

UNIVERSIDAD DE SONORA

UNIDAD REGIONAL NORTE

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS**

**Neumolisina como base para la elaboración de una
vacuna contra *Streptococcus pneumoniae***

TESIS TEÓRICA

**Que para obtener el Título de
QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO**

Presenta

Dora Luz Vega Hernández

H. CABORCA, SONORA

ABRIL-2010

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis teórica de **Dora Luz Vega Hernández**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de Químico Biólogo Clínico.

M.C. Ramón Efraín Lugo Sepúlveda
Director

Q.B. Rafael de la Rosa López
Secretario

M. C. María del Carmen García Moraga
Vocal

I. ÍNDICE

	Página
I. ÍNDICE	i
II. ÍNDICE DE FIGURAS	iii
III. ÍNDICE DE TABLAS	v
IV. ABREVIATURAS	vi
V. RESUMEN	ix
6. GENERALIDADES	11
7. ANTECEDENTES	15
8. OBJETIVOS	20
8.1 <u>Objetivo General</u>	20
8.2 <u>Objetivos Específicos</u>	20
9. INTRODUCCIÓN	21
9.1 <u>Características Microbiológicas de <i>Streptococcus pneumoniae</i></u>	21
9.2 <u>Factores de Virulencia</u>	25
9.2.1 Cápsula Polisacarídica	27
9.2.2 Pared Celular	33
9.2.3 Proteínas	36
9.2.4 Proteínas Intracelulares	38
9.2.5 Enzimas Hidrolíticas	42
9.2.6 Proteínas de Superficie	45
9.3 <u>Patogénesis</u>	48
9.3.1 Colonización y Adherencia	48
9.3.2 Inflamación e Invasión	49
9.4 <u>Mecanismos de Defensa</u>	51
9.4.1 Fagocitosis	51
9.4.2 Respuesta humoral a los antígenos Neumocócicos	54
9.4.3 Predisposición Genética	55
9.5 <u>Importancia Clínica de <i>Streptococcus pneumoniae</i></u>	58
9.6 <u>Sueroterapia</u>	62
9.7 <u>Prevención de la Infección Producida por <i>Streptococcus pneumoniae</i></u>	64
9.7.1 Vacunas constituidas por polisacáridos capsulares	66
9.7.2 Vacunas Conjugadas	68
9.7.3 Nuevas Vacunas a base de Neumolisina	71
10 CONCLUSIONES	74
11 BIBLIOGRAFÍA	76
12 APÉNDICE	90
12.1 <u>Tratamiento antibiótico</u>	90
12.1.1 β -lactámicos	90
12.1.2 Estructuras	92

12.1.3	Mecanismos de acción	93
12.1.4	Mecanismos de resistencia	94
12.2	<u>Método de Obtención de Neumolisina Recombinante</u>	95

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1..	Micrografía electrónica de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	22
2.	imagen al microscópio óptico de células de <i>S. pneumoniae</i> teñidas con tinta china.	28
3.	Imagen de la cápsula de <i>S. pneumoniae</i> al microscópio electrónico.	29
4.	Gráfica de serotipos capsulares de <i>S. pneumoniae</i> más comunes en niños menores de 5 años en Latinoamérica.	31
5.	Esquema de la pared bacteriana de <i>S pneumoniae</i> .	35
6.	Diagrama esquemático de los principales factores de virulencia en <i>S. pneumoniae</i> y su localización en la pared bacteriana.	37
7.	Representación esquemática de la citotoxicidad y mecanismos pro-inflamatorios por los cuales la neumolisina contribuye a la patogénesis de la neumonía y destruye el epitelio respiratorio, resultando en la diseminación extrapulmonar del neumococo.	41
8.	Estructura de las hidrolasas de la pared celular amidasa LytA, glucosamidasa LytB, lisozima LytC, y dos proteínas de unión a la colina (PspA y PspC).	45
9.	Activación de la vía alternativa del complemento en respuesta a un patógeno.	52
10.	Gráfica de distribución mundial de la mortalidad por causas específicas en niños menores de 5 años, UNICEF, 2008.	60

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Principales factores de virulencia de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	26
2.	Porcentaje de muertes por neumonía en menores de 5 años por región, UNICEF 2004	61

IV ABREVIATURAS

ALPO₄	Fosfato de Aluminio
APCS	Antígeno de Impedimento Celular
Caps-Ps	Polisacáridos Capsulares
°C	Grado Centígrado
CBDS	Dominios de Unión a la Colina
CBM	Módulo Responsable del Reconocimiento a la Colina
CbpA	Proteína A de unión a la Colina
CBPs	Proteínas de Unión a la Colina
CIM	Concentración Mínima Inhibitoria
CRM₁₂₇	Mutante por Reacción Cruzada de la Proteína Diftérica
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> cepa C7 β127
CWH	Hidrolasas de la Pared Celular
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Fc	Receptores específicos para anticuerpos
GAPP	Plan de Acción Mundial para la Prevención y Control de la
	Neumonía
Hrs.	Horas
Hyl	Hialuronidasa
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IRA	Infecciones Respiratorias Agudas
KDa	Kilo Daltons
LTAs	Ácidos Lipoteicoicos
LytA	Autolisina A
LytB	Autolisina B
LytC	Autolisina C
MBL	Lectina de Unión a la Manosa
Mg.	Miligramo
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MIP-2	Proteína Inflamatoria 2 de los Macrófagos
mL.	Mililitro
mM.	Milimetro
NAG	N-Acetilglucosamina
NAM	N-Acilmurámico

OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PAFr	Receptor del Factor Activador de Plaquetas
PBP_s	Proteínas de Unión a la Penicilina
PBS	Solución Salina Amortiguada por Fosfatos
Pce	Fosforilcolín Esterasa
PCV-7v	Vacuna Polisacáridica Conjugada 7 valente
PCV-9v	Vacuna Polisacáridica Conjugada 9 valente
PIgR	Receptor Inmunoglobulina Polimérica
PLY	Neumolisina
PMNs	Polimorfonucleares
PsaA	Adhesina A de Superficie Neumocócica
PspA	Proteína A de Superficie Neumocócica
PspC	Proteína C de Superficie Neumocócica
TAs	Ácidos Teicoicos
TCD₄	Linfocitos T Cooperadores
Th1	Células Cooperadoras T-Tipo 1
Th2	Células Cooperadoras T-Tipo 2
TLR	Receptor de Unión a la Membrana
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
µg.	Microgramo
UNICEF	Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VN 23-v	Vacuna Antineumocócica 23 valente

V. RESUMEN

Streptococcus pneumoniae o neumococo como se llama habitualmente es el agente causal de mayor importancia de neumonía neumocócica adquirida en la comunidad a nivel mundial, está estimado que, uno a dos millones de adultos y al menos un millón de niños mueren por infecciones neumocócicas cada año. A diferencia de otros Streptococos, el neumococo posee una cápsula polisacáridica con propiedades antigénicas y con capacidad para evadir los mecanismos de respuesta del hospedero lo cual dificulta su eliminación.

Actualmente la vacuna antineumocócica polisacáridica 23-valente, compuesta por 23 polisacáridos capsulares de 23 serotipos de las cepas mayormente aisladas, es administrada en algunos países y su uso está indicado para mayores de 2 años y grupos de adultos con riesgo de adquirir una enfermedad neumocócica, esta vacuna induce respuesta inmunológica T-independiente; por lo cual su eficacia es limitada en niños menores de 2 años y adultos mayores de 65 años, no induce inmunidad de recuerdo, y solo confiere respuesta inmunológica contra los 23 serotipos contenidos en la vacuna. Para resolver este problema se elaboró la vacuna antineumocócica polisacárida conjugada 7-valente y se introdujo al mercado en el año 2000. La vacuna conjugada heptavalente está compuesta de polisacáridos de 7 serotipos neumocócicos de mayor importancia clínica, conjugada con la proteína CRM₁₂₇,

que actúa como transportador y activador de la respuesta inmunológica de los linfocitos T-dependientes; por lo tanto es efectiva en niños menores de 2 años y en adultos mayores de 65 años, así, como en pacientes esplenectomizados inmunosuprimidos o inmunocomprometidos, sin embargo, la inmunidad está limitada a los 7 serotipos incluidos en la vacuna.

Por consiguiente la necesidad de la elaboración de una vacuna de mayor efectividad y seguridad ante el neumococo, se encuentra latente.

En el presenta trabajo se propone a la neumolisina, una proteína neumocócica citolítica, con propiedades inmunológicas, capaz de desarrollar respuesta en células T-dependientes, memoria de recuerdo, así como conferir protección contra la infección neumocócica de todos los serotipos de importancia clínica productores de neumolisina, como base para la elaboración de una vacuna contra *Streptococcus Pneumoniae*.

6. GENERALIDADES

Streptococcus pneumoniae, o el neumococo, como se llama habitualmente, continúa siendo una causa fundamental de mortalidad y morbilidad entre personas de todas las edades. Es la causa más común de neumonía adquirida en la comunidad y una importante causa de otitis media, meningitis y septicemia. La neumonía neumocócica es el prototipo clásico a partir del cual han evolucionado los conceptos actuales sobre la patogenia de la neumonía.^{1,2}

Se estima que se producen alrededor de 500.000 casos de esta enfermedad cada año en los Estados Unidos. La incidencia es más alta en ciertos subgrupos, en los que se incluyen los niños menores de 5 años de edad, los adultos mayores de 65, la raza negra y los estadounidenses nativos. El motivo de esta distribución no se conoce, pero la pobreza y la salud debilitada son factores de riesgo. Así mismo ciertas enfermedades predisponen a las infecciones neumocócicas, entre ellas la anemia de células falciformes, la enfermedad de Hodking, el mieloma múltiple, la infección por HIV y la ausencia de bazo por cualquier motivo. El alcoholismo también es un factor de riesgo importante.²

Las infecciones neumocócicas son claramente estacionales, con la mayor incidencia durante el invierno y los primeros meses de la primavera. Gran parte

de los casos son esporádicos, pero se producen epidemias, en particular en instituciones residenciales, los cuarteles militares y los campos de trabajo, donde las personas están alojadas en condiciones de hacinamiento.²

Se cree que el reservorio de *S. pneumoniae* es el ser humano que aloja al microorganismo y no los animales o los objetos en el medio ambiente. La transmisión ocurre de forma directa de persona a persona.²

La colonización por los neumococos típicamente ocurre en la nasofaringe. El resultado puede ser: a) la depuración de los microorganismos, b) la persistencia asintomática durante varios meses (el estado de portador) o c) la progresión a una enfermedad.²

El resultado de la colonización está determinado por la virulencia intrínseca de la cepa colonizadora y por la eficiencia de los mecanismos de defensa del huésped. Algunos serotipos de *S. pneumoniae* son más virulentos que otros, algunos causan una enfermedad severa, mientras que otros por lo general se aíslan de la nasofaringe de personas asintomáticas. El intervalo entre la colonización y el comienzo de la enfermedad es variable, pero existen ciertas evidencias en cuanto a que es más probable que la enfermedad ocurra poco tiempo después de la colonización.²

La transmisión se lleva a cabo a partir de una persona enferma, o más habitualmente de un portador asintomático, ocurre por medio de las gotitas de las secreciones respiratorias que continúan siendo transportadas por el aire hasta una distancia de unos pocos metros, el portador asintomático tiene un

proceso dinámico en el cual se adquieren los neumococos, son transportados por periodos de semanas o meses, y luego desaparecen siendo un proceso asintomático que no produce enfermedad, los microorganismos infecciosos también pueden ser transportados en las manos contaminadas con secreciones. La transmisión se produce con rapidez y fácilmente en las familias y en las instituciones cerradas dado que hay muchos más portadores sanos que personas enfermas, la mayoría de los eslabones de la cadena de transmisión de una persona a otra son invisibles.³

La importancia actual de esta bacteria radica en el incremento de enfermedad causada por los mecanismos de multiresistencia a antibióticos.

Las causas de esta resistencia corresponden al uso imprudente de antibióticos, principalmente penicilinas y cefalosporinas de tercera generación (véase apéndice 12.1).⁴ Estos mecanismos de resistencia a antibióticos son más frecuentes en niños portadores que en adultos portadores, la resistencia a antibióticos contra *S. pneumoniae* esta usualmente asociada con un número limitado de serotipos y estos serotipos son frecuentemente causa de infecciones invasivas pediátricas.⁵

Los serogrupos mas comunes mundialmente son: 6, 14, 19 y 23, pero otros serogrupos semejantes son 1, 5 y 8 los cuales contribuyen bastante a la enfermedad neumocócica invasiva en niños jóvenes de ciudades en desarrollo. Aproximadamente el 90% de los aislamientos más frecuentes pertenecen a 23

serogrupos o serotipos los cuales están incluidos en la vacuna antineumocócica 23-valente (VN 23-v).⁶

La VN 23-v produce una buena respuesta inmune en mas del 80% de los adultos jóvenes sanos. El principal inconveniente es que produce una nula respuesta inmunógena en los niños menores de 2 años, una producción escasa de anticuerpos y no genera memoria inmunogénica. En pacientes inmunodeprimidos, enfermos crónicos y en mayores de 65 años presenta una respuesta disminuida.⁶

El desarrollo de nuevas vacunas propone la utilización de proteínas de superficie externa como la PspA y PspC, adhesinas de superficie neumocócica tal es la PsaA y factores de virulencia como la neumolisina o autolisina LytA, en busca de potentes inmunógenos que confieran protección contra varios neumococos.⁶

7. ANTECEDENTES

En el año 1881, el francés Luis Pasteur y el Norteamericano Carl Stember descubrieron de forma independiente en aislamientos orofaríngeos el germen que 5 años más tarde sería reconocido como el agente causal predominante de neumonía.⁷

En 1886 Fraenkel le confirió el nombre de *Pneumococcus* al demostrarse que era la causa más frecuente de neumonía lobar.⁷

Posteriormente Fred Neufeld (1869-1945) realizó una remarcable contribución, al identificar las características que diferencian a los neumococos de otras bacterias.⁸

En 1900 fué descrita la prueba de solubilidad en bilis y en 1902 la reacción de Quellung.⁸

En 1911 J. Morgenroth y R. Levy, reportaron el efecto protector en ratón de etilhidrocupreina (optoquina) un derivado de la quinina.⁸

Simultáneamente en 1913, el tratamiento de la neumonía neumocócica tipo 1 con antisuero equino específico tipo 1 fue iniciado en el Instituto Rockefeller, la reducción de mortalidad en un modelo de infección presentado en ratón fue de aproximadamente 50%.⁸

En 1920, y gracias a la morfología que adopta en la tinción Gram, pasó a llamarse *Diplococcus pneumoniae*.⁸

A principios de la década de 1920 Frederick Griffith (1877-1941) se interesó en definir las condiciones bajo las cuales variantes encapsuladas de *S. pneumoniae* tipo 2 podría recuperar la encapsulación y virulencia in vivo. Usando modelos animales, observó que la inoculación simultánea a ratones con la bacteria no virulenta viva (fenotipo rugoso), y el fenotipo virulento muerto (fenotipo liso), el resultado es el aislamiento del fenotipo liso en el ratón ya sin vida. La sustancia responsable de este inesperado mecanismo fenotípico fue denominada “principio transformador.”⁸

Más tarde en la década de 1930, la sulfapiridina, una sulfonamida probó su éxito moderado para el tratamiento de la neumonía neumocócica.⁸

En 1931 por Neufeld y R. Etinger-Tulczynska fue introducida la reacción de Quellung como el método preferido para tipificación de *S. pneumoniae*.⁸

Interesantemente, el neumococo juega un papel importante en el desarrollo de la inmunología, cuando Alphonse R. Dochez (1882-1964) y Oswald T. Avery (1877-1955) reportaron que la sustancia soluble específica del neumococo son los polisacáridos con propiedades antigénicas similares a las descritas previamente, exclusivas de las proteínas.⁸

En 1940 *Streptococcus pneumoniae* fue el más peligroso asesino de humanos, causó más problemas de salud que la enfermedad cardiovascular y el cáncer juntos.

