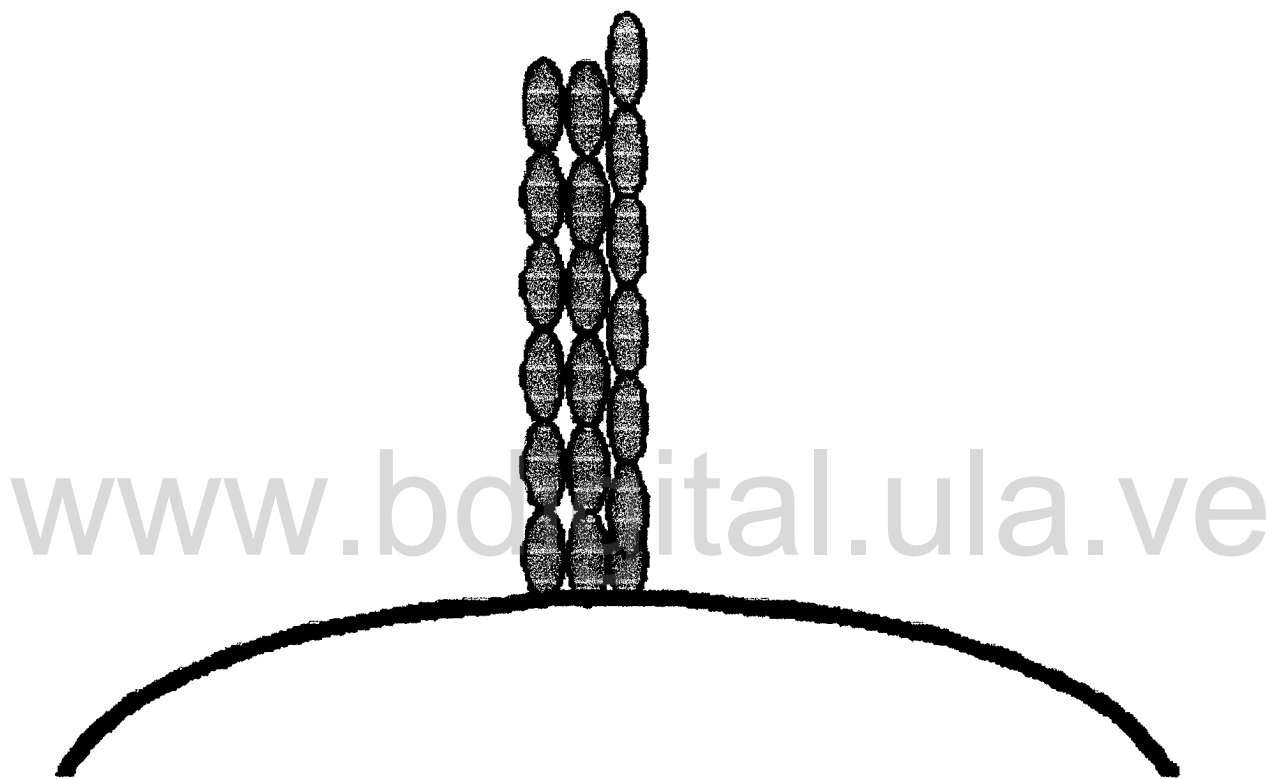


Figura 10. Modelo de la estructura del pilus tipo 2 de *S. pneumoniae*.

(Modificado de Facciotti, 2010)

Los filamentos que constituyen el pilus tipo 2 se asemejan a los que posee *E. coli* y recuerda a los microtúbulos observados en microorganismos gramnegativos. En las bacterias gramnegativas, los filamentos forman un tubo delgado que conforma una estructura capaz de transferir material genético mediante conjugación. Por lo tanto, la semejanza en estas estructuras sugiere una nueva función de transferencia del material genético para el pilus tipo 2 de *S. pneumoniae*. Por otro lado, los resultados de Bagnoli y col. (2008) sugieren, más bien, un papel de la proteína PitB relacionada a la adhesión a las células epiteliales. De esta manera, la información reciente provee indicios de que la función del pilus tipo 2 está ligada tanto a la adherencia como a la transferencia del material genético (Facciotti, 2010).

Debido a la detección reciente del pilus tipo 2 en *S. pneumoniae*, los datos disponibles relacionados a la patogenicidad y epidemiología son escasos. Actualmente, no se cuenta con suficiente información detallada que permita la comprensión de la composición y función del pilus tipo 2.

www.bdigital.ula.ve

2.5. RELACIÓN ENTRE LOS PILI TIPO 1 Y 2 Y LAS VACUNAS

Debido al creciente número de enfermedades neumocócicas a nivel mundial, se han desarrollado vacunas que contienen los serotipos más prevalentes de *S. pneumoniae*. La primera vacuna fue la heptavalente (PCV7) que contiene los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, los cuales ocupaban la mayor tasa de frecuencia en los Estados Unidos (EEUU). Esta vacuna fue primero introducida en EEUU en el año 2000, para luego aplicarse en otros países. Sin embargo, la eficacia de esta vacuna puede verse comprometida debido a la diferencia en la distribución de serotipos, prevalencia de infecciones y resistencia antimicrobiana de cada país (Rodrigues De Aguiar, 2011).

Las vacunas neumocócicas actuales están diseñadas para atacar al microorganismo de acuerdo con los polisacáridos de su cápsula, por lo que son tipo-específicas. Sin embargo,

hasta la fecha existen más de 90 serotipos. Las vacunas para adultos contienen los polisacáridos de los serotipos capsulares más comunes en las infecciones neumocócicas invasivas en EEUU (alcanzando hasta 23 serotipos: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F), mientras que las vacunas para lactantes y niños pequeños consisten en preparados de los polisacáridos y oligosacáridos de 7, 10 o 13 (PCV7, PCV10 y PCV13, respectivamente) serotipos unidos a proteínas transportadoras para una mejor respuesta inmune (Gorrotxategui Gorrotxategui e Iturrioz Mata, 2010).

Ciertamente, la disponibilidad de vacunas cubren un número limitado de serotipos y, peor aún, cada día aumenta la prevalencia de nuevos serotipos causantes de enfermedades invasivas que no están cubiertos por las vacunas actuales (Gorrotxategui Gorrotxategui e Iturrioz Mata, 2010). En base a lo anteriormente expuesto, no es posible obtener una inmunización adecuada que se adapte a las necesidades de hoy en día. Además, *S. pneumoniae* experimenta un creciente desarrollo de resistencia a los antimicrobianos con el pasar de los años. Por estas razones, se hace necesario buscar otros métodos de prevención que ayuden a la comunidad científica a prevenir la diseminación de estos agentes causantes de altas tasas de morbilidad y mortalidad. Es en este punto donde los pili entran en juego y amplían las posibilidades de acción.

La idea de una vacuna basada en el pilus tipo 1 podría tener el potencial de disminuir la presencia de aquellos clones piliados que habitan la nasofaringe de portadores sanos (Sjöström y col., 2007). Esto, a su vez, influye en la potencial eliminación de reservorios importantes de *S. pneumoniae* que puedan traspasar las barreras de la nasofaringe y causen enfermedad invasiva. Sin embargo, no se puede ignorar el hecho de que las vacunas podrían no abarcar todas las cepas de *S. pneumoniae*, puesto que muchos de los aislados clínicos no poseen esta estructura (Basset y col., 2007).

Gianfaldoni y col. (2007) demostraron que los componentes del pilus tipo 1 pueden estimular una respuesta inmune en ratones infectados con 10^3 UFC de la cepa TIGR4, por ratón. Estos autores expusieron que una vacuna recombinante con antígenos para pilus

(RrgA+B+C) puede disminuir las tasas de bacteriemia y aumentar la supervivencia de los ratones en comparación con el grupo control. Además, la vacuna con las subunidades del pilus tipo 1 ofrece la misma protección en ratones que la vacunación con la bacteria inactivada por calor (Gianfaldoni y col., 2007).

Estudios recientes realizados en ratones mostraron que la producción de anticuerpos contra cepas piliadas neumocócicas era factible al utilizar una fusión de los 3 variantes de la proteína RrgB (RrgB321). El antisuero RrgB321 induce la opsonofagocitosis mediada por complemento de las cepas piliadas en niveles comparables a la vacuna heptavalente lo que permitiría abarcar un 30% o más de las cepas neumocócicas. Además, presenta la posibilidad de ser utilizada en una fusión multicomponente de próximas vacunas (Harfouche y col., 2011). Por tanto, la idea de hacer nuevas vacunas que incluyan estas estructuras podría suponer una nueva forma de prevención ante la diseminación de este agente patógeno.

Al contrario de lo expresado previamente, Rodrigues de Aguiar (2011) en Portugal, sugirió que una vacuna basada en los pili 1 y 2 no sería realmente de provecho para la población. La presencia del pilus tipo 1 reportada fue de un 17% en las cepas neumocócicas invasivas y un 33% de prevalencia del pilus tipo 2 en la misma población de estudio. Además, todas las cepas que contenían alguno de los pili también poseían un serotipo cubierto por la PCV13. Por lo tanto, la baja prevalencia de los pili y su presencia en cepas ya cubiertas por las vacunas disponibles no suponen un avance en la prevención de las enfermedades neumocócicas, de desarrollarse una vacuna basada en los pili tipo 1 y 2 (Rodrigues de Aguiar, 2011).

2.6. ANTECEDENTES DE LA HIPÓTESIS

Han sido pocos los estudios realizados que tienden a buscar la frecuencia de los pili tipo 1 y 2 en cepas de *S. pneumoniae* colonizadoras y causantes de enfermedad invasiva. La cantidad de investigaciones que han explorado la relación entre la frecuencia de ambos tipos de pili, los

serotipos capsulares y la resistencia a los antimicrobianos es menor aún. A continuación se describen brevemente los estudios que han servido de base para la presente investigación.

2.6.1. DISTRIBUCIÓN DEL PILUS TIPO 1 SEGÚN SEROTIPOS Y LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

Frecuencia

Basset y col. (2007) fueron los primeros en determinar la frecuencia del pilus tipo 1. Estos investigadores analizaron 484 cepas de *S. pneumoniae* provenientes de aislamientos nasofaríngeos, de sangre y de líquido cefalorraquídeo de niños y adultos en EEUU. Mediante la detección del gen *rrgC* por PCR encontraron que un 21,5% de las cepas poseían pilus tipo 1. La frecuencia de pilus tipo 1 fue similar entre cepas colonizadoras y las causantes de enfermedad invasiva (20,5% versus 24,4%, respectivamente) (Basset y col., 2007).

Así mismo, Moschioni y col. (2008) investigaron un panel global de 424 cepas de *S. pneumoniae* provenientes de portadores nasofaríngeos y pacientes con otitis media y enfermedades invasivas en EEUU, Brasil, Finlandia, Ghana, Bangladesh, Italia, Kenya y Suecia. Con el uso de la PCR amplificaron y secuenciaron el locus completo de la isla de patogenicidad 1 determinando su frecuencia en el 30,6% del pilus tipo 1 en las cepas investigadas (Moschioni y col., 2008).

Imai y col. (2009) determinaron la frecuencia del pilus tipo 1 en Japón entre los años 2003 y 2004. Estos investigadores analizaron 141 cepas neumocócicas provenientes de esputo, sangre, aspirado transtraqueal y lavados bronquiales de pacientes mayores de 15 años con neumonía adquirida en la comunidad. Mediante el uso de la PCR y 5 amplificaciones seguidas de varios segmentos de la isla de patogenicidad 1, Imai y col. (2009) pudieron determinar una frecuencia de la isla de patogenicidad 1 completa del 30,5% en las cepas de estudio.