En 1944 Avery, McLeod y McCarty, usaron el mayor factor de virulencia de los neumococos (los polisacáridos capsulares) proveniente de un fenotipo marcado, el cual demostró que los genes provienen del DNA.⁸

A principios de 1950, el uso generalizado de la penicilina, el descubrimiento de drogas contra la tuberculosis, y después el desarrollo y uso general de una vacuna contra la polio tuvieron efectos remarcables en las actitudes de científicos y clínicos hacia las infecciones. Stanley Falkow ilustró mejor esta situación, el recordó que, en 1960's algunas influencias científicas le sugirieron que el estudio de los microorganismos fueron una pérdida de tiempo.⁸

En 1963 se aisló la primera cepa con susceptibilidad disminuida a penicilina, y posteriormente se incremento la resistencia microbiana a antibióticos.⁸

La resistencia a penicilina en neumococos está basada en un complejo mutacional, vía que envuelve múltiples alteraciones en algunas proteínas blanco de las penicilinas, las PBPs.⁸

Fué en 1974 cuando gracias a los avances para la identificación microbiana, se incluyó en el género *Streptococcus* y se le otorgó el nombre actual, *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*).⁸

Conclusiones sobre la resistencia microbiana, junto con la persistencia de morbilidad y mortalidad asociada con las infecciones neumocócicas, influyeron en la introducción de un programa de vacunación el cual usó una vacuna antineumocócica polisacárida probada en los primeros años de 1960's. Basada sobre la eficacia total de una formula tetradecavalente, que incluía los 14 tipos

capsulares de más importancia en las infecciones en 1977 y fué posible la prevención del 78.5% de las infecciones originadas de los tipos incluidos en la vacuna, no obstante, esta vacuna tuvo poca distribución.⁸

En 1983, la formulación de la vacuna fué expandida a 23 serotipos capsulares, la vacuna más compleja administrada en humanos.⁸ La eficacia de esta vacuna en niños menores de 2 años fué nula y en personas mayores de 65 años presentaba títulos muy bajos de protección; por lo tanto, las indicaciones para el uso de la vacuna fueron muy específicas, como el uso en enfermedad renal crónica, esplenectomizados, pacientes inmunocomprometidos, VIH, todos mayores de 5 años.⁹

La necesidad de generar una mayor seguridad inmunogénica siguió el modelo de otras vacunas (la vacuna conjugada para *Haemophilus influenza*), para la elaboración de una vacuna conjugada la cual contendría 7 serotipos neumocócicos conjugados con un toxoide tetánico o diftérico, para que de esta manera se pueda generar respuesta inmunológica de los linfocitos T-dependientes, así, como memoria inmunológica en linfocitos B.⁹

En el 2000 se introdujo al mercado estadounidense la vacuna antineumocócica polisacárida conjugada 7-valente. Esta vacuna concede inmunogenicidad contra los 7 serotipos capsulares incluidos, sin embargo no protege contra los serotipos no incluidos. Por lo tanto, el hombre se ve en la necesidad de desarrollar nuevas vacunas con potencial profiláctico para los demás serotipos, proponiendo la utilización de proteínas comunes en *S.*

pneumoniae, una de las toxinas propuestas y de las más estudiadas actualmente es la neumolisina.⁹

8. OBJETIVOS

8.1 Objetivo General

Corroborar que la neumolisina es una opción prometedora para la elaboración de una nueva vacuna contra *S. pneumoniae*.

8.2 Objetivos Específicos

- Dar a conocer las propiedades inmunogénicas de la neumolisina contra la patogenicidad de la infección por *Streptococcus pneumoniae*.
- Realizar una comparación breve sobre la efectividad de las vacunas actuales y estudios recientes de la neumolisina como base para la elaboración de una vacuna.

9. INTRODUCCIÓN

9.1 Características Microbiológicas de *Streptococcus pneumoniae*

El neumococo es un coco Gram positivo encapsulado. Es un patógeno exclusivamente humano, las células miden 0.5 a 1.2 μ m de diámetro, tienen forma oval o lanceolada y se disponen en parejas o cadenas cortas (ver fig. 1). La morfología de las colonias varía. Las cepas encapsuladas forman en general colonias grandes (1 a 3mm. sobre agar sangre; más pequeñas en agar chocolate o sangre calentado), redondas mucoides y no pigmentadas. Las cepas no encapsuladas son más pequeñas y aparecen planas. Todas las colonias experimentan autólisis al envejecer (la porción central de la colonia se disuelve, lo que produce un aspecto umbilicado).¹⁰

Otra característica de neumococo es la producción de un halo de α -hemólisis cuando se incuba en agar sangre en condiciones aeróbicas debido a la producción de peróxido de hidrógeno. Una incubación anaerobia en el mismo medio produce β - hemólisis debido a la acción de la neumolisina.^{10,11}

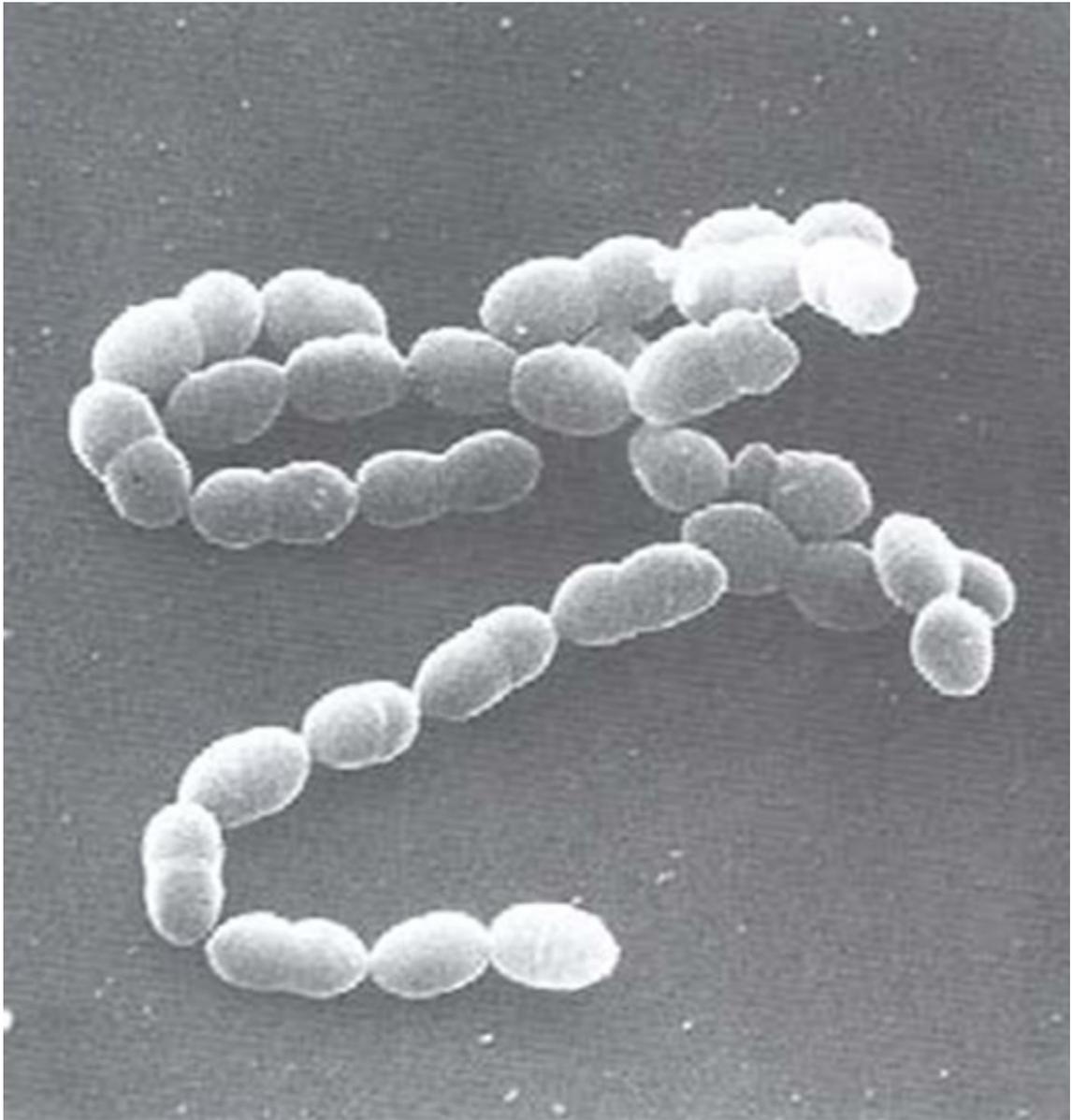


Fig.1. Micrografía electrónica de *Streptococcus Pneumoniae*.¹¹
Morfología del neumococo, cadenas cortas o en diplos, forma oval lanceolada.

El organismo tiene necesidades nutricionales delicadas y solo es capaz de crecer en medios enriquecidos y suplementados con productos hematológicos. *S. pneumoniae* fermenta varios hidratos de carbono, y el metabolito principal es el ácido láctico. Esta especie crece poco en medios con concentraciones altas de glucosa, debido a que el ácido láctico alcanza con rapidez niveles tóxicos. Como todos los estreptococos, *S. pneumoniae* carece de catalasa. A menos que se proporcione una fuente exógena de catalasa, el cúmulo de peróxido de hidrogeno producido mediante la oxidación de electrones durante la respiración bacteriana, inhibirá su crecimiento.^{10,11}

Se caracteriza por ser productor de neumolisina, ser un patógeno extracelular, y que se puede encontrar colonizando la nasofaringe en el ser humano.¹²

S. pneumoniae es sensible a la optoquina y en presencia de bilis o sales biliares se produce una destrucción o lisis bacteriana; estas características fenotípicas son la base para la identificación de especie. La susceptibilidad a optoquina se debe determinar sembrando un inóculo denso en placa de agar sangre de cordero y colocando en la superficie un disco impregnado con 5µg de optoquina; si después de 18hrs. de incubación de la cepa a 37°C se observa un halo de inhibición de crecimiento (dependiendo del disco comercial), y además se solubiliza en presencia de sales biliares a una concentración de 10%, esta cepa se define como *S pneumoniae*.¹³ El tamaño del halo de inhibición de esta

bacteria permite determinar con mayor precisión la susceptibilidad que presenta el neumococo frente a la penicilina.¹⁴

9.2. Factores de Virulencia

La virulencia de *Streptococcus Pneumoniae* está principalmente atribuida a los polisacáridos capsulares y proteínas como la neumolisina.¹⁵

Sin embargo, Yuste Lobo en sus trabajos, puntualiza que este microorganismo tiene la capacidad de ser virulento por muchos otros factores los cuales son presentados en la tabla 1.¹¹

Tabla 1. Principales factores de virulencia de *Streptococcus pneumoniae*.

FACTOR DE VIRULENCIA	MECANISMO PROPUESTO
Cápsula	Falta de la ruta alternativa del complemento Resistencia a la fagocitosis Deposición de componentes del complemento inactivos para la opsonización Nula o baja inmunogenicidad de algunos serotipos
Pared celular	Efecto inflamatorio <ul style="list-style-type: none"> • Activación de la ruta alternativa del complemento con resultado de producción de anafilotoxinas • Aumento de la permeabilidad vascular, degranulación de mastocitos y activación de células polimorfonucleares. • Aumento de la producción de IL-1, efecto citopático en el endotelio.
Neumolisina	Mediador en el ataque a células endoteliales. Efecto citolítico a altas concentraciones Efecto citotóxico a bajas concentraciones <ul style="list-style-type: none"> • Destrucción del epitelio e inhibición del movimiento ciliar • Inhibición de la actividad bactericida de las células polimorfonucleares. • Inhibición de la proliferación de linfocitos • Inhibición de la síntesis de anticuerpos
PspA	Activación del complemento Aumento de monocitos y producción de IL-1 β y TNF- α
Componente del complemento de unión al factor H	Unión al fragmento Fc de los anticuerpos Inhibición de la activación del complemento ^a Inhibición de la activación del complemento
LytA	Inhibición de la fagocitosis
Neuraminidasa ^b	Liberación de la neumolisina y productos de la pared celular
Permeasas	Exposición de receptores para los neumococos ^a
Peróxido de Hidrógeno	Aumentan la adhesión
Proteasa IgA1	Daño pulmonar ^a Contrarresta los mecanismos de defensa de las mucosas ^a

La mayoría de estos procesos se han observado sólo *in Vitro*

IL, Interleucina; TNF, Factor de Necrosis Tumoral

^a Estos mecanismos han sido sugeridos pero no demostrados

^b Este mecanismo de virulencia ha sido demostrado sólo en neuraminidasas virales.¹¹

9.2.1 Cápsula Polisacáridica

Las características estructurales de *Streptococcus pneumoniae* son similares a las del resto de los estreptococos; la excepción importante es su cápsula, compuesta de polisacáridos complejos de elevado peso molecular y con actividad antigénica, que envuelve completamente las células neumocócicas, la presencia de la capsula polisacáridica se puede observar mejor al microscopio óptico como lo indica la fig. 2 o al microscopio electrónico como se muestra en la fig. 3.¹⁶

Los Caps-PS son las bases para la clasificación y serotipificación de la bacteria. *S. pneumoniae* puede subdividirse en más de 90 serotipos diferentes en base a sus polisacáridos capsulares.¹¹

Los Caps-PS son polímeros de gran longitud de unidades repetidas lineales o ramificadas constituidas por 2 (serotipos 3, 37) a 8 (serotipos 17A) monosacáridos. Los distintos tipos de neumococo difieren significativamente en su virulencia. De los 90 serotipos conocidos actualmente, sólo un limitado número de 20 serotipos causan la mayoría (90%) de las enfermedades.¹¹

Se ha sugerido que dependiendo de cómo se depositen los componentes de la cascada del complemento en los Caps-PS, los serotipos de neumococo van a variar en su inmunogenicidad y resistencia a la fagocitosis.¹¹

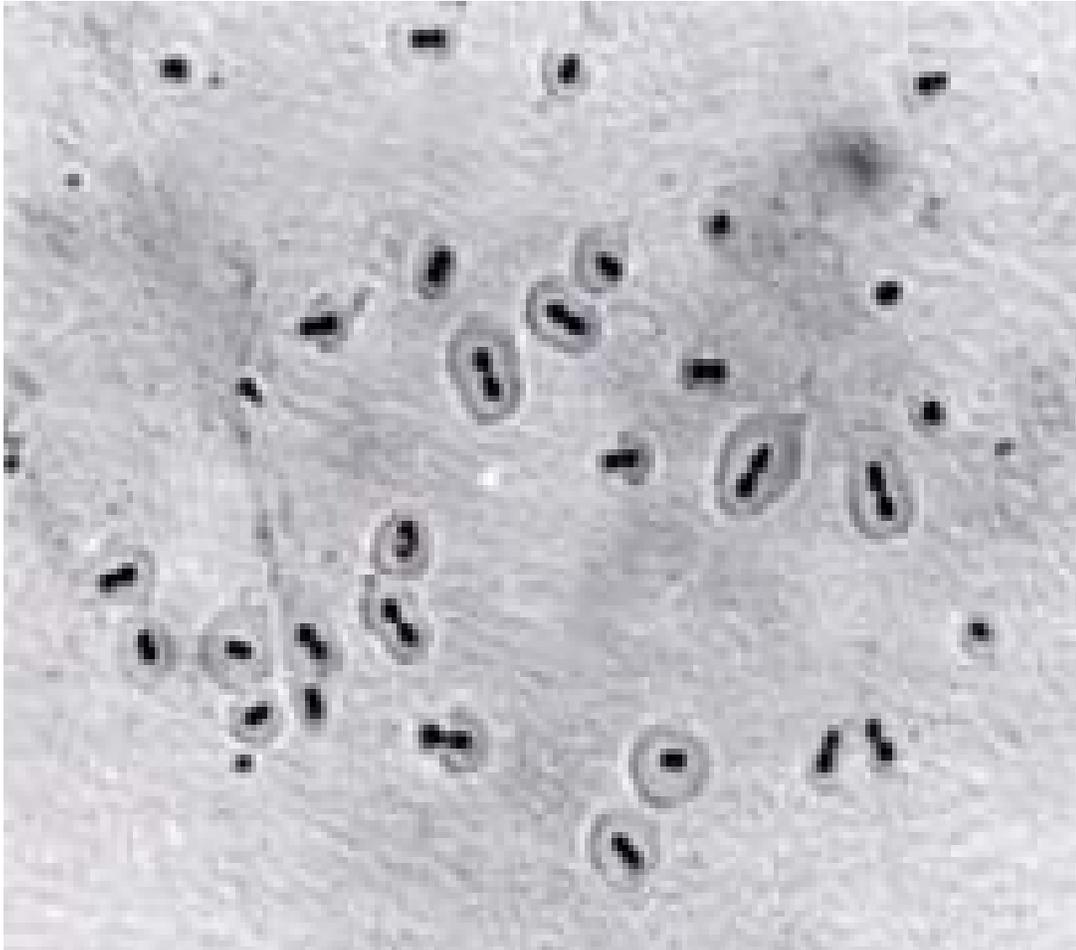


Fig. 2. Imagen al microscopio óptico de células de *S. pneumoniae* teñidas con tinta china.¹⁶

La observación en fresco de la capsula polisacarídica del neumococo es difícil, ya que su índice de refracción es similar al del medio. Para poder visualizarla con el microscopio óptico se recurre a una tinción negativa por medio de nigrosina o tinta china (técnica de Burri). Al ser una estructura muy hidratada (90%) de agua, su observación con las técnicas habituales de microscopía electrónica de transmisión y de barrido revela una notable contracción de su estructura. Además los colorantes habituales tienen poca afinidad hacia ella.¹⁶



Fig. 3. Imagen de la cápsula de *S. pneumoniae* al microscopio electrónico.¹⁶

En microscopía electrónica, hay que recurrir a la estabilización previa de la estructura capsular (para evitar su contracción ulterior) por medio de anticuerpos anticapsulares o de lectinas.

En datos obtenidos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) los serogrupos mas comunes mundialmente son 6, 14, 19 y 23, pero otros serogrupos como el 1, 5 y 8 tienen gran contribución en la enfermedad neumocócica invasiva en niños pequeños en ciudades en desarrollo.⁶ Si se observa la gráfica de la fig. 4, con relación a la prevalencia en Latinoamérica se puede percibir la presencia de varios de los serogrupos mencionados.¹⁷

La distribución de serotipos causantes de enfermedades varía entre región geográfica, edad y enfermedad dentro de las regiones. Aproximadamente el 90% de los aislamientos encontrados más frecuentemente pertenecen a 23 serogrupos o serotipos y están incluidos en la vacuna antineumocócica 23-valente.⁶

Los Caps-PS desarrollan anticuerpos específicos los cuales son importantes en la defensa del hospedero contra *S. pneumoniae*, ya que los anticuerpos anti-polisacáridos capsulares proveen protección al hospedero contra la invasividad e infección neumocócica.¹⁸

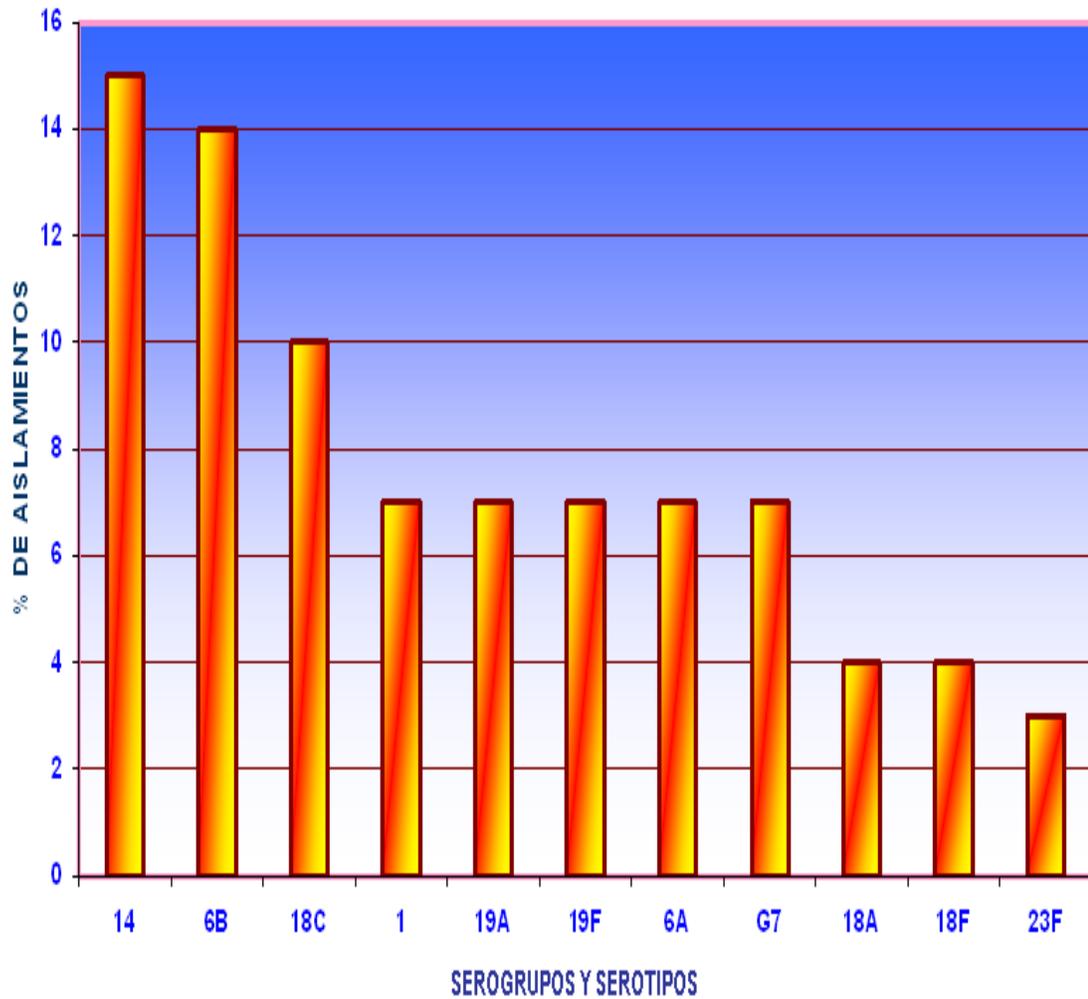


Figura 4. Grafica de serotipos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* mas comunes en niños menores de 5 años en Latinoamérica.¹⁷

La principal función atribuida a la cápsula polisacáridica de *Streptococcus pneumoniae* es la de su capacidad para eludir la acción fagocitaria de los macrófagos en ausencia de anticuerpos específicos.¹⁶ Inhibe también la activación del complemento por la vía alterna y degrada el fragmento C3b unido a la superficie bacteriana, por medio de proteínas específicas. La cápsula es polianiónica y modula el paso de moléculas y aniones al interior de la bacteria, la adherencia a superficies biológicas e inorgánicas, así como la formación de biopelículas y microcolonias.¹⁹

Cuando *S. neumoniae* crece en la superficie de un medio de cultivo sólido, la cápsula da lugar a colonias con una apariencia brillante y lisa. Estas células reciben el nombre de formas "S" (del inglés *smooth*). Sin embargo, después de cultivos prolongados en medios artificiales, algunas células pierden esta capacidad de formar cápsula, y la superficie de sus colonias aparece rugosa "R" (del inglés, *rough*). Con la pérdida de la cápsula la bacteria también pierde su virulencia.²⁰

9.2.2 Pared Celular

La pared celular es una estructura rígida que rodea la membrana citoplasmática.⁷ El componente principal de la pared celular de *S. pneumoniae* es el peptidoglicano, constituido por largas cadenas de polisacárido unidas por enlaces peptídicos. El componente del polisacárido consiste en unidades alternas de los azúcares NAG y NAM, con TAs anclados a través de enlaces fosfodiéster. La pared celular está también constituida por LTAs, químicamente idénticos a los ácidos teicoicos pero anclados a la membrana celular mediante un grupo acilo graso C- terminal (esferas en rojo en la fig. 5). Los TAs (esferas naranjas) y LTAs son carbohidratos fosfatados ricos en colina. Este es un elemento esencial en la biología de *S. pneumoniae* ya que la colina se adhiere específicamente a los receptores de unión a la colina, situados en todas las células humanas. Las CBPs están unidas a los TAs o LTAs de la pared celular vía dominios de unión de la colina (diagrama de cintas en rojo).¹⁶

Todas las CBPs comparten un dominio de unión a la colina C-terminal común mientras que los N-terminales de las CBPs son distintos, indicando que sus funciones son distintas. La familia de CBPs incluye terminales tan importantes de la virulencia como el antígeno de protección PspA, localizado en la pared celular del neumococo, las autolisinas LytA, B y C y la adhesina CbpA. El antígeno neumocócico de superficie PsaA está situado debajo de la capa de

peptidoglicano y está unido a la membrana celular. Las PBPs están situadas en el espacio periplásmico, interactuando con el peptidoglicano y muestran una única hélice transmembranal N-terminal (en azul). La Hyl está unida al peptidoglicano por un motivo LPXTG.¹⁶

El neumococo posee la capacidad de causar daño mediante una fuerte respuesta inflamatoria provocada por los componentes de su pared celular, dada por un exceso de concentración mayor a 100,000 partículas/mL.¹⁹