Del mismo modo, Bagnoli y col. (2008) exploraron la frecuencia del pilus tipo 1 en cepas provenientes de varios países del mundo. Las 305 cepas estudiadas se aislaron de portadores nasofaríngeos y de pacientes con enfermedades invasivas. Esta investigación reflejó una frecuencia del 31,5% del gen *rlyA* del pilus tipo 1 amplificado por PCR.

En el caso específico de las cepas causantes de enfermedad invasiva, Aguiar y col. (2008), en Portugal, analizaron 483 cepas de *S. pneumoniae* provenientes de niños menores de 6 años y adultos mayores de 18 años con enfermedades invasivas en el período 1999 - 2002. La frecuencia del pilus tipo 1 se determinó mediante la técnica de Southern Blot y la amplificación por PCR del gen *rlyA* obteniendo una frecuencia del 27% (Aguiar y col., 2008).

Rodrigues de Aguiar (2011) amplió el estudio de Aguiar y col. (2008) en Portugal, agregando 6 años más de recolección de muestras (1999 – 2008). En esa ocasión se analizaron 577 cepas causantes de enfermedades invasivas provenientes de niños menores de 18 años. La frecuencia general del gen *rlyA* detectada por Southern Blot y PCR fue de 16,6% (Rodrigues de Aguiar, 2011).

Regev-Yochay y col. (2010) exploraron la frecuencia del pilus tipo 1 en EEUU durante 2007 – 2008. Se analizaron 26 cepas aisladas en sangre de niños con enfermedad invasiva. La frecuencia se determinó mediante la amplificación del gen *rrgC* con el uso de la PCR, obteniendo un 21% de pilus tipo 1 en las cepas estudiadas.

Serotipos

Diversos estudios han mostrado relación entre la presencia del pilus tipo 1 y los serotipos capsulares. De hecho, varias investigaciones han asociado la presencia del pilus tipo 1 con ciertos serotipos capsulares incluidos en la vacuna heptavalente, como lo son los serotipos 4, 6B, 9V y 14 (Basset y col., 2007; Moschioni y col., 2008; Aguiar y col., 2008; Imai y col., 2009; Moschioni y col., 2010 b; Rodrigues de Aguiar, 2011). Además, también se ha reportado una asociación entre la ausencia del pilus tipo 1 y los serotipos 1, 7F y 23F (Aguiar y col., 2008; Moschioni y col., 2008; Rodrigues de Aguiar, 2011).

Basset y col. (2007) analizaron los serotipos 4, 6A, 6B, 9A, 9C, 9V, 18A, 19A, 23A y 23B. Los serotipos vacunales 4, 6B y 9V estaban asociados significativamente a la presencia del pilus tipo 1 ($p=0,001$), mientras que los serotipos no vacunales 6A, 9A, 9C, 18A, 19A, 23A y 23B presentaron el pilus con menor frecuencia.

Moschioni y col. (2008) obtuvieron datos similares a los de Basset y col., (2007) al analizar los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F. Estos autores documentaron que el serotipo 9V presentaba la mayor frecuencia de pilus tipo 1, mientras que los serotipos no vacunales 1, 3, 5, 7F y 18C no se relacionaron a la presencia de la isla de patogenicidad 1 (Moschioni y col., 2008).

Los dos estudios previos concuerdan con la investigación realizada por Aguiar y col. (2008) en la que se reportó que se podía predecir, a modo general, la presencia o ausencia de la isla de patogenicidad 1 según el serotipo aislado. Utilizando una fórmula matemática y con base en el análisis de los serotipos 1, 3, 4, 7F, 8, 9V, 12B, 14, 19A y 23F, estos autores sugirieron que los serotipos 4, 6B, 9V y 14 estaban frecuentemente relacionados con la presencia de la isla de patogenicidad 1. En cambio, esta isla de patogenicidad estaba significativamente ausente en los serotipos 1, 7F, 8, 12B y 23F (Aguiar y col., 2008).

Para Rodrigues de Aguiar (2011), el estudio de los serotipos y su relación con el pilus tipo 1 fue un poco más extensa, abarcando mayor cantidad de serotipos: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 13, 14, 18C, 19A, 19F, 23F y otros. Los serotipos 4, 6B, 9V y 14 resultaron estar fuertemente relacionados con la presencia de la isla de patogenicidad 1 ($p<0,01$), mientras que en los serotipos 13, 19A y 19F se observó una elevada presencia del pilus pero sin relación estadísticamente significativa. En cambio, los serotipos 1, 7F y 23F no mostraron el pilus de tipo 1 (Rodrigues de Aguiar, 2011).

Imai y col. (2009) y Moschioni y col. (2010 b) reportaron la presencia del pilus tipo 1 en serotipos distintos a los mencionados por los otros autores. Dichos serotipos incluyen el 7, 6A, 11A, 19F, 23F y 33A. En el caso del serotipo 23F, Imai y col. (2009) y Moschioni y col. (2010

b) se oponen a lo documentado por Aguiar y col. (2008) y Rodrigues de Aguiar (2011), quienes sustentaron que el pilus tipo 1 estaba significativamente ausente del serotipo 23F.

En otro orden de ideas, Basset y col. (2007) documentaron que la frecuencia del pilus tipo 1 disminuyó de manera significativa, de 43% a 21%, luego de la aplicación global de la vacuna heptavalente (abarca los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F). Por lo tanto, se cree que la aplicación de la vacuna probablemente limitó la propagación de aquellos serotipos más propensos a poseer pilus tipo 1 y que, a su vez, tienen un potencial mayor de colonización y virulencia.

Rodrigues de Aguiar (2011) propuso una teoría similar a la de Basset y col. (2007) en su tesis. Previa introducción de la vacuna (años 1992-2002), la frecuencia del pilus tipo 1 abarcó un 31,4% en las cepas de Portugal analizadas. Esta frecuencia del pilus disminuyó a 13,5% luego de que la población de dicho país fuese vacunada (años 2003-2008). En general, de todas las cepas que poseían pilus tipo 1, el 73,9% pertenecía a alguno de los serotipos incluidos en la vacuna heptavalente. El análisis detallado de la relación entre el pilus tipo 1 y los serotipos vacunales reflejó que antes de la introducción de la vacuna heptavalente, el 96,9% de las cepas con pilus tipo 1 tenían un serotipo vacunal. Posterior al uso de la vacuna, la frecuencia de cepas con pilus tipo 1 y serotipo vacunal disminuyó a 62,5% (Rodrigues de Aguiar, 2011).

Sin embargo, Regev-Yochay y col. (2010), en EEUU, reportaron una re-emergencia del pilus tipo 1 en cepas de *S. pneumoniae* luego de varios años posteriores al uso de la vacuna heptavalente. Para el año 2001, apenas 1 año después de la introducción de la vacuna, la frecuencia de cepas con pilus tipo 1 era de 23,7%. Posteriormente, en el 2004, la prevalencia de cepas piliadas disminuyó a un 14,9%, aumentando nuevamente en el 2007 a un 26,1% ($p=0,004$, comparado con el 2004). Parte del aumento en la prevalencia se debió a la detección del pilus tipo 1 en los serotipos no incluidos en la vacuna heptavalente. De hecho, las frecuencias del pilus tipo 1 en los serotipos no vacunales aumentó con el pasar de los años. Para el año 2001, la frecuencia de pilus tipo 1 en serotipos no vacunales fue de 8,9%. Dicha

frecuencia aumentó a 12% en el 2004 y a 30,1% en el 2007 ($p=0,0002$) (Regev-Yochay y col., 2010).

En conclusión, los estudios realizados hasta el momento muestran que inicialmente el pilus tipo 1 estaba relacionado con aquellos serotipos incluidos en la vacuna heptavalente. Sin embargo, durante los primeros años luego de la aplicación de dicha vacuna, se observó una disminución momentánea de la frecuencia del pilus tipo 1, luego la prevalencia volvió a aumentar pero esta vez relacionada con cepas de serotipos no cubiertos por la vacuna heptavalente, lo que propone una alerta sobre la verdadera cobertura de las vacunas disponibles hacia cepas neumocócicas con potencial de virulencia.

Resistencia a los antimicrobianos

S. pneumoniae posee diversos mecanismos de resistencia a los antimicrobianos que le confieren ventaja al momento de producir enfermedad, ya que eluden el tratamiento implementado por el clínico. Este microorganismo posee una creciente tasa de resistencia a los antibióticos, sobre todo a los más utilizados para tratar enfermedades neumocócicas: β -lactámicos y macrólidos. A modo general, para el año 2008, hubo 41.500 casos de enfermedad neumocócica invasiva. De estas, el 28% fueron causadas por cepas de *S. pneumoniae* no susceptibles por lo menos a un antimicrobiano. En el 11% de las enfermedades, las cepas causantes poseían resistencia a 3 o más antibióticos (Centers for Disease Control and Prevention).

Los únicos trabajos que han explorado la frecuencia del pilus tipo 1 y su relación con la resistencia a los antimicrobianos, fueron los realizados por Moschioni y col. (2008), Moschioni y col. (2010 b) y Rodrigues de Aguiar (2011). En todos los casos se relacionó la presencia del pilus tipo 1 con la resistencia a penicilina, eritromicina y la multirresistencia a drogas.

Moschioni y col. (2008) reportaron una mayor frecuencia de pilus tipo 1 en las cepas resistentes que en las susceptibles a penicilina, eritromicina y tetraciclina (51% versus 21%;

53% versus 23%; 41% versus 32%, respectivamente). La presencia del pilus tipo 1 se asoció estadísticamente ($p<0,001$) a la resistencia a penicilina y eritromicina. Años más tarde, Moschioni y col. (2010 b), documentaron frecuencia del pilus tipo 1 en el 41,5% de las cepas resistentes a penicilina, 51,6% en cepas resistentes a eritromicina y 51,8% en cepas multirresistentes a drogas. En el caso de las cepas susceptibles a penicilina, eritromicina y otras drogas no especificadas por los autores, apenas el 5,7% poseía el pilus tipo 1 ($p<0,001$).

Por su parte, Rodrigues de Aguiar (2011) encontró que el 28,8% de las cepas presentaban resistencia por lo menos a un antimicrobiano. A modo general y evaluando la presencia de los pili tipo 1 y 2, sus resultados expresaron lo siguiente: 16,8% de resistencia a penicilina, 12,0% de resistencia a eritromicina y 8,4% de multirresistencia. A saber, la presencia del pilus tipo 1 estuvo significativamente asociada a la resistencia de penicilina y trimetoprim/sulfametoxazol. Previa implementación de la vacuna heptavalente, la frecuencia del pilus tipo 1 era de 47% en cepas resistentes a penicilina y de 25% en cepas resistentes a eritromicina. Luego de la introducción de dicha vacuna, la frecuencia de pilus tipo 1 disminuyó a 10% en la resistencia a penicilina y a 9% en la resistencia a eritromicina.

2.6.2. DISTRIBUCIÓN DEL PILUS TIPO 2 SEGÚN SEROTIPOS Y LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

Frecuencia

El pilus tipo 2 de *S. pneumoniae* ha sido menos estudiado que el pilus tipo 1. En apenas 4 estudios se ha determinado la presencia de pilus tipo 2 en los aislados neumocócicos y se ha obtenido una frecuencia entre 7% y 33% (Bagnoli y col., 2008; Moschioni y col., 2010 b; Zahner y col., 2010; Rodrigues de Aguiar, 2011).

El primer estudio en mostrar la presencia del pilus tipo 2 de *S. pneumoniae* fue el realizado por Bagnoli y col. (2008) sobre una colección de cepas neumocócicas aisladas en distintos

países a nivel mundial. Estos autores exploraron 305 muestras aisladas de portadores nasofaríngeos y de pacientes con enfermedad invasiva. En esta investigación se mostró, con el uso de la PCR, que un 16,4% de los aislados contenían la isla de patogenicidad 2. Dicha frecuencia era muy similar entre las cepas colonizadoras y las causantes de enfermedad invasiva (porcentaje no especificado) (Bagnoli y col., 2008).

Por su parte, Moschioni y col. (2010 b), en Israel, analizaron 113 cepas provenientes de otitis media aguda en niños de 0,8 a 96,9 meses de edad. Mediante el uso de la PCR y la amplificación de la PI-2, estos investigadores reportaron una frecuencia del pilus tipo 2 del 7%, la más baja reportada hasta ahora. Todas las cepas que presentaban el pilus tipo 2 también poseían el pilus tipo 1.

En el caso específico de las enfermedades invasivas, Zahner y col. (2010), en EEUU, analizaron una colección de 590 aislados clínicos invasivos de *S. pneumoniae* en el período 1994 – 2006. Con el uso de la PCR y la amplificación de los genes *sipA*, *pitB* y un flaqueo de la PI-2 se determinó que para el año 1999, la frecuencia del pilus tipo 2 fue de 3,6%, mientras que para el año 2006 la frecuencia aumentó al 21%.

La mayor frecuencia del pilus tipo 2 de *S. pneumoniae* fue reportada recientemente por Rodrigues de Aguiar (2011), en Portugal, quien analizó 577 cepas causantes de enfermedad invasiva en niños menores de 18 años. Al 33% de las muestras se les detectó el pilus tipo 2 mediante la amplificación del gen *sipA* y un flaqueo de la PI-2. Al contrario de lo observado con el pilus tipo 1, hubo un incremento en la frecuencia del pilus tipo 2 del 21,6% previa implementación de la vacuna heptavalente, versus 37,3% posterior al uso de dicha vacuna (Rodrigues de Aguiar, 2011).

Serotipos

Bagnoli y col. (2008) habían sugerido que no existe correlación estadística significativa entre la presencia de PI-2 y el serotipo, aun cuando los serotipos 1, 2, 7F, 19A y 19F tenían el pilus tipo 2 presente. De igual manera, Zahner y col., (2010) encontraron el pilus tipo 2 en los

serotipos 1, 7F, 11A, 19A y 19F. De estos serotipos, el serotipo 1 fue el serotipo más frecuente con pilus tipo 2 en el período 1994-2005. Para el año 2006, los serotipos más frecuentemente asociados con la presencia del pilus tipo 2 fueron el 7F y el 19A.

Para Rodrigues de Aguiar (2011), los serotipos 1 y 7F se encuentran principalmente asociados con la presencia del pilus tipo 2, mientras que una pequeña porción de los serotipos 19A (17,8%) y 19F (2%) poseían la isla PI-2. De manera interesante, todas las cepas de serotipo 19A también poseían el pilus de tipo 1. Ahora bien, de las cepas con la isla de patogenicidad 1 presente, sólo 4 cepas (serotipo 19F) poseían PI-2 también (Rodrigues De Aguiar, 2011). Estos datos se asemejan a los obtenidos por Moschioni y col., (2010 b) con el serotipo 19F, que en todos los casos en los que poseía el pilus tipo 2, también poseía el pilus tipo 1.

Con respecto a la introducción de la vacuna heptavalente, hubo un contraste con lo observado con el pilus tipo 1. La frecuencia del pilus tipo 2 aumentó luego de la introducción de la vacuna con un porcentaje previo de 21,6% y posterior de 37,3%. Este cambio en las frecuencias puede estar relacionado a la expansión de los serotipos 7F y 19A con pilus tipo 2, con disminución del serotipo vacunal 19F (Zahner y col., 2010; Rodrigues de Aguiar, 2011).

Resistencia a los antimicrobianos

Sólo 2 estudios, a nuestro conocimiento, han reportado información sobre la presencia específica del pilus tipo 2, el serotipo asociado y la resistencia a distintos antimicrobianos. Zahner y col. (2010), reportaron que de las cepas que poseían el pilus tipo 2, todas las de serotipo 19A eran multirresistentes a drogas (penicilina, eritromicina, trimetoprim/sulfametoxazol, tetraciclina y cloranfenicol), mientras que todas las cepas con pilus tipo 2 y serotipos 1, 7F, 11A y 19F eran susceptibles. Por su parte, Rodrigues De Aguiar (2011) avala la asociación del pilus tipo 2 con las cepas susceptibles a los antimicrobianos.

2.7. HIPÓTESIS

En las cepas de *S. pneumoniae* aisladas en niños con enfermedad invasiva de Lima, Perú durante el lapso 2006 – 2008, se planteó que:

1. Los genes *rrgC* y *srtC-3* codificantes del pilus tipo 1, y/o la isla de patogenicidad 2 que median la expresividad del pilus tipo 2 estarían presentes en algunas cepas.
2. Los pili tipo 1 y 2, detectados mediante la amplificación de genes de las islas de patogenicidad 1 y 2, se detectarían con mayor frecuencia en cepas causantes de enfermedad meníngea que en las cepas no meníngeas
3. El pilus tipo 1, detectados mediante la amplificación de genes de las islas de patogenicidad 1, se detectaría con mayor frecuencia en cepas con serotipos vacunales que en cepas con serotipos no vacunales.
4. El pilus tipo 2, detectados mediante la amplificación de genes de las islas de patogenicidad 2, se detectaría con mayor frecuencia en cepas con serotipos no vacunales que en cepas con serotipos vacunales.
5. Los pili tipo 1 y 2, detectados mediante la amplificación de genes de las islas de patogenicidad 1 y 2, se detectarían con mayor frecuencia en cepas resistentes que en cepas susceptibles a los antimicrobianos.

CAPÍTULO 3: MARCO METODOLÓGICO

1. *Cepas bacterianas:*

En el Hospital Nacional Cayetano Heredia de Lima, Perú, se recolectaron 108 cepas de *S. pneumoniae* provenientes de niños entre 3 meses a 10 años con enfermedad invasiva, que no habían sido inmunizados con la vacuna conjugada heptavalente PCV-7 (Prevnam[®]; Wyeth) y que fueron atendidos en dicho hospital durante el período abril 2006 a Junio 2008. Se seleccionaron aquellas cepas que presentaran, por lo menos, un marcador de resistencia a penicilina, eritromicina y/o tetraciclina, creando así la colección de 41 cepas de *S. pneumoniae* objetivo de este estudio. El promedio de edad de los pacientes atendidos fue de 2 años y 11 meses. La colección de 41 cepas fue enviada para su estudio y análisis molecular al Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

1.1 Reactivación de las cepas. Las cepas fueron preservadas en viales con 1 mL de leche descremada al 20% y se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento. La reactivación se realizó inoculando 100 µL de cada vial en tubos con 3 mL de caldo Todd Hewitt (OXOID[®]). Los tubos se colocaron en microaerofilia y se incubaron a 37°C. Luego de 48 horas, se tomaron 30 µL de cada caldo Todd Hewitt y se colocaron en placas de agar Tripticasa Soya (OXOID[®]) suplementado con 5% de sangre de carnero. Las placas se incubaron en microaerofilia a 37 °C por 24 a 48 horas. Se utilizó el taxo de optoquina (5 µg) (BBL[™]) como prueba preliminar para asegurar la presencia del microorganismo en estudio.

2. *Estudio microbiológico.*

El aislamiento y la identificación inicial de las cepas se realizó siguiendo los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud (2004) y por el Grupo Peruano de Investigación en Neumococo (GPIN), Lima, Perú. Los serotipos capsulares se determinaron mediante la reacción de Quellung, utilizando los antisueros del Statens Serum Institute de Copenhagen,

Dinamarca. Se consideraron serotipos vacunales aquellos incluidos en la formulación de la vacuna heptavalente: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F.

2.1 Verificación de la pureza de los cultivos: Primero se observó que las colonias tuviesen las características particulares del microorganismo tales como: un tamaño de 1-2 mm, de aspecto mucoso, transparente y rodeadas por un halo de alfa- hemólisis. Luego se tomó una colonia para verificar las características microscópicas con la tinción de Gram de diplococos grampositivos en pares. Además, las cepas debieron ser catalasa negativas y mostrar susceptibilidad a la optoquina (taxo de 5µg; BBL™) (Romero Cabello, 2007).

2.2 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. La susceptibilidad a los agentes antimicrobianos se determinó mediante la prueba de difusión en disco para los siguientes antibióticos: clindamicina, tetraciclina, vancomicina y rifampicina. La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) en caldo fue determinada para penicilina, eritromicina, ceftriaxona, cloranfenicol y trimetoprim/sulfametoxazol. En todas las pruebas de susceptibilidad se utilizó la cepa control *S. pneumoniae* ATCC 49619, así como las recomendaciones y puntos de corte sugeridos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Se consideró como fenotipos de multirresistencia todas aquellas cepas que presentaron resistencia a 3 o más antibióticos de grupos diferentes.

2.3 Criopreservación: cada cepa aislada se preservó en 2 tubos eppendorf con 1 mL de leche descremada a -20°C. De esta manera, se mantuvieron las cepas de la colección en buen estado para estudios posteriores.

3. Estudios moleculares.

3.1 Extracción del ADN genómico: Cada cepa fue inoculada en una placa de agar Tripticasa Soya con 5% de sangre de carnero que se incubó en microaerofilia a 37°C. Luego de 24 horas, fue recolectado el crecimiento de toda la placa y se suspendió en

100 µL de agua destilada estéril en un tubo eppendorf estéril, el cual fue sometido a ebullición por 20 minutos y una posterior centrifugación a 13.000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante, que contenía el ADN bacteriano, fue separado en 2 tubos eppendorf estériles que se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa: Se realizaron diferentes PCR dependiendo de los genes específicos a detectar. Las mezclas estuvieron compuestas por oligonucleótidos a 100 pmol/µL (tabla 3); dNTP's a 10mM; MgCl₂ a 25mM; Buffer 10X, agua destilada; *Taq* polimerasa 5 U/µL y 2 µL de ADN. Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400. En cada reacción se utilizó controles positivos y negativos que aseguraron el buen funcionamiento del equipo y la correcta amplificación de los oligonucleótidos.

3.2.1 Identificación genética de *S. pneumoniae* - detección del gen *lytA*:

Antes de iniciar los estudios genéticos fue necesario corroborar la identificación microbiológica de todas las cepas en estudio. Para ello se determinó por amplificación de PCR el gen *lytA*. Los iniciadores, mezcla y condiciones de amplificación se llevaron a cabo según lo descrito por Nagai y col. (2001) (Tablas 3, 4 y 5). Fue necesario obtener una banda de 319 pb que confirmase la identificación de cada cepa a nivel de especie. Además, permitió determinar la calidad del ADN (mediante la presencia de una banda clara y bien marcada) y aseguró que fuese apropiado para el uso subsiguiente en la detección de los pili 1 y 2.

En esta prueba se utilizó como control positivo el ADN de la cepa *S. pneumoniae* ATCC 49619 y como controles negativos, la mezcla de reacción sin ADN y el ADN de la cepa *E. coli* ATCC 25922. Por otra parte, estos ensayos permitieron determinar la calidad de ADN obtenido para los siguientes ensayos.

3.2.2 **Detección de los genes que codifican para los pili tipo 1 y 2:**

Los oligonucleótidos, mezclas de reactivos y condiciones de amplificación utilizados fueron los descritos por Basset y col., 2007 (Tablas 3, 4 y 5). Se consideraron positivas para la presencia del pilus tipo 1 aquellas cepas en las que: la amplificación del gen *rrgC* generase una banda de 360 pb y /o la amplificación del gen *srtC-3* generase una banda de 469 pb. Para la detección de la presencia del pilus tipo 2, se consideraron positivas aquellas cepas cuyo amplificado generase una banda de 1094 pb que se corresponde con el fragmento interno de la isla de patogenicidad 2.