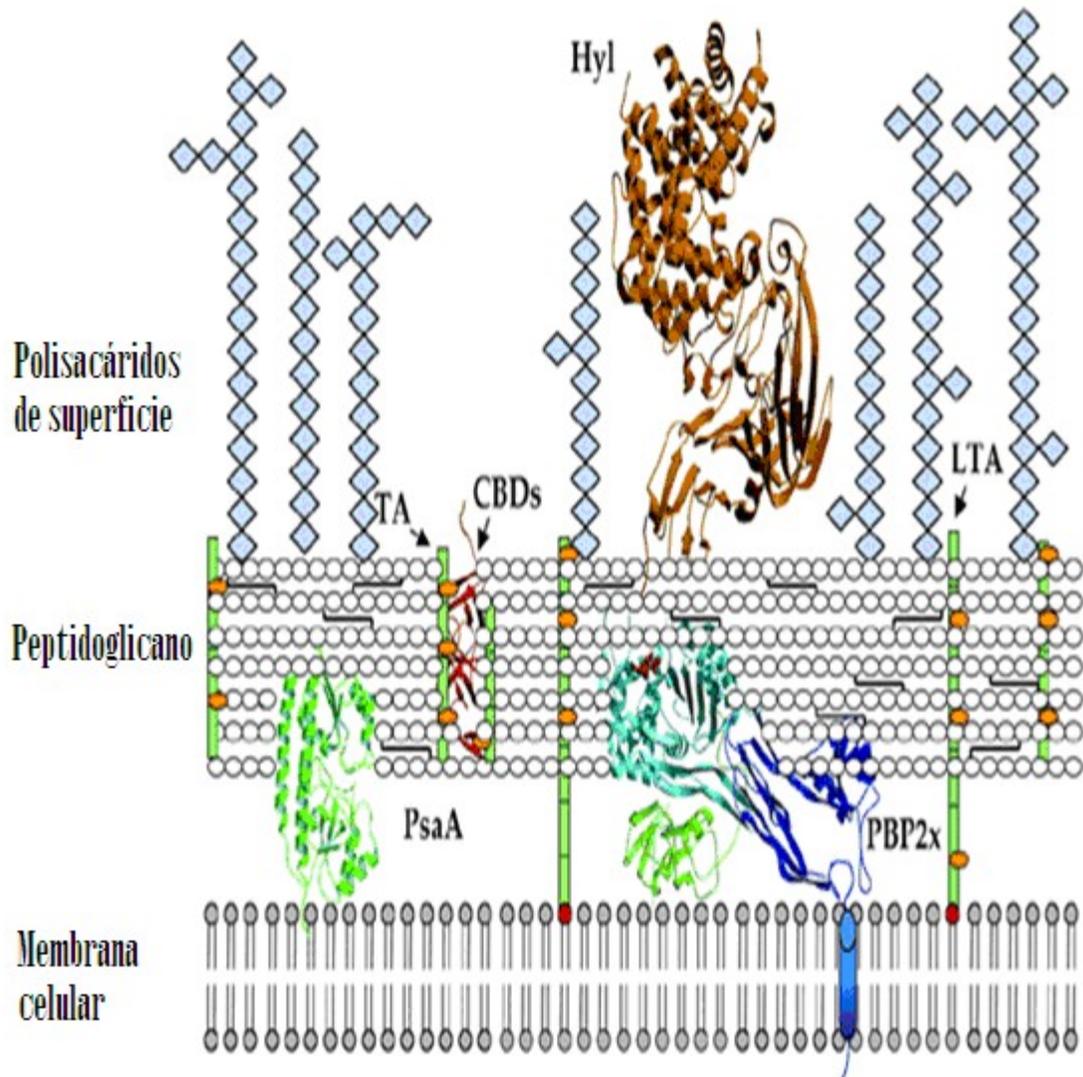


Figura 5. Esquema de la pared bacteriana de *S. pneumoniae* ¹⁶

9.2.3 Proteínas

Aparte de la cápsula polisacáridica, las proteínas también juegan un papel importante en la patogénesis de *Streptococcus pneumoniae*, particularmente la neumolisina, que es una endolisina tóxica, las proteínas de superficie como la PspA, neuraminidasas, hialuronidasa, y enzimas líticas, capaces de desarrollar mecanismos que afecten al huésped, como inducir inflamación, lisis, e inhibir mecanismos de defensa, como LytB, LytC, Pce o PspA, que son proteínas ancladas a la superficie del neumococo mediante el reconocimiento de restos de colina pertenecientes a los ácidos teicoicos de la pared celular del neumococo.²¹ En la fig 6 se muestra la ubicación de algunas proteínas mencionadas.

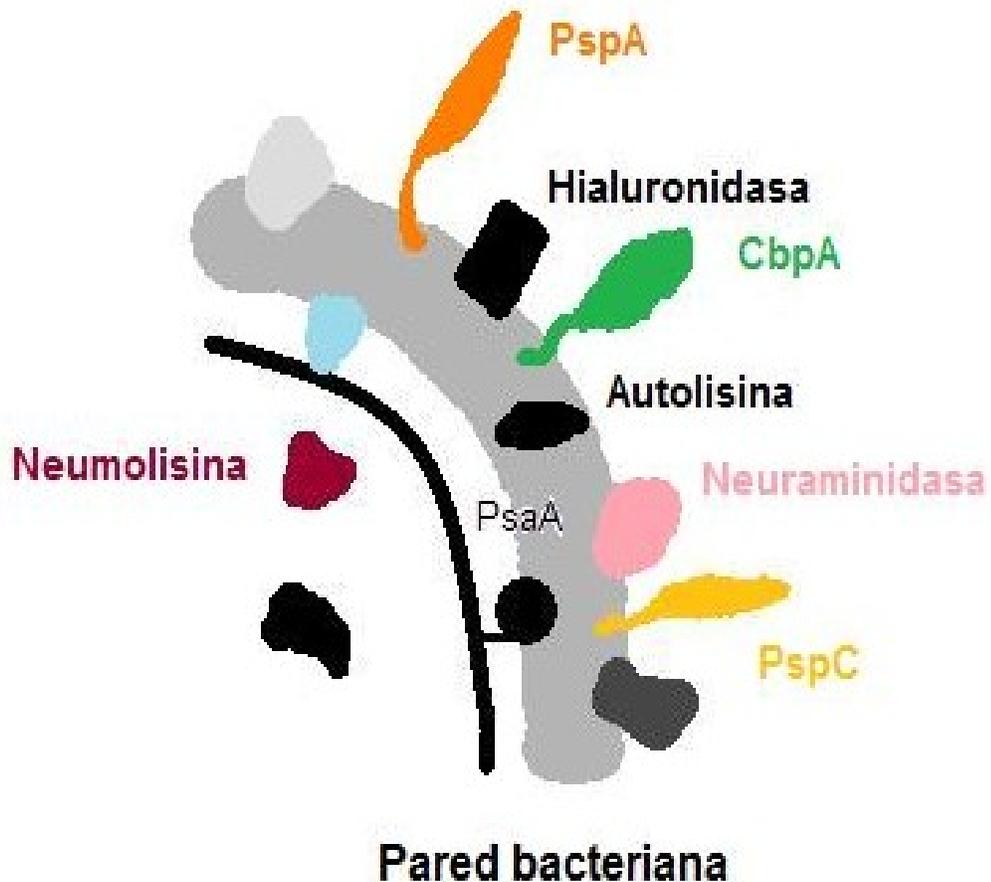


Figura 6. Diagrama esquemático de los principales factores de virulencia en *S. pneumoniae* y su localización en la pared bacteriana. ¹⁶

El diagrama anterior muestra la neumolisina ubicada dentro de la pared celular y a la autolisina LytA mediadora de la liberación de neumolisina, además de otras proteínas que influyen como factores de virulencia en la invasividad del *S. pneumoniae*.

9.2.4 Proteínas Intracelulares

Una de las proteínas producidas por *S. pneumoniae* más estudiadas es la neumolisina (PLY) que es una hemolisina intracelular perteneciente a la familia de las hemolisinas tiol-dependientes, la cual se destaca por ser la citolisina principal del neumococo, es conocida como un factor de virulencia y hasta ahora considerada por muchos investigadores como candidato antigénico para las técnicas serológicas empleadas en el diagnóstico de este microorganismo.²²

Por ser una hemolisina tiol-dependiente, PLY es una molécula antigénica y tiene la propiedad de inducir respuesta inmune en animales inmunizados, es un hecho que también pacientes infectados por neumococo desarrollan anticuerpos para esta proteína.²²

La neumolisina es producida por la mayoría de las cepas de *Streptococcus pneumoniae* (principalmente las de importancia clínica), y puede ser obtenida en el laboratorio clínico mediante técnicas o métodos simples de purificación; por lo tanto, es considerada por varias investigaciones en la elaboración de un conjugado neumolisina-polisacárido para el desarrollo de una vacuna para humanos.²²

Es una proteína tóxica de 53-kDa la cual consiste en 471 aminoácidos y es predominantemente monomérica en solución, citolítica de unión al colesterol.

A altos niveles PLY lisa todas las membranas celulares que contienen colesterol, en contraste con otras citolisinas esta se encuentra dentro del citoplasma y es liberada durante la lisis de la bacteria por la acción de la autolisina LytA. Está comprobado que PLY contribuye a la enfermedad mortal y que mutantes del gen PLY revelan virulencia reducida en ratones después de una exposición pulmonar.²³

Está compuesta de monómeros solubles que se incorporan al colesterol de las membranas celulares formando estructuras oligoméricas en forma de anillo, para generar un pre-poro el cual perfora la membrana para producir poros muy grandes que provocaran la lisis celular.²⁴

Posee propiedades citotóxicas y pro-inflamatorias, ambas son secundarias a la formación del poro. Los efectos citotóxicos de la neumolisina tienen lugar en el epitelio respiratorio ciliado, células del epitelio alveolar y células del endotelio pulmonar son los puntos principales del mecanismo por el cual la toxina promueve la colonización de las vías respiratorias por el neumococo y la enfermedad invasiva (para comprender el mecanismo véase la fig.7). PLY es un potente inhibidor del frecuente golpe ciliar del epitelio respiratorio ciliado humano, actividad que favorece la colonización y diseminación microbiana. En el caso de las células del epitelio alveolar y células del endotelio pulmonar, la toxina destruye los límites de los capilares alveolares, produciendo inundación alveolar, la cual no únicamente provee nutrientes a la bacteria sino que también favorece la diseminación extrapulmonar del

neumococo. La muerte de las células epiteliales y endoteliales resultan de la apoptosis y la necrosis, mecanismos consecuencia de la destrucción de la membrana plasmática mediada por la neumolisina.²⁵

A concentraciones sub-citolíticas PLY aumenta la actividad pro-inflamatoria de neutrófilos, macrófagos y monocitos; interacciones que en lugar de contribuir a la erradicación del neumococo, pueden favorecer la persistencia y diseminación microbiana a consecuencia del daño epitelial mediado por la inflamación.²⁵

Recientemente fue identificado un mecanismo adicional por el cual PLY puede exacerbar la destrucción epitelial mediada por la inflamación. Este mecanismo envuelve mediante la neumolisina, el aumento de la inactivación oxidativa del inhibidor α -1 proteasa, por quimioatrayentes activados de neutrófilos humanos, este a su vez conduce a una actividad no controlada de elastasa una toxina epitelial potente derivada de neutrófilos, mientras se oxida el inhibidor α -1 proteasa que de por si posee propiedades pro-inflamatorias que pueden intensificar la cascada inflamatoria. Por lo tanto es posible que la enfermedad neumocócica este acompañada por múltiples picos de ataque en el epitelio respiratorio mediada por PLY y otras citotoxinas, semejantes al peróxido de hidrógeno. Actuando en concierto con cantidades excesivas de elastasa derivado fagocítico y oxidantes reactivos generados durante la orquestada de la neumolisina, respuesta inflamatoria sobre-exuberante, estos eventos son resumizados en la figura 7. ²⁵

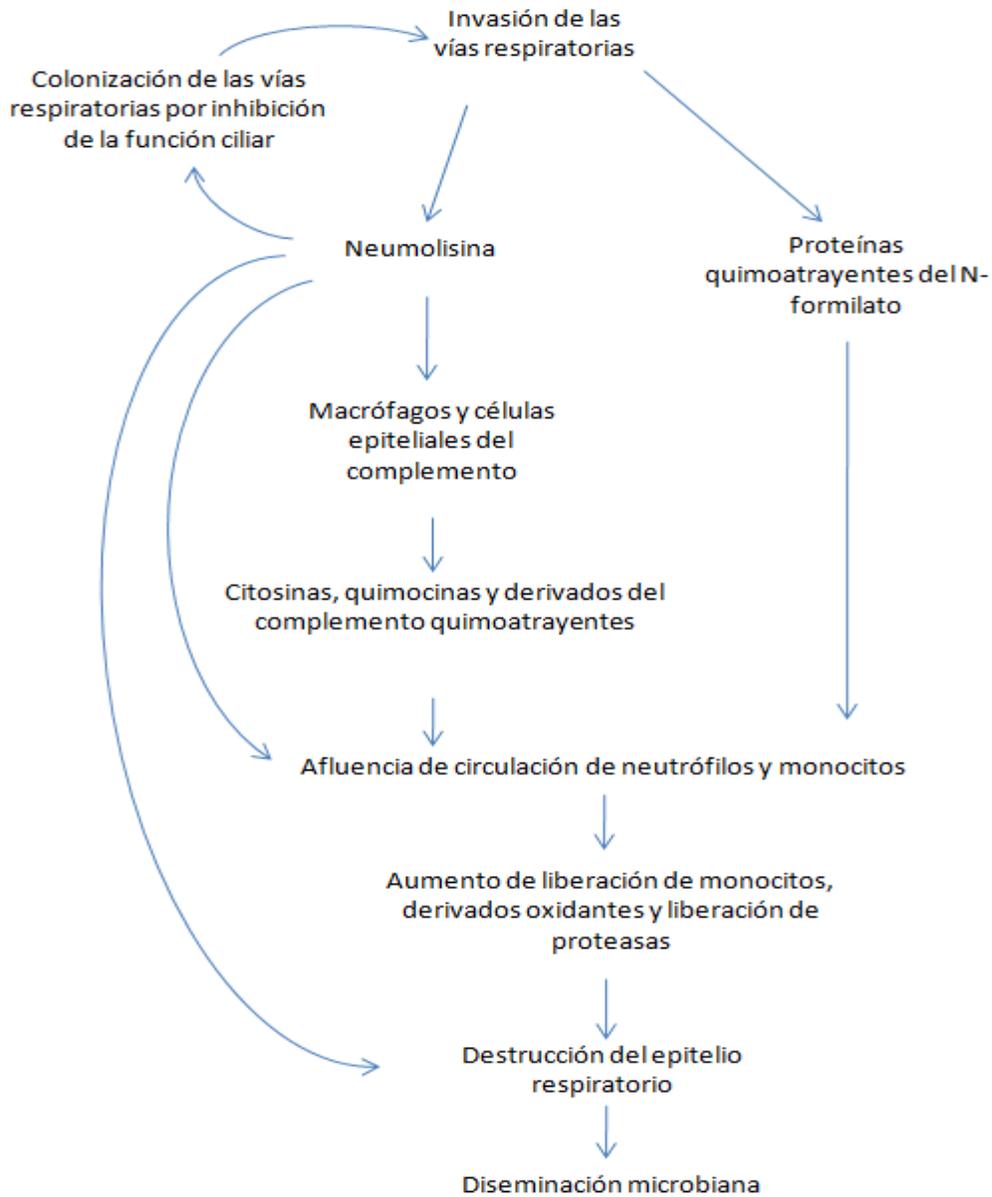


Figura 7. Representación esquemática de la citotoxicidad y mecanismos pro inflamatorios por los cuales la neumolisina contribuye a la patogénesis de la neumonía, y destruye el epitelio respiratorio, resultando en la diseminación extrapulmonar del neumococo.²⁵

9.2.5 Enzimas Hidrolíticas

La bacteria Gram positiva está rodeada por una capa de peptidoglicano (el glicano está compuesto por cadenas de repetidas unidades de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico ligado por uniones peptídicas) la cual le da su forma especial, por la que la célula bacteriana se expande, este rígido sáculo se adapta continuamente. La reestructuración requiere la acción de las mureínas hidrolasas, las cuales son enzimas endógenas capaces de degradar al peptidoglicano por clavado covalente unido a la pared celular.²⁶

Las hidrolasas de la pared celular (CWH) o enzimas líticas han sido encontradas en todas las bacterias eucarióticas estudiadas hasta ahora, y se considera que juegan un rol más importante en la biología de la bacteria, incluyendo la expansión, división y separación de células hermanas.²⁶

Las CWH de la pared celular son cruciales en la quimioterapia microbiana, son responsables de los efectos irreversibles causados por los antibióticos β -lactámicos. En base a su unión específica las enzimas líticas son clasificadas como: glicosidasas (lisozimas o muramidasa y glucosaminidasas), endopeptidasas y amidasa (ver figura 8)²⁶