Como indicadores de la presencia del pilus tipo 1 se detectaron los genes *rrgC* y *srtC-3*. La presencia del pilus tipo 2 se detectó mediante una combinación de oligonucleótidos, en los que uno de ellos flanquea la isla en el extremo 3' y el otro es un oligonucleótido interno de la PI-2, de tal forma que se seleccionó un segmento de la PI-2, tal como se muestran en la tabla 2. Los controles utilizados en la detección de ambos pili fueron: (a) Control Positivo, Cepa I-248 previamente caracterizada con los pili tipo 1 y 2[†]; (b) Controles Negativos, Cepa I-2 previamente caracterizada sin los pili tipo 1 y 2[†]; Mezcla sin ADN.

[†]Caracterización realizada en el Laboratory of Pediatric Infectious Diseases UMC, Saint Radboud, Nijmegen, Holanda; y en el Centro Nacional de Referencia para los Estreptococos, Alemania.

Tabla 3. Lista de oligonucleótidos utilizados para la detección del gen *lytA*, y de los pili tipo 1 y 2

Gen a detectar	Tamaño de Amplificado (pb)	Oligonucleótido original	Secuencia 5'- 3'	Referencia
<i>lytA</i>	319	681-701	CAACCGTACAGAATGAAGCGG	Nagai y col., 2001
		999-978	TTATTCGTGCAATACTCGTGCG	
Pilus 1	360	pQE30C5	ATCAGGATCCGCTCTGTGTTTTTCTCTTGTATGG	Basset y col., 2007
<i>rrgC</i>		pQE30C3	ATCCGCATGCATCAATCCGTGGTCGCTTGTTATTTTTA	
Pilus 1	469	TTM301	ACTTGTTGATGTTGGTAGCCTGTT	
<i>srtC-3</i>		TTM302	TTCCGACGGTAAAATAATCTCTGT	
Pilus 2	1094	INTFor	ATGGCTTCAGGGGCTATGTTCCGGTG	Bagnoli y col., 2008
Segmento PI-2		1009Rev	TAAGGATCACCAAAGTCCAAGGCA	

Tabla 4. Mezcla de reactivos utilizados para la detección del gen *lytA* y de los pili tipo 1 y 2.

Reactivos	Pilus tipo 1			Pilus tipo 2
	<i>lytA</i>	<i>rrgC</i>	<i>srtC-3</i>	INT-F-1009r
ADN	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Buffer (10X)	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2 µl
MgCl ₂ (25mM)	2,5 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Oligonucleótidos Forward (10pmol/µl)	2,5 µl	3 µl	3 µl	2 µl
Oligonucleótidos Reverse (10pmol/µl)	2,5 µl	3 µl	3 µl	2 µl
dNTP's (10mM)	1,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2 µl
H ₂ O estéril	11,2 µl	9,8µl	9,5µl	12,8µl
<i>Taq</i> Polimerasa*	0,3 µl	0,2 µl	0,5 µl	0,2 µl
Volumen final	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

*: Para los amplificadores menores a 800pb se usará la *Taq* polimerasa de Fundaim® (5U/µl). Para los amplificadores mayores de 800pb se usará la DFS-*Taq* DNA polimerasa (5000U/mL) de BIORON®.

(Tomado de Nagai y col., 2001; modificado de Basset y col., 2007 y Bagnoli y col., 2008)

Tabla 5. Condiciones de amplificación para la detección del gen *lytA* y de los pili tipo 1 y 2.

Etapas	<i>lytA</i>			<i>rrgC</i> y <i>srtC-3</i>			Pilus tipo 2		
	°C	Tiempo	Ciclos	°C	Tiempo	Ciclos	°C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 min	1	94	2 min	1	94	2 min	1
Desnaturalización	94	15 seg	30	94	30 seg	30	94	15 seg	34
Alineación	53	15 seg		55	30 seg		58	30 seg	
Extensión	72	15 seg		72	1 min		72	1 min	
Extensión final	72	5 min	1	72	5 min	1	75	5 min	1

(Tomado de Nagai y col., 2001, Basset y col., 2007 y Bagnoli y col., 2008)

4. Revelación de los amplificadores de PCR.

Los productos obtenidos en las reacciones de PCR descritas previamente se cargaron en geles de agarosa al 1% (Anexos 1 y 2) teñidos con bromuro de etidio (Sigma) 0,5 mg/mL. Para observar el amplificado, se realizaron corridas electroforéticas, con solución TAE 1X, a 80 voltios durante 30 minutos en una cámara marca Cleaver Mini y se fotografiaron a través del sistema UVP BioDoc It™ System. Como indicador del tamaño del amplificado se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kb (BIONEER).

5. Análisis Estadístico de Resultados:

Los datos obtenidos de la caracterización molecular de los pili tipo 1 y 2 en las cepas en estudio se presentaron en tablas y gráficos. El procesamiento estadístico se realizó utilizando el Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 15.0. Los resultados fueron analizados mediante la aplicación del Chi-Cuadrado (χ^2) y las variables fueron consideradas con significancia estadística cuando la $p \leq 0,05$.

www.bdigital.ula.ve

RESULTADOS

Las 41 cepas de *S. pneumoniae* estudiadas fueron aisladas de niños con enfermedad neumocócica invasiva. De estos casos, 51,2% (21/41) tuvieron diagnóstico de meningitis y 48,7% (20/41) presentaron enfermedades no meníngeas (Tabla 6): de estas, 14 cepas se aislaron de niños con neumonía bacteriémica, 4 con peritonitis y 2 con sepsis (datos no mostrados).

Tabla 6. Distribución de cepas de *S. pneumoniae* según el tipo de enfermedad invasiva.

Enfermedad	Cepas	
	Nº	%
Meníngeas	21	51,2
No Meníngeas	20	48,7
Total	41	100

(Datos proporcionados por el Grupo Peruano de Investigación en Neumococo (GPIN), Lima, Perú)

La distribución de los serotipos capsulares entre las 41 cepas de *S. pneumoniae* estudiadas fue: 19F, 21,9% (9); 6B, 19,5% (8); 14, 19,5% (8); 23F 14,6% (6); 19A, 9,8% (4); 6A, 4,8% (2) y 34, 2,4% (1). Tres cepas a las que no se les pudo identificar el serotipo con los antisueros disponibles, fueron clasificadas como no tipificables (NT) (Tabla 7). El 75,6% (31/41) de las cepas presentó algunos de los serotipos vacunales: 6B, 14, 19F y 23F. Sin embargo, no hubo distinción en la distribución de los tipos capsulares entre las cepas causantes o no de enfermedad meníngea, excepto en el caso donde el serotipo 6A no se detectó entre el grupo de cepas causantes de meningitis y el serotipo 34 en las productoras de enfermedad no meníngea.

Tabla 7. Distribución de serotipos capsulares entre las cepas de *S. pneumoniae* causantes de enfermedad invasiva

Serotipos	Cepas Meníngeas	Cepas No Meníngeas	Total Cepas	
	Nº	Nº	Nº	%
6A	-	2	2	4,8
6B	3	5	8	19,5
14	6	2	8	19,5
19A	2	2	4	9,8
19F	5	4	9	21,9
23F	3	3	6	14,6
34	1	-	1	2,4
NT	1	2	3	7,3
Total	21	20	41	100

NT: No Tipificable

La frecuencia de resistencia a los antimicrobianos fue la siguiente: penicilina 56,1% (23/41), ceftriaxona 31,7% (13/41), eritromicina 60,9% (25/41), clindamicina 34,1% (14/41), tetraciclina 63,4% (26/41), trimetoprim/sulfametoxazol 90,2% (37/41) y cloranfenicol 24,4% (10/41). Todas las cepas fueron sensibles a rifampicina y vancomicina (datos no mostrados). La multirresistencia se observó en el 58,5% (24/41) de las cepas (Tabla 8). En general, la frecuencia de resistencia a los distintos antimicrobianos fue similar entre los pacientes con meningitis y con enfermedad no meníngea (rango: $p=0,110-0.520$). No obstante, la resistencia a penicilina y ceftriaxona fue mayor en niños con enfermedad meníngea ($p=0.0001$ y $p=0,043$, respectivamente) que en niños con enfermedad no meníngea.

La frecuencia de resistencia a los antimicrobianos fue similar entre los serotipos vacunales y no vacunales ($p=1,000$) (datos no mostrados).

Tabla 8. Frecuencia de resistencia a los antimicrobianos en cepas de *S. pneumoniae* causantes de enfermedad invasiva

Antimicrobianos	Cepas de <i>S. pneumoniae</i>						<i>p</i> *
	Meningeas		No Meningeas		Total		
	(n=21)		(n=20)		Cepas		
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Trimetoprim/Sulfametoxazol	20	54,0	17	45,9	37	90,2	0,343
Tetraciclina	11	42,3	15	57,7	26	63,4	0,197
Eritromicina	10	40,0	15	60,0	25	60,9	0,110
Penicilina	18	78,2	5	21,7	23	56,1	0,0001
Clindamicina	6	42,8	8	57,1	14	34,1	0,520
Ceftriaxona	10	76,9	3	23,1	13	31,7	0,043
Cloranfenicol	4	40,0	6	60,0	10	24,4	0,484
Multirresistencia	14	58,3	10	41,7	24	58,5	0,349

* Nivel de significancia *p* ≤ 0,05

A través de las PCR realizadas se logró la amplificación de bandas claramente visibles, bien definidas y separadas para la escalera y el control positivo, además de los genes *rrgC* (360 pb) y *srtC-3* (469 pb) en caso de presencia del pilus tipo 1 y/o la amplificación del segmento interno de la isla de patogenicidad 2 (1094 pb) en caso de la presencia del pilus tipo 2, en las cepas de estudio.

En el gráfico 1, se muestra la distribución de la detección de los genes *rrgC* y *srtC-3* codificantes del pilus tipo 1. Se encontró que el 51,2% de las cepas (21/41) presentaron pilus tipo 1, dado por la detección de los dos genes *rrgC* y *srtC-3* o por la presencia de uno de ellos. Entre las cepas con pilus tipo 1, a 11 cepas (26,8%) se les detectaron ambos genes *rrgC* y *srtC-3*, mientras que la presencia individual de estos, se determinó en 5 cepas para cada gen (12,2%). La detección negativa de pilus tipo 1 correspondió a la ausencia de ambos genes y fue observado en 48,7% de las cepas estudiadas (20/41).

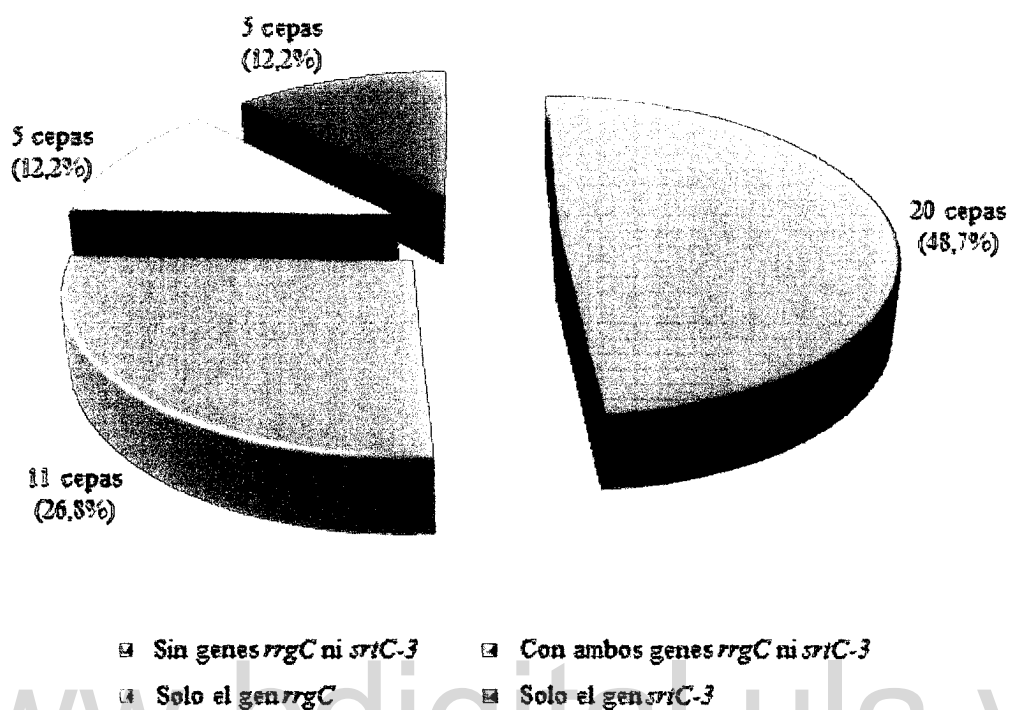


Gráfico 1. Presencia de los genes *rrgC* y *sriC-3*, codificantes del pilus tipo 1, en cepas de *S. pneumoniae* causantes de enfermedad invasiva

Aunque la presencia del pilus tipo 1 fue mayor en niños con meningitis que en niños con enfermedades no meníngeas [57,1% (n=12) versus 42,8% (n=9), respectivamente] esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,537$) (Gráfico 2).