Amidasa LytA es la proteína hidrolítica mayoritaria respecto a otras proteínas encontradas en el neumococo. Presenta 6 repeticiones de 20-23 aminoácidos secuenciados que forman el CBM. Tiene acción en la separación

de las células hijas en el proceso de división celular, provoca lisis en fase estacionaria o inducida por antibióticos β -lactámicos y algunos detergentes. Actúa hidrolizando el enlace amida entre la cadena glicánica y el péptido, específicamente entre el grupo D-lactilo del NAM y el grupo amino de la L-alanina. Su actividad lítica da lugar a la destrucción de la pared celular del neumococo permitiendo la liberación de neumolisina.²⁷

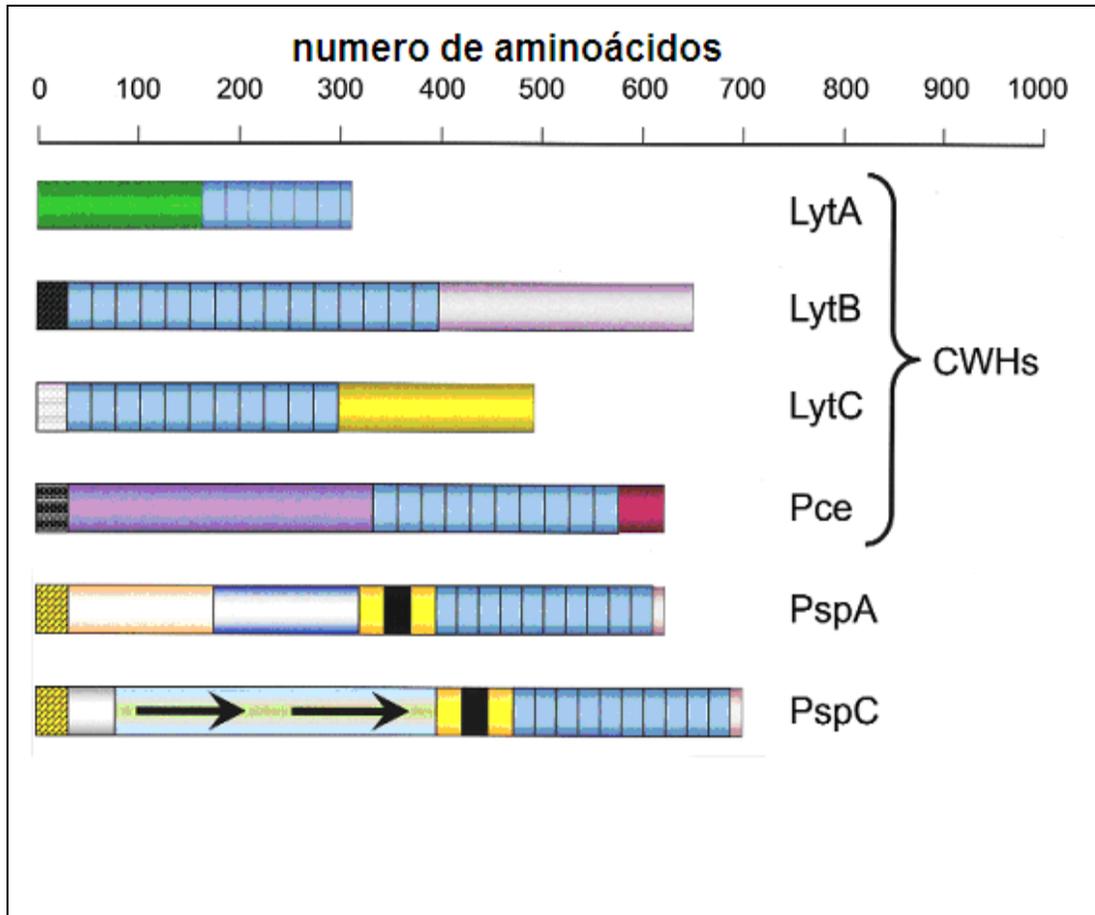
Glucosamidasa LytB es otra proteína de unión a la colina mureína hidrolasa no lítica de *Streptococcus pneumoniae* su CBM contiene 18 repeticiones y se ubica en los polos de la superficie bacteriana, está comprometido en la separación de células hijas al final de la división celular. Hidroliza el enlace $\beta 1 \rightarrow 4$ entre la glucosamina y el NAM.²⁷

Lisozima LytC también conocida como muramidasa, se localiza adherida a la pared celular neumocócica. Su CBM consiste en 11 repeticiones que al igual que LytB contiene 17 a 23 aminoácidos con variabilidad secuencial. Su máximo activo se presenta a 30°C promoviendo la lisis bacteriana, por lo tanto el desempeño de LytC da lugar en las vías superiores del tracto respiratorio. Está involucrada en áreas específicas de la envuelta celular. Su efecto hidrolítico se da en el enlace $\beta \rightarrow 4$ entre el NAM y la glucosamina de la cadena glicánica liberando grupos reductores de ácido N-acetilmurámico.²⁷

Pce: enzima encargada de hidrolizar los residuos de fosforicolina de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos adheridos a la pared celular de *Streptococcus pneumoniae*. Su patogenicidad radica en la unión específica a los receptores

del factor de activación plaquetario humano y sirve como anclaje para las proteínas de unión a la colina.²⁷

Figura 8. Estructura de las hidrolasas de la pared celular amidasa LytA,



glucosamidasas LytB, lisozima LytC, y dos proteínas de unión a la colina (PspA y PspC).²⁶

Los dominios contienen el centro activo de las enzimas y son presentados en verde (amidasas), amarillo (lisozima), rosa (glucosamidasas), o violeta (fosforilcolina esterasa). También se representan los dominios de PspA y PspC.

9.2.6 Proteínas de Superficie

La proteína de superficie, es de gran relevancia en portadores de *Streptococcus pneumoniae*, como en la enfermedad invasiva, su gen se encuentra presente en la mayoría de los aislamientos de importancia clínica. Se cataloga como un factor de virulencia por interferir en la acción del complemento en la eliminación del neumococo.²⁸

Existen tres familias de PspA. Se encuentran presentes en todos los serotipos y son altamente inmunogénicas. Con capacidad para producir anticuerpos con reacción cruzada entre ellos, además de una protección específica.²⁹

La PspA inhibe la activación del complemento y reduce la efectividad del mecanismo de iniciación del complemento mediado por receptores. Y puede actuar impidiendo la deposición de C3b en la superficie celular o puede inhibir la formación de la vía alternativa reversa C3. PspA se une a lactoferrina y por lo tanto puede estar involucrada en la adhesión de la bacteria a las células de la nasofaringe.³⁰

La proteína de superficie C, tiene varias actividades las cuales pueden ser importantes en el proceso de la enfermedad incluyendo la unión al componente C3 del complemento. Algunas formas de PspC pueden también unir al factor H proteína control del complemento, simular la producción de IL-8

de la célula epitelial pulmonar y por lo tanto puede estar implicada en la adquisición de la inmunidad celular y quimiotaxis.³⁰

9.3 Patogénesis

9.3.1 Colonización y Adherencia

Únicamente el neumococo un patógeno humano, coloniza la nasofaringe y es capaz de propagarse entre los humanos por gotitas de saliva en aerosol. La enfermedad neumocócica invasiva resulta de la propagación del neumococo de la nasofaringe a los pulmones, torrente sanguíneo y sistema nervioso central.³¹

La adhesión incrementa la invasión microbiana y está mediada por las proteínas bacterianas, CbpA y ChoP que se encuentran sobre la pared celular. La CbpA se une al plgR en las células epiteliales, mientras que ChoP se une al PAFr en las células epiteliales y endoteliales. En general el neumococo es un invasor de baja eficiencia con el variante de 0.2% del inóculo de las células invasoras, sin embargo la invasión es un paso crítico en el desarrollo de la enfermedad neumocócica invasiva, y es el mecanismo por el cual la bacteria entra al sistema nervioso central.³¹

9.3.2 **Inflamación e Invasión**

La habilidad del neumococo para causar inflamación no es accidental, es un requerimiento para su supervivencia. El proceso de inflamación es un mecanismo protector que es normalmente empleado por el hospedero para destruir, diluir o delimitar agentes infectantes.³¹

La pared celular neumocócica, la neumolisina y el peróxido de hidrógeno son las principales determinantes de virulencia que regulan la inflamación y la citotoxicidad observada en los pulmones.³¹

Debido a que el neumococo es encapsulado, la fagocitosis es limitada hasta que se presentan suficientes anticuerpos específicos capsulares, antes de eso, la gruesa capa de peptidoglicano de la pared celular protege a las bacterias de la destrucción mediada por el complemento.³¹

La inflamación es un requisito para la activación de la bacteria. Mediadores proinflamatorios como el complemento activado (complemento activado de la proteína C3a, C5a), TNF α , IL-1, y MIP-2 contribuyen a la afluencia de neutrófilos PMNs y macrófagos que son las células efectoras en las defensas del huésped contra la neumonía neumocócica. No es sorprendente que la excesiva inflamación sea perjudicial. Individuos mayores de 65 años han demostrado experimentar niveles altos de citocinas proinflamatorias en sangre y tejido, la inflamación asociada a la edad puede ser

resultado de el padecimiento de enfermedades crónicas, como la obesidad, diabetes, el proceso de envejecimiento en sí mismo, un efecto secundario de la senescencia celular y un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno.³¹

La enfermedad neumocócica es caracterizada por una intensa respuesta inflamatoria que, en los pulmones, resulta en la consolidación de los alveolos infectados y el lóbulo afectado. Infecta el tejido de los pulmones, progresa a través de las etapas de congestión durante las cuales los capilares y las células epiteliales son inflamadas, líquido, eritrocitos y neutrófilos se acumulan en los alveolos y una red de fibrina se desarrolla, (hepatización roja), posteriormente el oscurecimiento de los pulmones (hepatización gris) debido a que los leucocitos entran en la lesión las bacterias son engullidas por los neutrófilos y macrófagos.³¹

Después de varios días de infección la resolución continua de anticuerpos capsulares específicos, el aporte de opsonización eficiente y mediadores inflamatorios, se disipan.³¹

9.4 Mecanismos de Defensa

9.4.1 Fagocitosis

En la mayoría de los casos los polimorfonucleares (PMN) y los macrófagos cumplen sus funciones, fagocitan de forma directa o espontánea. Sin embargo algunos microorganismos solo son fagocitados adecuadamente, cuando moléculas de inmunoglobulinas, o factores derivados del complemento sirven de unión entre el microorganismo y la célula fagocitaria. Un ejemplo de este mecanismo es el presentado por *Streptococcus pneumoniae* ya que no es fagocitado sin la presencia de anticuerpos o complemento.³²

En la figura 9, se muestra el mecanismo de activación del C3; donde la vía es activada por hidrólisis espontanea de C3 a C3b en la fase fluida. La deposición del C3b sobre el blanco conduce a la formación de C3bBb, también conocida como C3 convertasa. La función de la C3b convertasa es la de incrementar la deposición de C3b sobre la superficie blanco activada, resultando en la opsonización y fagocitosis del patógeno por macrófagos y neutrófilos.³²

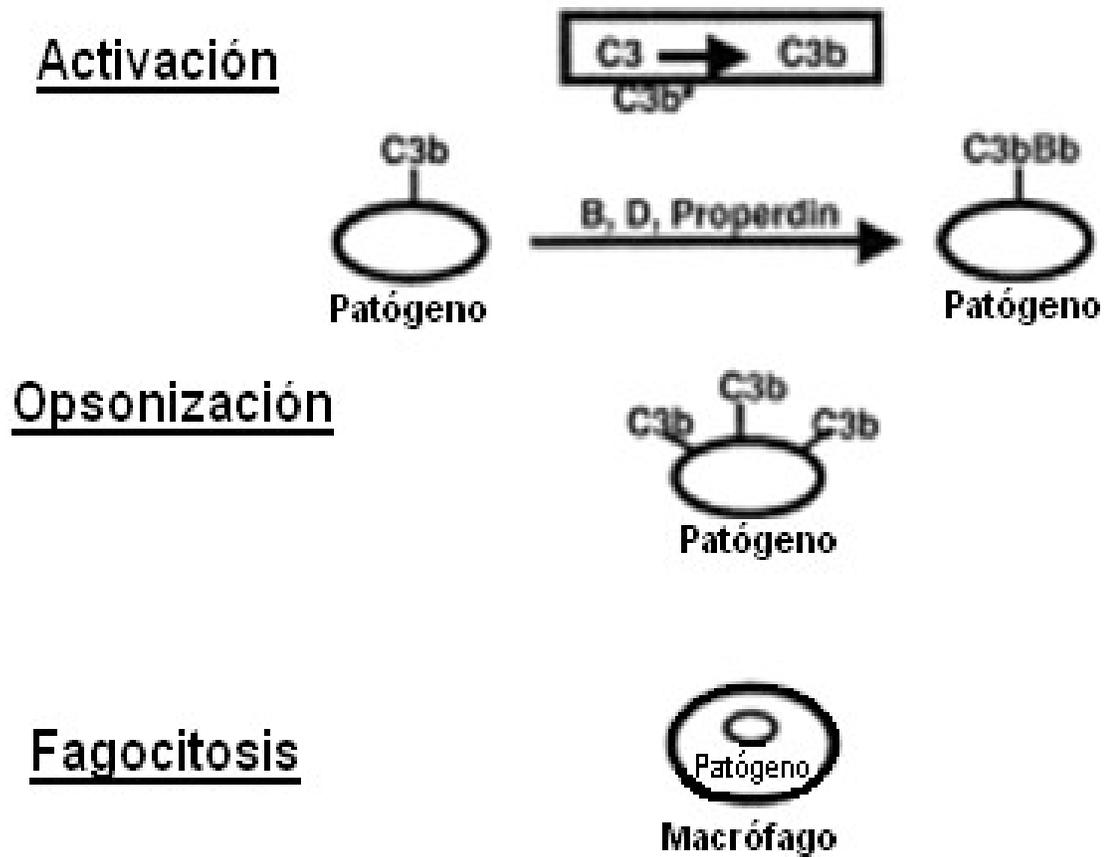


Fig.9. Activación de la vía alternativa del complemento en respuesta a un patógeno.³²