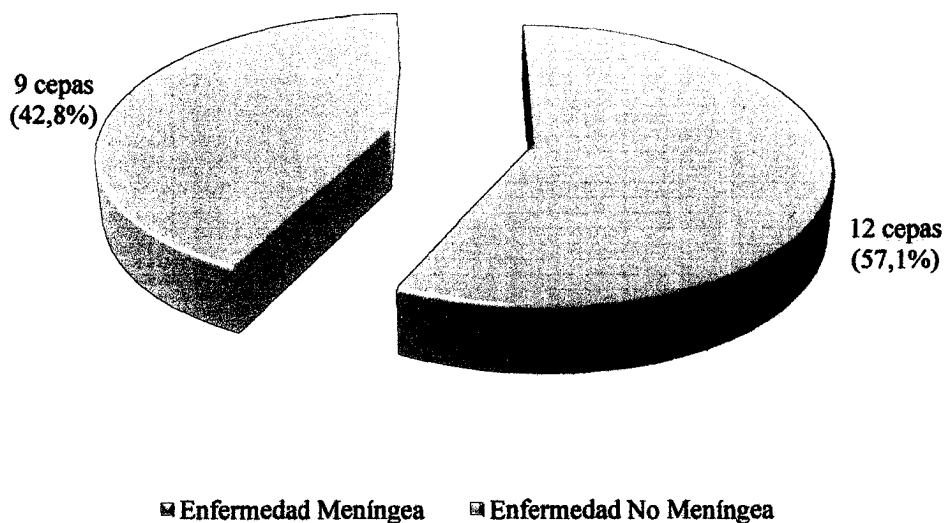


Gráfico 2. Presencia del pilus tipo 1 en cepas de *S. pneumoniae* según el tipo de enfermedad invasiva

La distribución por serotipos capsulares de los genes *rrgC* y *srtC-3*, codificantes del pilus tipo 1, se muestra en la tabla 9. A excepción del serotipo 34, dentro de cada tipo capsular se observaron cepas con y sin pilus tipo 1. La presencia de los genes *rrgC* y *srtC-3* fue variable en cada serotipo. Así por ejemplo, en algunas cepas de los serotipos 14, 19A, 19F, 23F y en las cepas no tipificables se detectaron ambos genes. Aquellas cepas en las que sólo se detectó el gen *srtC-3*, pertenecían a los serotipos 14, 19F y 23F. Las cepas en las que únicamente se pudo detectar el gen *rrgC* pertenecían a los serotipos 6A, 6B y 23F. La presencia del pilus tipo 1 fue similar entre los serotipos vacunales con un 51,6% (16/31) y no vacunales con un 50,0% (5/10) ($p=1,000$) (Gráfico 3).

Tabla 9. Distribución de los genes *rrgC* y *srtC-3* codificantes del pilus tipo 1 de acuerdo a los serotipos capsulares.

Serotipo	<i>rrgC</i>	<i>srtC-3</i>	Presencia de pilus 1	Ausencia de pilus 1
			Cepas piliadas/Cepas del serotipo (%)	Cepas sin pilus/Cepas del serotipo (%)
6A	1	0	1/2 (50,0)	1/2 (50,0)
6B	3	0	3/8 (37,5)	5/8 (62,5)
14	4	6	6/8 (75,0)	2/8 (25,0)
19A	2	2	2/4 (50,0)	2/4 (50,0)
19F	2	4	4/9 (44,4)	5/9 (55,6)
23F	2	2	3/6 (50,0)	3/6 (50,0)
34	0	0	0/1 (0)	1/1 (100)
NT	2	2	2/3 (66,6)	1/3 (33,3)
Total	16	16	21/41 (51,2)	20/41 (48,8)

NT: No Tipificable

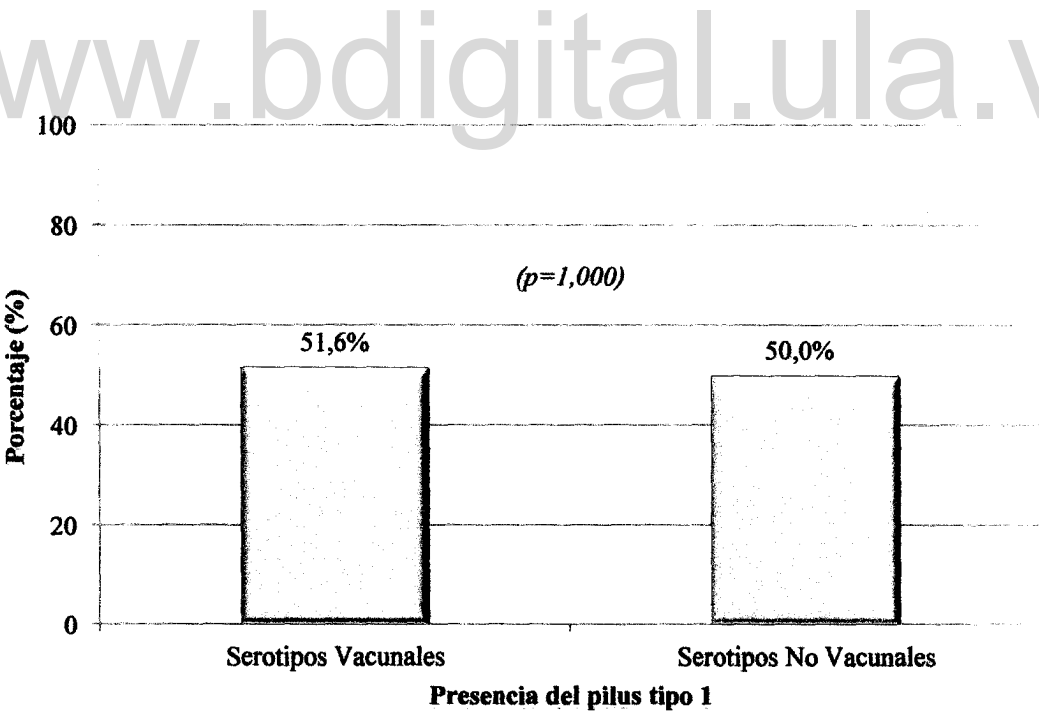


Gráfico 3. Presencia del pilus tipo 1 en cepas de *S. pneumoniae* en serotipos vacunales y no vacunales

La presencia del pilus tipo 1 entre las cepas de *S. pneumoniae* varió dependiendo de su resistencia a los antimicrobianos (Gráfico 4). En las cepas resistentes a clindamicina, penicilina, eritromicina, ceftriaxona y trimetoprim/sulfametoxazol y multirresistentes, la presencia de pilus tipo 1 fue considerablemente mayor (rango: 53,8% - 64,3%) que en las cepas susceptibles a esos antimicrobianos (rango: 25,0% - 50,0%). Por el contrario, en las cepas susceptibles a tetraciclina y cloranfenicol la presencia de pilus fue superior (53,3% y 54,8%, respectivamente) a la observada en los *S. pneumoniae* resistentes (50,0% y 40,0%, respectivamente). Sin embargo, en ninguno de los casos se encontró significancia estadística ($p=1,000$ y $p=0,484$, respectivamente).

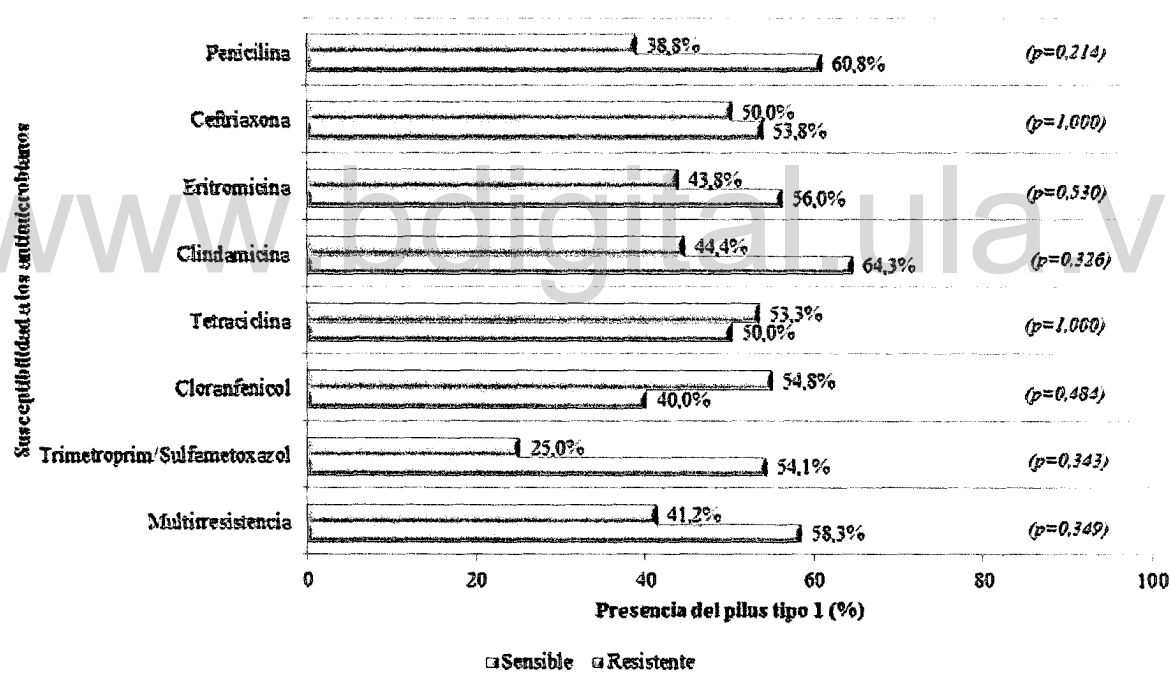


Gráfico 4. Presencia del pilus tipo 1 en cepas de *S. pneumoniae* susceptibles y resistentes a los antimicrobianos.

El pilus tipo 2 se observó en el 17,1% (7/41) de las cepas. Es de hacer notar que, en la mayoría de las cepas con pilus tipo 2 (85,7%; 6/7) también se detectó el pilus tipo 1. A diferencia de lo observado con el pilus tipo 1, el pilus tipo 2 fue más frecuente en cepas

causantes de enfermedades no meníngeas (57,1%; 4/7) que en cepas meníngeas (42,8%; 3/7) (Gráfico 5). Sin embargo, no se encontró una relación estadística significativa entre la presencia del pilus tipo 2 y el tipo de enfermedad causada por *S. pneumoniae* ($p=0,696$).