Además de los anticuerpos y los factores del complemento que actúan como opsoninas existen otros anticuerpos y factores del complemento, por ejemplo: las citoquinas son otras moléculas que modulan la respuesta

fagocitaria, el $\text{IFN}\gamma$ es un potente activador de los macrófagos, el tupsina un tetrapéptido (THR-LIS-TUR-ARG), originado en la región constante II de la IgG, por acción de la tupsinasa una enzima producida en el bazo, que es uno de los estimuladores más potentes de la fagocitosis, la tupsinasa actúa neutralizando las cargas electronegativas responsables del efecto antifagocitario de algunos microorganismos. Por consiguiente los pacientes esplenetomizados están predispuestos a la aparición ulterior de enfermedades infecciosas serias como septicemia por neumococo.³³

9.4.2 Respuesta Humoral a los Antígenos Neumocócicos

La inmunidad adaptativa extracelular de la bacteria, propia de *Streptococcus pneumoniae*, es principalmente conferida por anticuerpos.³⁴

Anticuerpos específicos para polisacáridos bacterianos y antígenos proteínicos están presentes en la protección del hospedero contra la infección por formas letales de *S. pneumoniae*. Anticuerpos de unión a la colina pueden activar la vía clásica del complemento principal (inmunoglobulinas M e IgG) o la vía alternativa (IgA). Consecuencia de la unión del anticuerpo y el C3b al Fc y receptores C3b, respectivamente expresados en células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos) resultando en la opsonofagocitosis y rápida destrucción de la bacteria ingerida.³⁴

La generación asociada de otros fragmentos del complemento puede mediar indirectamente la protección por aumento de otros aspectos de la respuesta innata, así como de la inmunidad adaptativa. Distintos isotipos de inmunoglobulinas (Ig) poseen superposición y funciones únicas de efecto en particular sobre las bases de la región expresada Fc. Los isotipos de las Ig expresadas pueden determinar la habilidad relativa a activar el complemento por unión a distintos receptores Fc sobre múltiples tipos celulares.³⁴

Muchos de los conocimientos actuales de la regulación comparativa de la respuesta antipolisacáridos y antiproteínas proviene de estudios que usan

purificados de polisacáridos solubles y proteínas. Estos estudios revelan que la respuesta antipolisacárida en contraste para aquellas proteínas, es más rápida, falla al inducir reacciones de centro germinales (con algunas excepciones), presenta poca generación de memoria o maduración de afinidad y tiene más restringidos los perfiles de isotipos Ig.³⁴

Las proteínas en distinto contraste a los polisacáridos son procesadas enzimáticamente dentro de los endosomas para generar en la superficie el MHC clase II péptidos complejos sobre la superficie de antígenos de impedimento celular (APCs) para la presentación de células T CD4. En cambio los polisacáridos no tienen la capacidad de recurrir al reconocimiento de las células de ayuda T CD4, las cuales tienen la habilidad para inducir la respuesta de memoria clásica.³⁴

9.4.3 Predisposición Genética

El riesgo genético para la neumonía severa es usualmente subestimado en la práctica clínica, pero este es probablemente el mayor factor en mortalidad inesperada en pacientes jóvenes previamente sanos y en la variabilidad en la presentación clínica en pacientes con un estado inicial similar y la misma cepa de infección.³⁵

Brevemente cuando el huésped reconoce la presencia de antígenos extraños a través del reconocimiento específico a antígenos, se inicia una reacción pro-inflamatoria, a fin de erradicar la cepa de infección. Al mismo tiempo, es ordenada una reacción anti-inflamatoria para contrarrestar los posibles efectos nocivos de los mediadores pro-inflamatorios. Un desbalance entre estas dos reacciones conduce a una respuesta deficiente a la infección. Así una respuesta pro-inflamatoria excesiva o una deficiente respuesta anti-inflamatoria puede dar lugar a un shock séptico o al daño de órganos secundarios, e inversamente una reacción deficiente pro-inflamatoria o una reacción anti-inflamatoria mayor puede provocar una infección persistente.³⁵

Las principales citoquinas pro-inflamatorias identificadas como importantes son producidas por las Th1 como son: el TNF- α , linfotoxina α , IL-1, 2, 6, 8, 12 e interferón α mientras que los principales mediadores anti-

inflamatorios en aparecer son producidos por las Th2 y son los siguientes: IL-4, IL-10 e IL-1 receptor antagonista (IL-1ra).³⁶

Polimorfismos genéticos en cualquiera de las citoquinas mencionadas, así, como en las proteínas solubles, como la MBL (proteína que se une a la superficie de los microorganismos y provoca la activación del complemento y opsonización), en los receptores que provocan endocitosis, (como los

receptores para FcRγ receptores que se unen a la región Fc de las IgG y son esenciales para la defensa contra microorganismos encapsulados), y en los receptores que provocan señales intracelulares como los receptores de afinidad a membranas, son factores de predisposición genética para la adquisición de una enfermedad neumocócica.³⁷

9.5 Importancia Clínica de *Streptococcus Pneumoniae*

Las enfermedades infecciosas constituyen el motivo de consulta pediátrica más habitual en el entorno extrahospitalario con porcentajes de alrededor del 45-65% de todas las consultas. Siendo las infecciones respiratorias las más frecuentes con un valor de 68.7%.³⁸

La importancia clínica de *Streptococcus pneumoniae* radica en los altos índices de morbilidad y mortalidad que a pesar de los años y del empleo de estrategias de inmunización mediante la administración de vacunas se siguen presentando.³⁹

El neumococo es la principal causa de neumonía adquirida en la comunidad, así, como una importante causa de otitis media, meningitis y septicemia. Esta estimado que uno a dos millones de adultos y alrededor de un millón de niños, principalmente en países en desarrollo, mueren por infecciones neumocócicas cada año.³⁹ Según reportes de la OPS, 550.000 niños menores de cinco años fallecieron en el año de 1999 en Latinoamérica, de los cuales 72.000 correspondían a infecciones respiratorias agudas.⁴⁰

La neumonía mata a más niños menores de cinco años que cualquier otra enfermedad en todas las regiones del mundo. De 9 millones de muertes de

niños estimadas en el 2007, alrededor del 20% ó 1.8 millones se debieron a neumonía.⁴¹

En la fig. 10. Se encuentran graficadas las estadísticas porcentuales de distribución global de las principales causas de muerte en niños menores de 5 años, presentando a la neumonía como el asesino mayor con alrededor de un 19% de todas las muertes. La gráfica no incluye las muertes durante las primeras cuatro semanas de vida, si estas muertes fueran incluidas en todos los valores estimados, la neumonía tendría un índice de mortalidad de 29% por año (véase tabla 2).⁴¹

Así como los serotipos neumocócicos varían dependiendo de la región, los índices de enfermedad neumocócica también varían por región geográfica. Presentando mayor incidencia en países en desarrollo, como África Subsahariana y el sur de Asia.⁴²

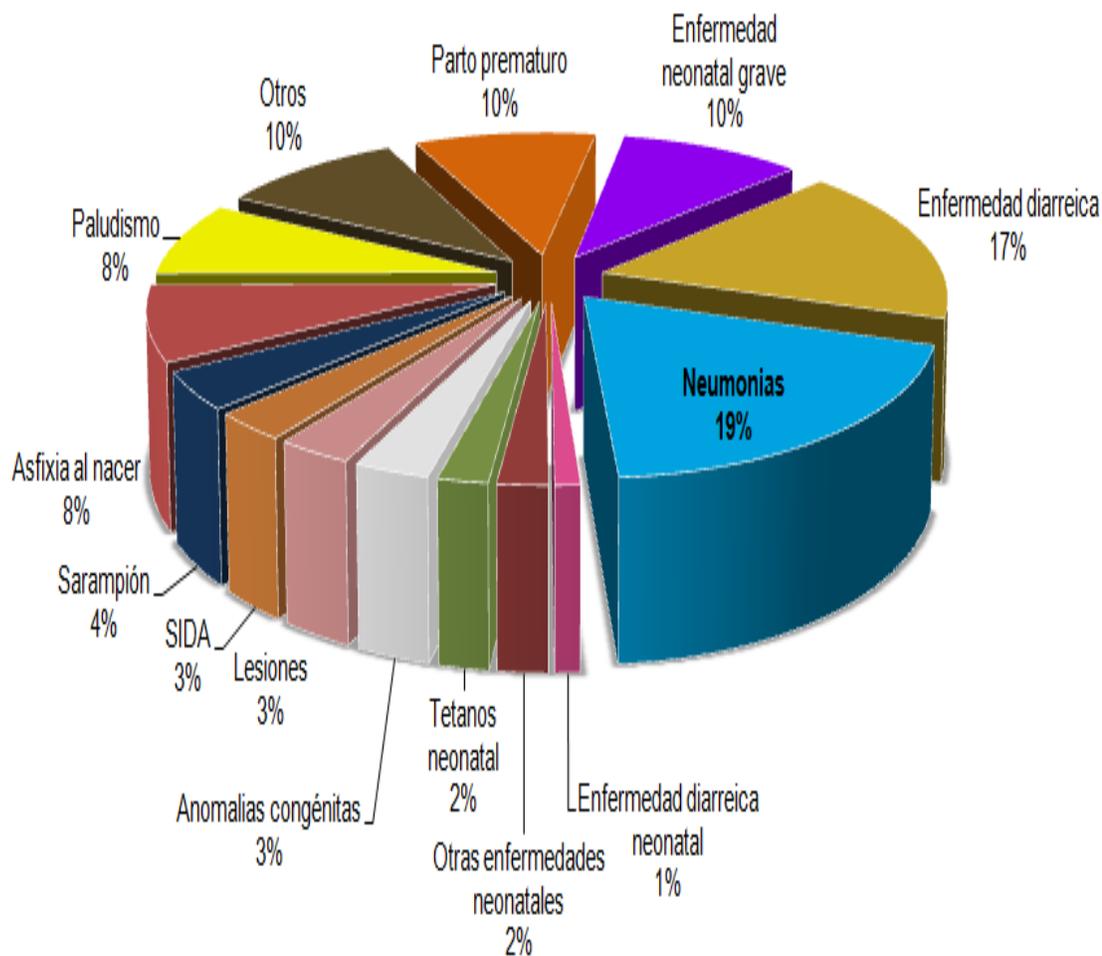


Figura 10. Gráfica de distribución mundial de la mortalidad por causas específicas en niños menores de 5 años, UNICEF 2008.^{41,42}

Tabla 2. Porcentaje de muertes por neumonía en menores de 5 años por región, UNICEF 2004.⁴²

Región	% Total de muertes de menores de 5 años	
	Neumonía	Infecciones neonatales severas (principalmente neumonía y sepsis)
Sur de Asia	21	13
África Subsahariana	21	7
Medio Oriente y Norte de África	15	11
Asia Oriental y Pacífico	15	9
América Latina y Caribe	14	8
Europa Central y oriental/ Independientes	13	8
Países en Desarrollo	20	9
Mundo Industrializado	2	3
Mundo	19	10

9.6 Sueroterapia

En las primeras terapias de inmunización contra la infección neumocócica se emplearon sueros con anticuerpos policlonales, obtenidos a partir de la inoculación de un animal con el antígeno. Generalmente se utilizaba el suero obtenido de la inmunización de conejos, los cuales consistían en una mezcla de anticuerpos producidos por diferentes clones de linfocitos B, por lo que se denominaban anticuerpos policlonales ya que reconocen el antígeno pero con distinta especificidad y afinidad.⁴³

El empleo de especies animales como conejo y caballo para producir sueros con anticuerpos policlonales se basaba en la siguiente técnica: El primer paso era la inoculación del animal mediante la inyección del antígeno para provocar la producción de inmunoglobulinas, posteriormente, se llevaba a cabo la extracción y el aislamiento de los anticuerpos del suero.⁴³

A principios del siglo XX se corroboró que la sueroterapia no era lo suficientemente efectiva contra el neumococo, ya que su mecanismo de acción estaba dado por la neutralización de toxinas, en comparación con otros mecanismos como el empleo de la reacción de anticuerpos bactericidas con actividad fagocítica, la estimulación de la activación del complemento y otros mecanismos inmunológicos.⁴⁴

Su eficacia está centrada en el uso adecuado del suero, la dosis, la especificidad del suero contra el microorganismo y el tiempo de inicio de la infección.⁴⁴

Además de la reducida eficacia de la sueroterapia, la administración de un suero heterólogo podría desarrollar reacciones tóxicas de consideración clínica.⁴⁴

9.7 Prevención de la Infección Producida por *Streptococcus pneumoniae*

De acuerdo con la alta incidencia en morbilidad y mortalidad presentada por infecciones de las vías respiratorias en niños menores de 5 años en 1993, La Subdirección General de Medicina Preventiva y la Secretaría de Servicios de Salud con apoyo de otras instituciones, en el año 1994 en atención primaria de la salud, formularon la Norma oficial mexicana NOM-024-SSA2-1994, para la prevención y control de las infecciones respiratorias agudas, en pro de su efecto se dividió en medidas de prevención y medidas de control.⁴⁵

En las medidas de control de IRA se enfoca principalmente en la educación de la población para la salud y promoción de la participación social. En cuanto a las medidas de control, están comprendidos la identificación del caso, el diagnóstico, manejo y el tratamiento oportuno de IRA.⁴⁵

Dicha norma fue cancelada el 5 de octubre del 2000 por el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Prevención y Control de Enfermedades, y en su lugar se aplicó la Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA2-1999, para la atención de la salud del niño.⁴⁶

La NOM-031-SSA2-1999, tiene por objetivo el establecimiento de los requisitos a seguir para asegurar la atención integrada, el control, eliminación y

erradicación de las enfermedades evitables por vacunación, dentro de las cuales se incluyen las IRA.⁴⁷

El empleo de vacunas contra el neumococo se lleva a cabo desde 1983 con la introducción de la vacuna antineumocócica polisacáridica 23 valente, su uso está recomendado en personas entre 2 a 64 años de edad, con alto riesgo de presentar la enfermedad y en todas las personas mayores de 65 años, puede ayudar a prevenir la enfermedad invasiva, neumonías graves, otitis serotipo-específicas y reducir el estado de portador.⁴⁸

Actualmente se recomienda la inmunización en niños de 2 meses, con refuerzo a los 4 y 12 meses de vida con la vacuna polisacáridica antineumocócica conjugada 7-valente (PREVENAR).⁴⁹

La vacunación contra el neumococo es un método de prevención exitoso, sin embargo la ignorancia de la sociedad sobre las perspectivas de la enfermedad, mantiene inminente la existencia de personas reacias a la vacunación por desconocimiento del tema.⁵⁰

En el 2007 la OMS y UNICEF crearon el Plan de acción mundial para la prevención y el control de la neumonía (GAPP) con la finalidad de acelerar el control de la neumonía en el contexto de intervenciones integradas en pro de la supervivencia infantil,⁵¹ y en su última actualización en el 2009, se plantea vacunar a 130 millones de niños en 42 países para el 2015.⁵²

9.7.1 Vacunas Constituidas por Polisacáridos Capsulares

Desde 1977 se desarrolló una vacuna compuesta de 14 polisacáridos con fines preventivos ante la enfermedad neumocócica, presentando una eficacia de 60 a 70% en términos de reducción de episodios de bacteremia neumocócica, sin embargo, la información sobre la respuesta de anticuerpos fue limitada y no existían estudios de correlación clínica o microbiológica con los datos inmunológicos.⁵³

En el año de 1983 se introdujo en el mercado estadounidense la vacuna antineumocócica polisacáridica 23-valente, compuesta de los polisacáridos capsulares de los 23 serotipos de *streptococcus pneumoniae* aislados más frecuentemente en pacientes con enfermedad neumocócica; siendo los siguientes: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F Y 33F.⁵⁴ contiene 25µg para cada serotipo y otros componentes como fenol (\leq 1,25mg), solución tamponada: cloruro sódico, fosfato disódico, fosfato monosódico, y agua para inyectables (hasta 0.5mL). Se recomienda su uso a partir de los 2 años de edad en sujetos de alto riesgo; pacientes inmunocompetentes con enfermedad crónica, pacientes inmunocomprometidos, pacientes con infección por VIH y adultos mayores de 65 años, para la prevención de neumonías neumocócicas y de infecciones sistémicas neumocócicas producidas por serotipos incluidos en la vacuna.⁵⁵

Induce una respuesta inmune tipo específica para cada uno de los serotipos incluidos en ella, con aumento en los títulos de anticuerpos en las primeras 2 a 3 semanas después de la inmunización, en más del 80 % de los adultos sanos, La vacuna neumocócica se puede administrar junto con otras vacunas sin alterar la efectividad de ninguna.⁵⁶ Actúa promoviendo la opsonización, fagocitosis y la muerte del microorganismo por leucocitos y otras células fagocíticas. La eficacia es de 56 a 81% en enfermedad invasiva, la producción de anticuerpos declina de 5 a 10 años después de la vacunación y decrece más rápidamente en algunos grupos que en otros, por lo que se recomienda la revacunación, tiene una respuesta nula en menores de 2 años⁵⁷ y presenta una respuesta inmune disminuida en ancianos con variaciones estimadas entre el 48 al 81%, debido a que no produce inmunidad de recuerdo por ser inductora de respuesta inmune de los linfocitos T- independientes.⁵⁸

9.7.2 Vacunas Conjugadas

Desde 1929, Avery y colaboradores demostraron que la unión covalente de polisacáridos capsulares a una proteína aumenta la inmunogenicidad de los polisacáridos. Las proteínas que han demostrado ser buenas compañías inmunocompetentes son: la proteína de *H. influenzae* tipo b, el toxoide tetánico, toxoide diftérico y la proteína de membrana exterior del meningococo del grupo B.⁵⁹

A diferencia de las vacunas con polisacáridos puros, en la vacuna conjugada, la proteína actúa como un interruptor que induce una respuesta timo-dependiente, lo que conlleva a la inducción de células B de memoria, una respuesta mejorada a la célula y a una mayor respuesta inmunológica en infantes debida a la maduración progresiva del sistema inmunológico humano. Conjugar variantes de vacunas con 4 a 11 serotipos o más, con una proteína transportista variable, ha confirmado ser efectiva en niños menores de 2 años.⁵⁹ Sin embargo la limitante se encuentra en la diversidad de serotipos causantes de enfermedad y en la distribución geográfica, siendo imposible incluir todos los serotipos en una sola vacuna.⁶⁰

En el año 2000 fue licenciada la vacuna antineumocócica polisacarídica conjugada 7-Valente, en la que se incluyen los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, conjugada individualmente con la proteína transportadora CRM₁₉₇,

su efectividad en la prevención de enfermedad neumocócica invasiva es de 98% para cada uno de los serotipos incluidos.⁶¹

El primer país en adoptar esta vacuna fue Estados Unidos de América y con la inclusión en su calendario de inmunizaciones sistémicas ha logrado una reducción de 39% en la tasa de hospitalización global por neumonía en menores de 2 años, y en concreto una reducción de hasta 65% de la hospitalización por neumonía neumocócica, así como una disminución de hospitalizaciones por neumonía en todas las edades.⁶¹

La PCV-7v, también reduce la colonización nasofaríngea debido a la producción de inmunidad de grupo, de esta manera, proporciona una disminución en el número de portadores.⁶¹

No obstante aunque la introducción de la PCV-7v ha disminuido en gran parte los índices de enfermedad neumocócica, se considera que es necesaria una extensión del número de serotipos incluidos en la vacuna.⁶¹

Una extensión de la PCV-7v es la vacuna compuesta por los serotipos 1, 4, 5, 6B, 9B, 14, 18C, 19F y 23F. Conocida como PCV-9v esta vacuna esta conjugada con la proteína CRM₁₉₇, en un estudio llevado a cabo por el Dr. Ron Dagan demostró una eficacia en portadores, sobretodo en menores de 3 años, produciendo una reducción de 46% de portadores en los serotipos incluidos.⁶²

La PCV-9v ha sido probada en Gambia y el Sur de África, al contener los serotipos adicionales 1 y 5 esta vacuna puede cubrir el 66% de los aislamientos de enfermedad invasiva en los niños y 55% en adultos.⁶³

La vacuna 9-valente ofrece protección significativa frente a la neumonía; sin embargo la eficacia es similar a la obtenida mediante la inmunización con la 7-valente, además de que no ha sido licenciada para su uso.⁶⁴

Los laboratorios Sanofi-Pasteur desarrollaron la vacuna antineumocócica conjugada 11-valente, tratando de ampliar la diversidad polisacáridica de la 7-valente, dicha vacuna contiene los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 18C, 19F y 23F, conjugada con un toxoide tétanos-difteria, fue probada en niños menores de 2 años en una provincia en Filipinas; se administraron 3 dosis de la vacuna y como resultado se obtuvo una reducción del 22.9% en el índice de neumonías adquiridas en la comunidad, la reducción observada fue similar a la resultante en otras vacunas conjugadas, por lo tanto no tiene un porcentaje significativo en la prevención de la neumonía adquirida en la comunidad.⁶⁵

9.7.3 Nuevas vacunas a base de Neumolisina

La neumolisina al ser una proteína producida por la mayoría de los neumococos ha sido considerada por varios investigadores como un potente candidato antigénico, induce respuesta inmune de los linfocitos T-dependientes, lo que conlleva a generar inmunidad de las células B, al igual que otras proteínas de uso en vacunas conjugadas, confiere inmunidad de recuerdo y puede ser utilizada en la inmunización de infantes, su característica tiol-dependiente la identifica como inductora de anticuerpos en animales inmunizados, así como inductora de anticuerpos antineumolisina en pacientes previamente expuestos a la infección neumocócica.²²

En el desarrollo de vacunas puede ser utilizada como proteína inmunizante o como un conjugado transportador en una vacuna polisacáridica.²²

El uso de la neumolisina como base en la elaboración de una vacuna es una estrategia prometedora frente a las enfermedades neumocócicas agudas, ya que activa la vía del complemento, aumenta la producción de anticuerpos IgG e IgA, como conjugado es una proteína estable, neutraliza la formación del poro en las células del huésped, referente a la unión neumolisina-colesterol, lo que disminuye la diseminación bacteriana y el daño epitelial.²⁵

En un estudio perteneciente a una patente Europea se describe a la neumolisina como una proteína transportadora inmunogénica útil para el

desarrollo de una vacuna conjugada, avalada por estudios de inmunización en ratones y cobayos, los cuales han demostrado una mayor supervivencia frente a la infección neumocócica inducida.⁶⁶

La preparación de la vacuna se fundamenta en la conjugación de neumolisina recombinante obtenida mediante la manipulación genética de *E. coli* como productora de la toxina, seguida de métodos de purificación, sin destoxificación previa, y su posterior conjugación con derivados polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* (véase apéndice 12.2).⁶⁶

La vacuna consiste en la inclusión de 2 serotipos de polisacáridos neumocócicos oxidados conjugados individualmente con la neumolisina recombinante, los conjugados se diluyen en PBS estéril (pH 7.0) que contiene un 0.01% de timerosal, de manera que una dosis de 0.2 mL. Contiene 1 o 5 µg del polisacárido, y un agregado de fosfato de aluminio (ALPO₄) como adyuvante.⁶⁶

Produce anticuerpos tanto frente a los polisacáridos como a la neumolisina recombinante. Los conjugados inducen anticuerpos frente a la neumolisina que son capaces de neutralizar las actividades hemolíticas y citotóxicas de la toxina sin el requisito de un espaciador o un enlazante, la neumolisina conserva su estructura mientras se vuelve no tóxica.⁶⁶

Además de conferir inmunidad en niños menores de 2 años como proteína transportadora para polisacáridos, es capaz de desarrollar inmunidad

por sí misma. Puede conferir protección mediante una sola dosis, o puede requerir la administración de varias dosis de refuerzo.⁶⁶

10. CONCLUSIONES

El desarrollo de una vacuna a base de neumolisina sería considerado como el desarrollo de una “vacuna ideal.”

La neumolisina al ser producida por la mayoría de los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* de mayor importancia clínica, podría conferir protección contra estos serotipos ofreciendo una gran ventaja en efectividad con respecto a la vacuna neumocócica conjugada 7-valente la cual solo confiere inmunidad contra los siete serotipos incluidos en la vacuna.

Por ser una proteína activadora de la respuesta inmune de los linfocitos T-dependientes se considera una proteína que generara respuesta inmunológica en niños menores de 2 años, siendo así de mayor eficacia respecto a la vacuna polisacáridica 23-valente.

Además de conferir respuesta inmune en niños menores de 2 años, la neumolisina es productora de inmunidad de recuerdo, generando así protección en adultos mayores.

La elaboración de una vacuna a base de neumolisina es factible, pues se puede obtener mediante técnicas de laboratorio como filtración y purificación simple.

El uso de la nueva vacuna a base de neumolisina podría resultar en la inmunización mundial contra los serotipos de mayor importancia clínica, ya que la distribución serotípica varía de región en región y comparando que es

producida por la mayoría de estas cepas, podría ser empleada en cualquier población, generalizando edades y región geográfica.

Ya existe información acerca de métodos de elaboración de una vacuna a base de neumolisina, sin embargo se encuentran bajo patentes y es difícil acceder a ella.

Aun falta por hacer, es necesario exhortar a las autoridades de salud para que realicen una investigación sobre la relación costo-beneficio y así, poder promover la elaboración y producción de la nueva vacuna.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. a) Zinsser, Wolfgang K, Joklik, Hilda, Willett, Amos Bernard, Catherine M, Wilfert, 1995, Microbiología, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1696 pp., b) Paul Hanage, Fraser Christophe, Tang Jing, Connor Thomas Richard, Corander Jukka, 2009, Hyper recombination, Diversity, and Antibiotic Resistance in *Pneumococcus*, SCIENCE, Vol. 324, c) Johnson Cristal N., Briles David E., Benjamin Jr. William H., Hollingshead Susan K., Waites Ken B., 2005, Relative Fitness of Fluoroquinolone Resistant *Streptococcus pneumonia*, Emerginh Infectious Diseases, Vol. 11, núm. 6; 814-819, d) Staginuss, Ramírez de Arellano, 2007, Análisis coste-efectividad de la vacuna neumocócica heptavalente conjugada: una revisión de la evidencia, Revista Española de la Economía de la Salud, Vol. 6, núm. 4; 232-240, e) División de Medicina Experimental, Instituto Nacional de Pediatría de México, 1999, La resistencia antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* como un problema de salud pública, Revista de Salud pública de México, Vol. 41, núm. 5; 360-362.
2. Schaechter Moselio, Medoff Gerald, Eisentein Barry I., Guerra Humberto. 1994, Microbiología, Mecanismos de las enfermedades infecciosas,

Enfoque mediante resolución de problemas, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1000 pp.

3. Del Nogal Berenice, Vigilancia Patricia, Rivera Olivero Ismar, Bello Teresita, De Waard Jacobus H., 2006, Estado de portador de *Streptococcus pneumoniae* y morbilidad por infecciones respiratorias agudas (IRA) en la población infantil de Warao, Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría, Vol. 69, núm.1; 5-10.
4. Ruvinsky Raul O., 2001, *Streptococcus pneumoniae*: Epidemiología y resistencia a antimicrobianos de las enfermedades invasoras en Latinoamérica, Revista Chilena de Infectología, Vol. 18, núm. 1; 10-14.
5. Espinoza de los Monteros Luz Elena, Jiménez Rojas Verónica, Aguilar Ituarte Felipe, Cashat Cruz Miguel, Reyes López Alfonso, Rodríguez Suarez Romeo, Kury Morales Pablo, Tapia Conyer Roberto, Gómez Barreto Demóstenes, 2007, *Streptococcus pneumoniae* isolates in healthy children attending day-care centers in 12 states in México, Salud Pública de México, vol. 49, núm. 4; 249-255.
6. Organización Mundial de la Salud, Disponible en:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/es/index.html>, Accesado el día: 29-septiembre-2009.
7. Celaya Torres Hernaldo Martín, 2008, Frecuencia de portadores nasales de *S. pneumoniae* en niños menores de 6 años de la comunidad y de las salas de pediatría del Hospital Escuela Dr. Oscar Danilo Rosales

Arquello, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN-LEÓN, Facultad de Ciencias Médicas, Tesis profesional licenciatura en especialista en pediatría. Disponible en:

http://minsa.gob.ni/bns/monografias/Full_text/Pediatria/frecuencia.pdf,

Accesado el día: 1-October-2009.

8. López Rubens, 2006, Pneumococcus: the sugar-coated bacteria, International Microbiology, Vol. 9; 179-190.
9. Vesga G. Juan F., Cortés L. Jorge A., 2006, Desarrollo, impacto y eficacia de la vacuna conjugada contra *Streptococcus pneumoniae* en América Latina, Revista Chilena de Pediatría, Vol. 77,núm. 4; 341-349.
10. Romero Carbello Raúl, 2007, Microbiología y parasitología Humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias, Editorial Médica Panamericana, México, 1003 pp.
11. Yuste Lobo José Enrique, 2002, Estudio de la acción combinada de antibióticos [beta]-lactámicos y sistemas inmunológico en el tratamiento de la sepsis neumocócica en un modelo experimental murino, Universidad Complutense de Madrid, Tesis profesional de doctorado.
12. Asociación Española de Pediatría, 2002, Programa de Actualización en Vacunas, Módulo 2ª, Vacunas contra el neumococo, España. Disponible en: http://www.aeped.es/vacunas/pav/modulo2/Modulo2_7.htm ,
Accesado el día: 06-October-2009.