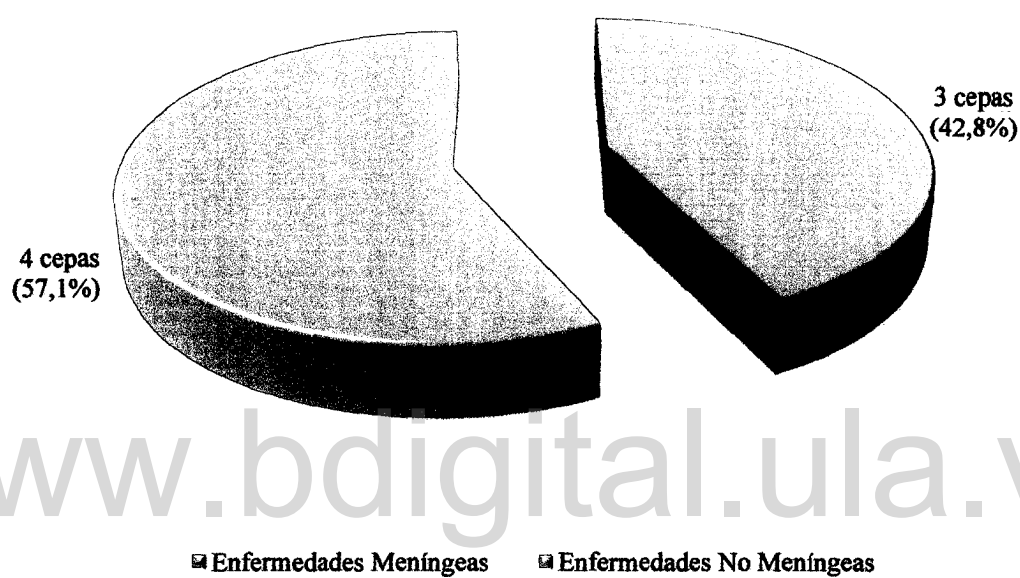


Gráfico 5. Presencia del pilus tipo 2 en cepas de *S. pneumoniae* según el tipo de enfermedad invasiva.

El pilus tipo 2 estuvo presente sólo en el 9,7% (3/31) de las cepas con serotipo vacunal y en el 40,0% (4/10) de las cepas de serotipo no vacunal, por lo que la presencia del pilus tipo 2 resultó ser significativa en las cepas de serotipo no vacunal ($p=0,047$) (Gráfico 6).

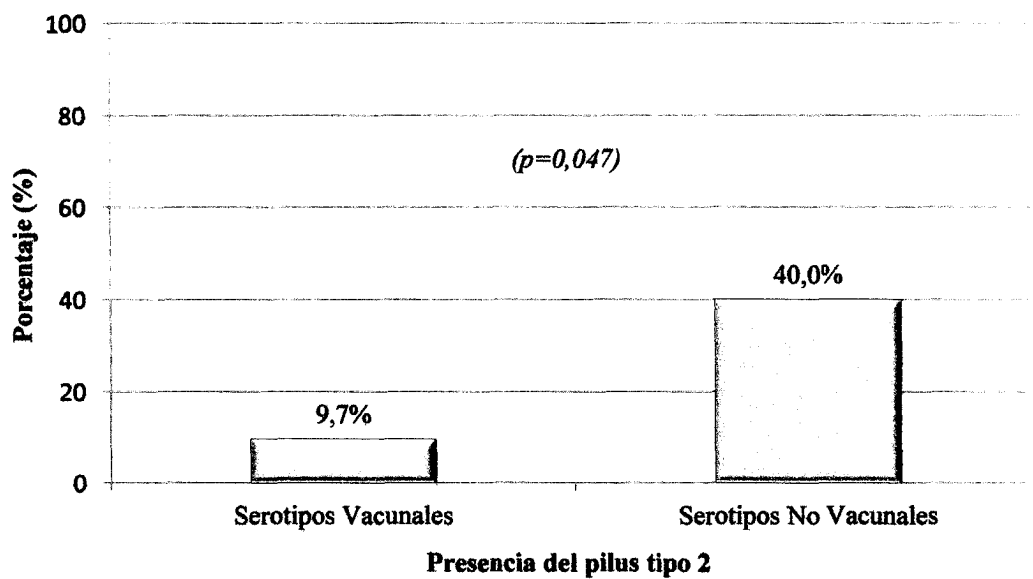


Gráfico 6. Presencia del pilus tipo 2 en cepas de *S. pneumoniae* en serotipos vacunales y no vacunales.

Como puede observarse en la tabla 10, el pilus tipo 2 estuvo presente sólo en cepas de *S. pneumoniae* de los serotipos 19A, 19F y en cepas no tipificables.

Tabla 10. Distribución del pilus tipo 2 de acuerdo a los serotipos capsulares.

Serotipo	Presencia pilus 2	Ausencia pilus 2
	Cepas piliadas/Cepas del serotipo (%)	Cepas sin pilus/Cepas del serotipo (%)
6A	0/2 (0)	2/2 (100)
6B	0/8 (0)	8/8 (100)
14	0/8 (0)	8/8 (100)
19A	2/4 (50,0)	2/4 (50,0)
19F	3/9 (33,3)	6/9 (66,7)
23F	0/6 (0)	6/6 (100)
34	0/1 (0)	1/1 (100)
NT	2/3 (66,6)	1/3 (33,3)
Total	7/41 (17,1)	34/41 (82,9)

NT: No Tipificable

En las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a los agentes antimicrobianos, la presencia del pilus tipo 2 fue considerablemente mayor (18,9-35,7%) que en las cepas susceptibles (0-14,3%) (Gráfico 7). La diferencia en la frecuencia del pilus tipo 2 fue mucho más marcada y estadísticamente significativa, entre cepas resistentes y susceptibles a clindamicina, (35,7% vs 7,4%, respectivamente, $p=0,035$).

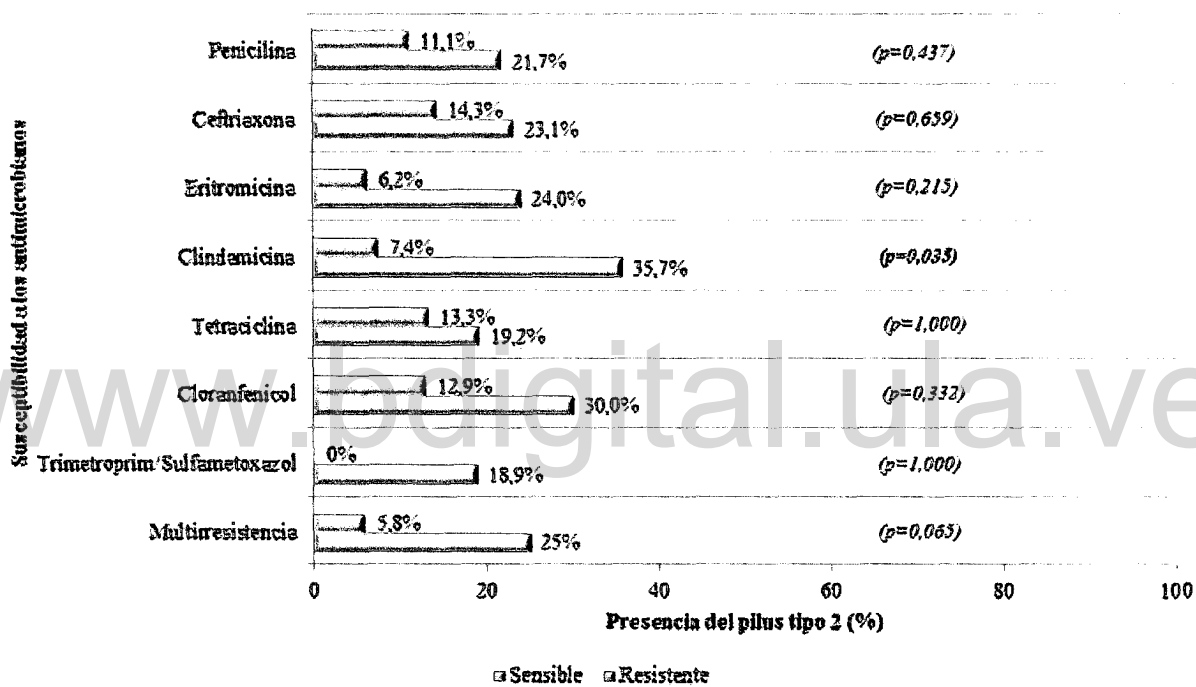


Gráfico 7. Presencia del pilus tipo 2 en cepas de *S. pneumoniae* en cepas resistentes y sensibles según el antimicrobiano.

DISCUSIÓN

El uso masivo de la vacuna anti-neumocócica polisacárida heptavalente en varias regiones del mundo ha traído como consecuencia el predominio de serotipos no vacunales, que expuestos a la presión selectiva de los antimicrobianos, han adquirido diversos mecanismos de resistencia. Este hecho ha reducido el impacto preventivo de la vacunación polisacárida y ha provocado la circulación cada vez más frecuente de cepas resistentes (Bogaert y col., 2004; Sandgren y col., 2004; Klugman y Welsh, 2005).

En Perú y otros países en desarrollo se ha encontrado una elevada frecuencia de resistencia a los antimicrobianos de uso común para el tratamiento de las infecciones neumocócicas. Por lo tanto, se ha debilitado la tan deseada reducción de las secuelas y mortalidad producida por el uso de una terapéutica inicial empírica. En estos niños es prioritario el uso de vacunas realmente efectivas para prevenir el desarrollo de infecciones neumocócicas (Lynch y Zhanel, 2009; Ochoa y col., 2010).

En este contexto, las investigaciones apuntan hacia la búsqueda de blancos bacterianos que sirvan para el diseño de vacunas neumocócicas más efectivas. A ese respecto, Barocchi y col. (2006) propusieron que las proteínas del pilus tipo 1 podían representar un blanco novedoso para el desarrollo de una nueva vacuna. Sin embargo, la escasa información acerca de la distribución de este apéndice entre cepas de *S. pneumoniae* a nivel global, dificulta predecir la cobertura real de una vacuna basada en este pilus. De hecho, este es el primer estudio en documentar la presencia y distribución de los pili 1 y 2 en cepas de *S. pneumoniae* en Latinoamérica.

Por otra parte, Moschioni y col. (2008) y Muzzi y col. (2008), consideran que los genes *rrgC* y *srtC-3*, usados de manera individual, son los marcadores genéticos más indicados para la pesquisa epidemiológica del pilus tipo 1. En este estudio, se logró detectar solo uno de los genes *rrgC* o *srtC-3* en algunas cepas con pilus tipo 1. Este hecho revela posibles variaciones

en las secuencias descritas previamente para estos genes y con las cuales se elaboraron los oligonucleótidos utilizados. Esta posible diversidad de secuencias en los genes *rrgC* y/o *srtC-3* podría haber surgido como consecuencia de los fenómenos de recombinación genética intra e interespecies que ocurren frecuentemente en *S. pneumoniae* y que le confieren una amplia diversidad genética. Estos hallazgos permiten recomendar la detección combinada de más de un gen codificante del pilus tipo 1, con el objeto de evitar la falta de reconocimiento de variantes genéticas de la isla de patogenicidad 1. Adicionalmente, la secuenciación de las posibles variantes de los genes *rrgC* y *srtC-3* encontradas en este estudio, ofrecería la posibilidad de diseñar nuevos oligonucleótidos que permitan ampliar la detección de cepas piliadas de *S. pneumoniae*.

En esta investigación la frecuencia de pilus tipo 1 (51,2%) fue mucho más alta que la reportada en estudios previos (16,6% a 31,5%) (Basset y col., 2007; Aguiar y col., 2008; Bagnoli y col., 2008; Moschioni y col., 2010; Regev-Yochay y col., 2010; Rodrigues de Aguiar, 2011). Tales diferencias pueden ser explicadas, en parte, por el uso de dos marcadores moleculares en vez de uno, como lo hicieron en las investigaciones previas. Por otra parte, el origen invasivo de las cepas analizadas en este estudio, pudiera explicar una mayor frecuencia de pilus 1 que en cepas colonizadoras y/o productoras de enfermedad no invasiva utilizadas en las otras investigaciones.

De manera interesante, los resultados de la distribución de serotipos revelaron que un 75,6% de cepas tenían serotipo vacunal, por lo que, el uso de una vacuna polisacárida no brindaría protección contra el desarrollo de infecciones invasivas a 24,4% de los niños peruanos. Afortunadamente, el 50% de las cepas no vacunales tenían el pilus tipo 1, y por lo tanto, la adición de proteínas del pilus 1 a una vacuna polisacárida podría aumentar la cobertura de serotipos y la prevención de enfermedad neumocócica invasiva hasta un 88%, aproximadamente.

Con respecto al pilus tipo 2, se encontró una frecuencia de 17,1%, similar a la reportada en investigaciones previas, y que varía entre 7% y 33% (Bagnoli y col., 2008; Moschioni y col., 2010 b; Zahner y col., 2010; Rodrigues de Aguiar, 2011). La presencia del pilus 2 estuvo

restringido a los serotipos 19A y 19F y a las cepas no tipificables. De manera similar, en la literatura se encuentra evidencia de la relación entre el pilus tipo 2 y los serotipos 1, 2, 7F, 11A, y en especial con los tipos 19A y 19F (Bagnoli y col., 2008; Moschioni y col., 2010 b; Zahner y col., 2010; Rodrigues de Aguiar, 2011). Es de hacer notar, que el tipo capsular 19A ha tomado un gran auge en los últimos años, siendo frecuentemente asociado con infecciones invasivas y en cepas multirresistentes a drogas, y ha sido considerado uno de los serotipos neumocócicos no vacunales más peligrosos (Facciotti, 2010). Con miras a prevenir la enfermedad y reducir la diseminación de la resistencia asociadas a este serotipo, es recomendable mantener un seguimiento cercano de la distribución y del potencial de virulencia del pilus tipo 2 en las cepas circulantes de *S. pneumoniae*.

Esta investigación mostró una mayor frecuencia de pili 1 y 2 en cepas resistentes a los antimicrobianos. De hecho, se encontró una relación estadísticamente significativa entre la presencia de pilus 2 y la resistencia a la clindamicina. De manera similar, el pilus 1 ha sido encontrado más frecuentemente en cepas resistentes a penicilina (51%) eritromicina (53%) y tetraciclina (41%) que en las cepas susceptibles a esos antimicrobianos (21%, 23% y 32%, respectivamente) (Moschioni y col., 2008). Por el contrario, el pilus 2 ha sido relacionado con la adherencia del microorganismo, pero no con la resistencia a los antimicrobianos (Facciotti, 2010).

La nasofaringe de los individuos sanos, en especial de los niños, esta colonizada por cepas de *S. pneumoniae* que en su mayoría se comportan como comensales y no producen enfermedad. Por lo tanto, el objetivo de una vacuna anti-neumocócica ideal sería preservar la flora bacteriana con bajo potencial patogénico y evitar la colonización por cepas más virulentas y resistentes a los antimicrobianos. Los resultados de esta investigación sugieren que el uso de una vacuna basada en antígenos polisacáridos y pilus tipo 1 podría prevenir más infecciones neumocócicas invasivas en los niños peruanos que la vacuna polisacárida-conjugada heptavalente.

Debido a la similitud existente entre las condiciones sociales, económicas y culturales de Perú con Venezuela y otros países de Latinoamérica, es posible que los resultados obtenidos

en la presente investigación reflejen la situación que se vive al respecto con las cepas circulantes de la región. Sin embargo, y debido a las diferencias existentes en la distribución de cepas según las diferentes regiones geográficas, es necesario realizar estudios locales que aporten información específica sobre las características de las cepas que circulan en Venezuela.

www.bdigital.ula.ve

CONCLUSIONES

Luego de realizados los análisis sobre las cepas de *S. pneumoniae*, resistentes a los antimicrobianos, aisladas de niños con enfermedad invasiva de Lima, Perú durante el lapso 2006-2008, concluimos que:

- ✓ La frecuencia del pilus tipo 1, determinada por la amplificación conjunta de los genes *rrgC* y *srtC-3* de la isla de patogenicidad 1, fue mayor que la frecuencia del pilus tipo 2, indicado por la amplificación de un segmento interno de la isla de patogenicidad 2 (51,2% vs 17,1%, respectivamente). La presencia de ambos genes *rrgC* y *srtC-3* codificantes del pilus 1 (51,2%) fue mayor que la amplificación de cada uno de ellos por separado (39,0% para cada gen). Asimismo, en algunas cepas con pilus tipo 1 se logró detectar sólo uno de los genes *rrgC* o *srtC-3*, revelando posibles variaciones en las secuencias de estos genes.
- ✓ El pilus 1 fue más frecuente en cepas meningéas, mientras que el tipo 2 lo fue en cepas no meningéas. Sin embargo, no se encontró relación estadísticamente significativa entre la presencia de alguno de los pili y el tipo de enfermedad neumocócica (Pilus 1: $p=0,537$ y Pilus 2: $p=0,696$)
- ✓ La frecuencia del pilus 1 fue similar entre los serotipos vacunales y no vacunales ($p=1,000$), mientras que el pilus tipo 2 estuvo asociado significativamente a los tipos no vacunales ($p=0,047$). A excepción del serotipo 34, dentro de cada tipo capsular se observaron cepas con pilus tipo 1. El pilus tipo 2 estuvo presente sólo en *S. pneumoniae* de los serotipos 19A y 19F y en cepas no tipificables.
- ✓ En general, las cepas resistentes a los antimicrobianos mostraron una mayor frecuencia de pili 1 y 2, y se encontró una relación estadísticamente significativa entre la presencia de pilus 2 y la resistencia a la clindamicina ($p=0,035$).

RECOMENDACIONES

- ✓ Con la finalidad de lograr una óptima detección del pilus 1 en estudios epidemiológicos, recomendamos realizar la amplificación conjunta de los genes *rrgC* y *srtC-3*.
- ✓ Recomendamos realizar la secuenciación de las posibles variantes de los genes *rrgC* y *srtC-3* encontradas en este estudio, para ofrecer la posibilidad de diseñar nuevos oligonucleótidos que permitan ampliar la detección de cepas piliadas de *S. pneumoniae*.
- ✓ En los niños peruanos es recomendable el uso de una vacuna anti-neumocócica a la que se adicione proteínas del pilus 1, con lo cual se podrían reducir las infecciones invasivas producidas por cepas resistentes y con serotipos no vacunales.
- ✓ Recomendamos mantener la vigilancia epidemiológica del pilus 2 en cepas no vacunales, y en especial del serogrupo 19, con la finalidad de esclarecer el potencial antigénico y patogénico de este pilus.
- ✓ Recomendamos realizar la caracterización molecular de los pili 1 y 2 en las cepas de *S. pneumoniae* que circulan en Venezuela para determinar la presencia de estas estructuras y su distribución según el tipo de enfermedad causada, el serotipo vacunal o no vacunal y la resistencia a los antimicrobianos.

ANEXOS

Anexo 1. Preparación del gel de agarosa al 1%

Mezclar

- 0,5 grs de agarosa
- 50 ml de TAE 1X

Disolver bien sobre una plancha de calor hasta que la mezcla esté totalmente transparente.

Al gel de 50mL se le colocan 65µl bromuro de etidio (0,5 mg/mL).

Colocar los peines en la cámara electroforética y verter la mezcla con cuidado de que no queden burbujas. Dejar solidificar por 20 minutos aproximadamente.

Una vez preparado el gel, se vierte solución TAE 1X en la cámara para realizar la corrida electroforética.

Anexo 2. Preparación de la solución Tris Acetato EDTA (TAE)

Se utilizó una solución de Tris Acetato EDTA (TAE 1X) para preparar el gel de agarosa al 1%.

Preparación de la TAE 50X

Mezclar

- 242 gr de Tris Base
- 57.1 mL ácido acético
- 100 mL EDTA 0,5M a PH 8
- Agua destilada hasta completar 1 litro

Revisar el pH de la solución y llevar a pH 8 con NaOH, si es necesario.

Para diluir la solución TAE 50X hasta 1X se colocan 10 cc de TAE 50X en 490 cc de agua destilada.

Anexo 3. Preparación del buffer de carga (3X) y carga de los amplificados en el gel.

Preparación del buffer de carga

Mezclar

- 0,0125 grs de azul de bromofenol
- 1,5 mL de glicerol
- 0,5 mL de EDTA 0,5 M
- Agua destilada hasta completar un volumen final de 10 mL (concentración de 3X).

De cada muestra se toman 10µl de amplificado y se mezclan con 2µl de Buffer de carga (3X), los cuales se colocan en cada pozo del gel.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aanensen, D., Mavroidi, A., Bentley, S., Reeves, P., y Spratt, B. (2007). Predicted functions and linkage specificities of the procts of the *Streptococcus pneumoniae* capsular biosynthetic loci. *Journal of Bacteriology*, 189(21), 7856-7876.
- Aguiar, S., Serrano, I., Pinto, F., Melo-Cristino, J., y Ramirez, M. (2008). The presence of the pilus locus is a clonal property among pneumococcal invasive isolates. *BMC Microbiology*, 8(41), 1-11.
- Albiger, B., Blomberg, C., Dagerhamn, J., Normark, S., y Henriques-Normark, B. (2008). Genomic or pahogenicity islands in *Streptococcus pneumoniae*. In M. Hensel, y H. Schmidt, *Horizontal Gene Transfer in the Evolution of Pathogenesis* (pp. 217-236). New York, New York, USA: Cambrigde University Press.
- AlonsoDeVelasco, E., Verheul, F., Verhoef, J., y Snippe, H. (1995). *Streptococcus pneumoniae*: Virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiological Reviews*, 59(4), 591-603.
- Bagnoli, F., Moschioni, M., Donati, C., Dimitrovska, V., Ferlenghi, I., Facciotti, C.y otros (2008). A second pilus type in *Streptococcus pneumoniae* is prevalent in emerging serotypes and mediates adhesion to host cells. *Journal of Bacteriology*, 190(15), 5480-5492.
- Barocchi, M. A., Ries, J., Zogaj, X., Hemsley, C., Albiger, B., Kanth, A.y otros (2006). A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *PNAS*, 103(8), 2857-2862.
- Basset, A., Trzcinski, K., Hermos, C., O'Brien, K., Reid, R., Santosham, M.y otros (2007). Association of the pneumococcal pilus with certain capsular serotypes but not with increased virulence. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(6), 1684-1689.
- Bergmann, S., y Hammerschmidt, S. (2006). Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology*, 152, 295-303.
- Bogaert, D., de Groot, R., y Hermans, P. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 4, 144-154.
- Boulnois, G. (1992). Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of General Microbiology*, 138, 249-259.
- Brueggemann, A., Griffiths, D., Meats, E., Peto, T., Crook, D., y Spratt, B. (2003). Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone- specific differences in invasive disease potential. *Journal of Infectious Diseases*, 187, 1424-1432.

Centers for Disease Control and Prevention. (n.d.). *Centers for Disease Control and Prevention*. Recuperado de http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/drugresisstreppneum_t.htm

CLSI. (2012). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. *CLSI documento M100-S22*, 32(3), 1-188.

Cossart, P., y Jonquieres, R. (2000). Sortase, a universal target for therapeutic agents against gram-positive bacteria? *PNAS*, 97(10), 5013-5015.

Cundell, D., Gerard, N., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I., y Tuomanen, E. (1995). *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature*, 377, 435-438.

Facciotti, C. (2010). *Structural and functional characterization of second pilus type in Streptococcus pneumoniae*. Tesis doctoral, Universidad degli Studi di Padova, Padua, Italia.

Gianfaldoni, C., Censini, S., Hilleringmann, M., Moschioni, M., Facciotti, C., Pansegrau, W. y otros (2007). *Streptococcus pneumoniae* pilus subunits protect mice against lethal challenge. *Infection and Immunity*, 75, 1059-1062.

Gillespie, S., y Balakrishnan, I. (2000). Pathogenesis of pneumococcal infection. *Journal of Medical Microbiology*, 49, 1057-1067.

Gorrotxategui Gorrotxategui, P., y Iturrioz Mata, A. (2010). Vacuna conjugada contra el neumococo. ¿Es una prevención universal adecuada de la enfermedad neumocócica? *Revista Pediatría de Atención Primaria*, 12(47), 443-455.

Gould, J., y Weiser, J. (2002). The inhibitory effect of C-reactive protein on bacterial phosphorylcholine platelet-activating receptor-mediated adherence is blocked by surfactant. *Journal of Infectious Diseases*, 186, 361-371.

Hacker, J., y Carniel, E. (2001). Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. *EMBO reports*, 21(51), 376-381.

Hanage, W., Kaijalainen, T., Herva, E., Saukkoriipi, A., Syrjänen, R., y Spratt, B. (2005). Using multilocus sequence data to define pneumococcus. *Journal of Bacteriology*, 187(17), 6223-6230.

Harfouche, C., Filippini, S., Gianfaldoni, C., Ruggiero, P., Moschioni, M., Maccari, S. y otros (2011). RrgB321, a Fusion Protein of the Three Variants of the Pneumococcal Pilus Backbone RrgB, Is Protective In Vivo and Elicits Opsonic Antibodies. *Infection and Immunity*, 451-460.

Hava, D., y Camilli, A. (2002). Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Molecular Microbiology*, 45(5), 1389-1405.

- Hemsley, C., Joyce, E., Hava, D., Kawale, A., y Camilli, A. (2003). MgrA, an orthologue of Mga, Acts as a transcriptional repressor of the genes within the *rlrA* pathogenicity islet in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 185(22), 6640-6647.
- Henriques-Normark, B., Blomberg, C., Dagerhamn, J., Bättig, P., y Normark, S. (2008). The rise and fall of bacterial clones. *Nature Reviews*, 6, 827-837.
- Hilleringman, M., Ringler, P., Muller, S., De Angelis, G., Rappuoli, R., Ferlenghi, I. y otros (2009). Molecular architecture of *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 pili. *The EMBO Journal*, 28, 3921-3930.
- Huang, S., Hinrichsen, V., Stevenson, A., Rifas-Shiman, S., Kleinman, K., Pelton, S. y otros (2009). Continued impact of pneumococcal conjugate vaccine on carriage in young children. *Pediatrics*, 124, e1-e11.
- Imai, S., Ito, Y., Ishida, T., Hirai, T., Ito, I., Maekawa, K. y otros (2009). High prevalence of multidrug-resistant Pneumococcal molecular epidemiology network clones among *Streptococcus pneumoniae* isolates from adult patients with community-acquired pneumonia in Japan. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(11), 1039-1045.
- Kadioglu, A., Weiser, J., Paton, J., y Andrew, P. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews*, 6, 288-301.
- Klugman, K. (2002). The successful clone: the vector of dissemination of resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(S2), 1-5.
- Klugman, K., y Welsh, K. (2005). Nasopharyngeal carriage of pneumococcal pediatric serotypes: a risk for acute and recurrent otitis media in children and for invasive disease in susceptible adults. *Journal of Infectious Diseases*, 191, 1790-1792.
- LeMieux, J., Woody, S., y Camilli, A. (2008). Roles of the Sortases of *Streptococcus pneumoniae* in Assembly of the RlrA Pilus. *Journal of Bacteriology*, 190(17), 6002-6013.
- Liddington, R. (2010). Catching Pneumonia. *Structure* 18, 6-8.
- Lynch, J., y Zhanel, G. (2009). *Streptococcus pneumoniae*: does antimicrobial resistance matter? *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 30(2), 210-238.
- Mandell, G., Bennett, J., y Dolin, R. (2010). *Principles and Practice of Infectious Diseases* (Séptima edición ed.). Philadelphia, USA: Elsevier.
- Mazmanian, S., Ton-That, H., y Schneewind, O. (2001). Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 40(5), 1049-1057.

- Melin, M. (2011). *Interplay of virulence factors in complement resistance of Streptococcus pneumoniae*. Tesis, Instituto Nacional para la Salud y el Bienestar, Departamento de Vacunación y Protección Inmune, Helsinki, Finlandia.
- Ministerio del Poder Popular para la Salud. (2009). *Anuario de Mortalidad 2007*. Recuperado de <http://www.ovsalud.org/doc/Anuario07.pdf>
- Miyashita, L. (2012). *Mechanisms of evolution in antibiotic resistant clones of Streptococcus pneumoniae*. Tesis doctoral, Universidad de Londres, Londres, Reino Unido.
- Moschioni, M., De Angelis, G., Melchiorre, S., Masignani, V., Leibovitz, E., Barocchi, M. y otros (2010 b). Prevalence of pilus-encoding islets among acute otitis media *Streptococcus pneumoniae* isolates from Israel. *Clin Microbiol Infect*, 16, 1501-1504.
- Moschioni, M., Donati, C., Muzzi, A., Masignani, V., Censini, S., Hanage, W. y otros (2008). *Streptococcus pneumoniae* contains 3 rlrA pilus variants that are clonally related. *The Journal of Infectious Diseases*, 197, 888-896.
- Moschioni, M., Emolo, C., Biagini, M., Maccari, S., Pansegrau, W., Donati, C. y otros (2010 a). The two variants of *Streptococcus pneumoniae* pilus-1 RrgA adhesin retain the same function and elicit cross-protection in vivo. *Infection and Immunity*, 5033-5042.
- Murray, P., Rosenthal, K., y Pfaller, M. (2009). *Microbiología Médica* (6ta ed.). Barcelona, España: Elsevier.
- Musher, D. (1992). Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clinical Infectious Diseases*, 14, 801-809.
- Muzzi, A., Moschioni, M., Covacci, A., Rappuoli, R., y Donati, C. (2008). Pilus operon evolution in *Streptococcus pneumoniae* is driven by positive selection and recombination. *PLoS ONE*, 3(11), e3660-e3670.
- Nagai, K., Shibasaki, Y., Hasegawa, K., Davies, T., Jacobs, M., Ubukata, K. y otros (2001). Evaluation of PCR primers to screen for *Streptococcus pneumoniae* isolates and β -lactam resistance, and to detect common macrolide resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 915-918.
- National Center for Biotechnology Information. (n.d.). *NCBI - National Center for Biotechnology Information*. Recuperado de www.ncbi.nlm.nih.gov
- Obaro, S., y Adegbola, R. (2002). The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines. *Journal of Medical Microbiology*, 51, 98-104.
- Ochoa, T., Egoavil, M., Castillo, M., Reyes, I., Chaparro, E., Silva, W. y otros (2010). Invasive pneumococcal diseases among hospitalized children in Lima, Peru. *Revista Panamericana Salud Pública*, 28(2), 121-127.

- Organización Mundial de la Salud. (2004). *Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo*. Atlanta, Georgia, USA.
- Organización Mundial de la Salud. (2010). *Estadísticas Sanitarias Mundiales*. Organización Mundial de la Salud.
- Organización Panamericana de la Salud. (2004). *Programa de vigilancia de los serotipos y resistencia antimicrobiana de Streptococcus pneumoniae y Haemophilus influenzae* (4 ed.). Colombia.
- Orihuela, C. (2008). *Streptococcus pneumoniae adhesion*. Recuperado de SciTopics: http://www.scitopics.com/Streptococcus_pneumoniae_adhesion.html
- Orihuela, C., Gao, G., Francis, K., Yu, J., y Tuomanen, E. (2004). Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *Journal of Infectious Diseases*, 190(9), 1661-1669.
- Pelton, S., Huot, H., Finkelstein, J., Bishop, C., Hsu, K., Kellenberg, J. y otros (2007). Emergence of 19A as virulent and multidrug resistant pneumococcus in Massachusetts following universal immunization of infants with pneumococcal conjugate vaccine. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 26, 468-472.
- Prado Marugán, G. d. (2008). *Adherencia de Streptococcus pneumoniae a poliestireno, patogenicidad e interferencia de antibióticos e ibuprofeno*. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología II, Madrid, España.
- Regev-Yochay, G., Hanage, W., Trzcinski, K., Rifas-Shiman, S., Lee, G., Bessolo, A. y otros (2010). Re-emergence of the type 1 pilus among *Streptococcus pneumoniae* isolates in Massachusetts, USA. *Vaccine*, 28, 4842-4846.
- Ries, J. (2007). *Pneumococcal pili and other cell surface properties affect the infection biology of Streptococcus pneumoniae*. Tesis doctoral, Instituto Sueco para el Control de Enfermedades Infecciosas - Karolinska Institutet, Departamento de Microbiología, Biología Tumoral y Celular, Estocolmo, Suecia.
- Rodrigues De Aguiar, S. (2011). *Molecular epidemiology of Streptococcus pneumoniae: impact of the PCV7 in the pneumococcal population responsible for invasive pediatric infections*. Tesis Doctoral, Universidad de Lisboa, Facultad de Medicina, Lisboa, Portugal.
- Rodríguez-Franco, D. A., Vázquez-Moreno, L., y Ramos-Clamont Montfort, G. (2005). Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(3-4), 102-111.
- Romero Cabello, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias* (3ra Edición ed.). Chapultepec Morales, México: Editorial Médica Panamericana.

- Schmidt, H., y Hensel, M. (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 14-56.
- Sjöström, K., Spindler, C., Ortquist, A., Kalin, M., Sandgren, A., Köhlmann-Berenzon, S. y otros (2006). Clonal and capsular type decide whether pneumococci will act as a primary or opportunistic pathogen. *Clinical Infectious Disease*, 42, 451-459.
- Tettelin, H., Nelson, K. E., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Read, T. D., Peterson, S. y otros (2001). Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science*, 293, 498-506.
- Ton-That, H., y Schneewind, O. (2003). Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Molecular Microbiology*, 50(4), 1429-1438.
- Tuomanen, E., Austrian, R., y Masure, R. (1995). Pathogenesis of pneumococcal infection. *The New England Journal of Medicine*, 332(19), 1280-1281.
- Valenzuela, M., O'Loughlin, R., De La Hoz, F., Gomez, E., Constenla, D., Sinha, A. y otros (2009). The burden of pneumococcal disease among Latin American and Caribbean children: review of the evidence. *Rev Panam Salud Publica*, 25(3), 270-279.
- Vesga, J., & Cortés L., J. A. (2006). Desarrollo, impacto y eficacia de la vacuna conjugada contra *Streptococcus pneumoniae* en América Latina. *Revista Chilena de Pediatría*, 77(4), 341-349.
- Weiser, J. (2010). The pneumococcus: why a commensal misbehaves. *Journal of Molecular Medicine*, 88, 97-102.
- Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. y otros (2008). *Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color* (6ta ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Wyres, K., Lambertsen, L., Croucher, N., McGee, L., von Gottberg, A., Liñares, J. y otros (2012). Pneumococcal capsular switching: an historical perspective. *Journal of Infectious Diseases*, 1-31.
- Zahner, D., Gudlavalleti, A., & Stephens, D. (2010). Increase in pilus islet 2-encoded pili among *Streptococcus pneumoniae* isolates, Atlanta, Georgia, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 16(6), 955-962.
- Zhang, J.-R., Mostov, K., Lamm, M., Nanno, M., Shimida, S.-I., Ohwaki, M. y otros (2000). The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell*, 102, 827-837.