13. Prado J. Valeria, 2001, conceptos microbiologicos de *S. pneumoniae*
Revista Chilena Infectología, Vol. 18 núm. 1; 6- 9.
14. Struthers J. Keith, Westran Roger P., 2005, Bacteriología Clínica,
Editorial Masson, S.A. Barcelona 192 pp.
15. Z. Huo, O. Spencer, J. Miles, J. Johnson, R. Holliman, J. Sheldon, P.
Riches, 2004, Antibody response to neumolysin and to neumococcal
capsular polysaccharide in healthy individuals and Streptococcus
pneumoniae infectied patients, Vaccine, Vol. 22; 1157-1161.
16. Martínez Arriaga Blanca, 2005, Contribución al estudio de los
mecanismos moleculares de la resistencia a ciprofloxacina en
Streptococcus pneumoniae, Universidad de Barcelona, tesis de
doctorado. Disponible en:
[http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0526106-
111553/BMG_TESI.pdf](http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0526106-111553/BMG_TESI.pdf), Accesado el día: 26-noviembre-2009.
17. Organización Panamericana de la Salud, Disponible en:
<http://www.paho.org>, Acezado el día: 16-febrero-2010.
18. Jeurissen Axel, Moens Leen, Raes Marc, Wuyts Greet, Willebrords Luc,
Sauer Kate, Proesmans Marijke, Ceuppens Jan L., De Boeck Kris,
Bossuyt Xavier, 2007, Laboratory Diagnosis of Specific Antobody
Deficiency to Pneumococcal capsular Polysaccharide Antigens, Clinical
Chemistry, Vol. 53, núm. 3; 505-510.

19. Hinojosa Robles Rosa María, 2005, Resistencia-Suceptibilidad de *Streptococcus pneumoniae*, Universidad Autónoma de Nuevo León. Tesis profesional de Doctorado, 106 pp. Disponible en: http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080127617/1080127617_01.pdf, Acesado el día: 8-Febrero-2010.
20. Murray Patrick R., Kobayashi George S., Pfaller Michael A., Rosenthal Ken S., 1997, Microbiología médica, Editorial Harcourt Brace, España, 755 pp.
21. Lopez Rubens, García Ernesto, 2004, Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes and bacteriophage, FEMS Microbiology Reviews, Vol. 28; 553-580.
22. Toraldo Peraza Gilda T., Vilaseca Méndez Juan C., Tamargo Martínez Isis, Pérez Monrráz Miriam, 1999, Producción y purificación parcial de la hemolisina principal (neumolisina) de *Streptococcus pneumoniae*, Revista Cubana de Medicina Tropical, Vol. 51, núm. 3; 160-5.
23. García Suárez María del Mar, Flórez Noelia, Astudillo Aurora, Vázquez Fernando, Villaverde Roberto, Fabrizio Kevin, Pirofski Liise Anne, Méndez Francisco J., 2007, The role of pneumolysin in mediating lung damage in letal pneumococcal pneumonia murine model, Respiratory Research, Vol. 8, núm. 3.
24. Morgan Peter J., Hyman Stefan C., Rowe Arthur J., Mitchell Timothy J., Andrew Peter W., Saibil Helen R., 1995, Subunit organization and

- symmetry of pore-forming, oligomeric pneumolysin, Federation of European Biochemical Societies (FEBS), Vol. 371; 77-80.
25. Cockeran Riana, Anderson Ronal, Feldman Charles, 2005, Pneumolysin as a vaccine and drug target in the prevention and treatment of invasive pneumococcal disease, Arch Immunol Ther Exp, Vol. 53; 189-198.
 26. López Rubens, 2004, Streptococcus pneumoniae and its bacteriophages: one long argument, International Microbiology, 7: 163-171.
 27. Lagartera Ortiz Laura, 2006, Estructura y función de la fosforilcolín esterasa de *Streptococcus pneumoniae*, Universidad Complutense de Madrid, Tesis doctoral, España. Disponible en: <http://dialnet.uniroja.es/servelet/tesis?codigo=17405>, Accesado el día: 4-febrero-2010.
 28. Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires, Sep 2007, Fabainforma, Científicos Santafesinos investigan el desarrollo de una nueva vacuna contra el neumococo, Núm. 419, Disponible en: <http://www.faba.org.ar/fabainforma/419/actualidad.htm>, Accesado el día: 26-Febrero-2010.
 29. Mayoral, Della Bianca, Baroni, Giani, Noroña, Regueira, Zalazar, 2007, Distribución de serotipos de aislamientos invasivos de *Streptococcus pneumoniae* e identificación molecular de familias de proteínas de superficie (PspA) para el desarrollo de una futura vacuna regional, FABICIB, Vol. 11; 127-135.

30. Andrew J. Pollar, Adam Finn, British Pediatric Allergy, Immunity, and Infection Group, European Society for Pediatrics infectious Diseases, Royal College of Pediatrics and Child Health, 2006, Hot topics in infection and immunity in children, volume 3, editorial Springer, 275pp. Disponible en: <http://books.google.com.mx>, Accesado el 3-febrero-2010.
31. Rello Jordi, Restrepo Marcos I., 2008, Sepsis, New strategies for management, editorial Springer, 142pp. Libro electrónico, Disponible en: <http://books.google.com.mx> , accesado el día: 4-febrero-2010.
32. Dave Sandhya, Pangburn Michael K, Pruitt Corunda, Mc Daniel Larry S., 2004, Interaction of human factor H with PspC of *streptococcus pneumoniae*, Indian J Med Res, Vol. 119; 66-73.
33. Rojas M. Williams, 2004, Inmunología, Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas, Colombia, Libro electrónico, disponible en: <http://www.books.google.com.mx>, Acezado el día: 2-Diciembre-2009.
34. Toumanen Elaine I., Mitchell Timothy J., Morrison Donald A., Spratt Brian G., 2004, The pneumococcus, Editorial ASM Press, Estados Unidos de América, Libro electrónico, disponible en: <http://books.google.com.mx>, Accesado el día:3-diciembre-2009.
35. Vincent Jean Louis, Intensive Care Medicine: Annual Update, editorial Springer, 2007 1040pp. Disponible en: <http://www.books.google.com.mx>, Accesado el día: 4-diciembre-2009.

36. Cabrera Rayo Alfredo, Laguna Hernández Guadalupe, López Huerta Guadalupe, Villagómez Ortiz Asisclo, Méndez Reyes Raquel, Guzmán Gómez Ricardo, 2008, Mecanismos patogénicos en sepsis y choque séptico, *Medicina Interna de México*, Vol. 24, núm. 1; 38-42.
37. Sirgo G., Rello J., Bodí M., Díaz E., Pérez Vela J. L., Hernández G., Waterer G., 2003, Polimorfismo genético en el paciente crítico (I). Aspectos generales, inflamación y sepsis, *Medicina Intensiva*, Vol. 27, núm. 1; 24-31.
38. Gonzalo de Liria C. Rodrigo, 2004, cual es la importancia de la erradicación bacteriana en el tratamiento de la infección bacteriana?, *An Pediatr*, Vol. 60, núm. 5; 459-467.
39. Shaaly Aishath, Gjerde Tellevik Marit, Langeland Nina, Hoiby E. Arne, Jureen Roland, 2005, Comparison of serotyping, pulsed field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism for typing of *Streptococcus pneumoniae*, *Journal of Medical Microbiology*, Vol. 54; 467-472.
40. Ruvinsky Raúl, Gentile Angela, Regueira Mabel, Corso Alejandra, Pace Julio, Bakir Julia, Di Fabio José Luís, Rossi Alicia, 2004, Infecciones invasivas por *Streptococcus pneumoniae*: estudio epidemiológico e importancia del desarrollo de un sistema de vigilancia, *Arch Pediatr Urug*, Vol. 75, núm. 1; 91-103.

41. UNICEF, Organización Mundial de la Salud, 2008, Global Action Plan for Prevention and Control of Pneumonia (GAPP), Disponible en:
http://www.unicef.org/media/files/GAPP3_web.pdf, Acezado el día: 3-diciembre-2009.
42. UNICEF, Organización Mundial de la Salud, 2006, Pneumonia: The Forgotten killer of children, 44pp., Disponible en:
http://www.unicef.org/publications/index_35626.html, Accesado el día: 8-diciembre-2009.
43. Ruiz Gema, Moreno María, López Marta, Vega Miguel, 2007, Anticuerpos monoclonales terapéuticos, Informe de vigilancia terapéutica, GENOMA ESPAÑA/Fundación de la Universidad Autónoma de Madrid (FUAM), 107pp. Disponible en:
http://www.gen-es.org/12_publicaciones/docs/pub_77_d.pdf Acezado el día: 2-marzo- 2010.
44. Revista de antibioticoterapia, 2005, Inmunoterapia de infecciones, Antibioticoterapia, Información para médicos y farmacéuticos para un tratamiento racional de las infecciones. Enero/Febrero 2005 - año 26, 139-146. Disponible en: <http://www.antibioticoterapia.com/modules.php?name=News&file=article&sid=a3&num=2005-01-01>, Accesado el día: 5-marzo-2010
45. Secretaría de Salud, 1996, Norma Oficial Mexicana NOM-024-SSA2-1994, Para la prevención y control de las infecciones respiratorias

agudas en la atención primaria de la salud, Diario Oficial de la Federación, (primera sección) disponible en:

http://www.pediatriajal.org.mx/downloads/nom_024_ssa2_1994.doc

Accesado el: 03-marzo-2010.

46. Secretaría de Salud, 2001, Aviso de cancelación de la Norma Oficial Mexicana NOM-024-SSA2-1994, para la prevención y control de las infecciones respiratorias agudas en la atención primaria a la salud, Diario Oficial de la Federación, primera sección, (lunes 12 de febrero del 2001), Disponible en:

http://biblios.itleon.edu.mx/dof/01_02feb/12022001_07.PDF Accesado el día: 08-marzo-2010.

47. Secretaría de Salud, Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA2-1999, Para la atención a la salud del niño, disponible en: <http://www.salud.gog.mx/unidades/cdi/nom/031ssa29.html> Accesado el día: 08-marzo-2010.

48. Vilá M, Bello S., 2004, Vacuna antineumocócica: indicaciones, momento y resultados, Arch Bronconeumol, Vol. 40, núm. 3; 43-50.

49. WYETH, S.A DE C.V., 2007, PREVENAR, Wyeth AMIIF, Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/bmnd/plm_2k8/src/prods/36049.htm Accesado el día: 12-febrero-2010.

50. Hamui Sotton Alicia, Nellen Hummel Haiko, Fernández Ortega Miguel Ángel, Halabe Cherem José, 2009, La neumonía y sus representaciones

sociales, Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, Vol. 47, núm. 3; 341-347.

51. Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia, UNICEF. Disponible en: <http://www.unicef.org>, Accesado el 18-noviembre-2009.
52. World Health Organization, The United Nations Children's Fund (UNICEF), 2009, Global Action Plan for Prevention and Control of Pneumonia (GAPP), World Health Organization, Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/hq/2009/WHO_FCH_CAH_NCH_09.04_eng.pdf
Accesado el día: 2-Diciembre-2009.
53. Davis A. L., Aranda C. P., Schiffman G., Christianson L. C., 1987, Pneumococcal infection and immunologic response to pneumococcal vaccine in chronic obstructive pulmonary disease. A pilot study, Journal of the American College of Chest Physicians, Vol. 92, núm. 2; 204-212.
54. Barros M. Manuel, Cartagena S. Claudia, Bavestrello F. Luís, 2005, Prevención de la neumonía en adulto adquirida en la comunidad, Revista Chilena de Infectología, Vol. 22, núm. 1; 567-574.
55. Ministerio de Sanidad y Política Social, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2009, PNEUMO 23, Solución inyectable en jeringa precargada Vacuna antineumocócica de polisacáridos, Aventis pasteur, Disponible en:

<http://sinaem4.agemed.es/consaem/especialidad.do?>

metodo=verFichaWorldPdf&codigo=62482&formato=pdf&formulario=PR

OSPECTOS, Accedido el día:03-marzo-2010.

56. Dirección General de Salud Pública (Servicio de epidemiología), 2002, Prevención de la enfermedad neumocócica, programa de vacunación antineumocócica de Castilla León, Boletín epidemiológico de Castilla y León, Vol. 18, núm. 8: 29-32.
57. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1997, Prevention of Pneumococcal Disease, Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), Vol.46, núm. RR-8.
58. Kolibab Kris, Smithson S. Louise, Rabquer Bradley, Khuder Sadik, Julie Westerink M. A., 2005, Immune Response to Pneumococcal Polysaccharides 4 and 14 in Elderly and Young Adults: Analysis of the Variable Heavy Chain Repertoire, Journal Infection and Immunity, Vol. 73, núm. 11; 7465-7476.
59. Bogaert D., M. Hermans P. W., Adrian P. V., Rümke H. C., De Groot R., 2004, Pneumococcal vaccines: an update on current strategies, Vaccine, Vol. 22; 2209-2220.
60. a) Guevara Duncan José María, Fenoll Asunción, Valencia Esther, Rito Zerpa, Guevara Granados José María M., 2008, *Streptococcus*

pneumoniae aislados durante 2002-2006: serotipos y resistencia antibiótica. Correlación con las vacunas existentes, An Fac Med., Vol. 69, núm. 1; 29-32, b) Fry Alicia M., Zell Elizabeth R., Schuchat Anne, Butler Jay C., Whitney Cynthia G., 2002, Comparing potential benefits new pneumococcal vaccines with the current polysaccharide vaccine in the elderly, Vaccine, Vol. 21; 303-311.

61. Marés Bermúdez J., 2008, Perspectivas futuras de las vacunas antineumocócicas (Mesa General de Vacunas), Canarias Pediátrica, Vol. 32, núm. 2: 111-118.
62. Dagan Ron, 2002, Vacunas neumocócicas conjugadas para prevenir la portación y propagación de neumococos resistentes a los antibióticos, Arch. Argent. Pediatr. Vol. 100, núm. 1; 19-24.
63. Gordon Stephen B., Kanyanda Stonard, Walsh Amanda L., Atkinson Victoria, Mulwafu Wakisa, Molyneux Elizabeth M., Zijlstra Ed E., Molyneux Malcolm E., Graham Steve M., 2003, Poor Potential Coverage for 7-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine, Malawi, Emerging Infectious Disease, Vol. 9, núm. 6; 747-749.
64. Klugman Keith P., Madhi Shabir A., Huebner Robin E., Kohberger Robert, Mbelle Nontombi, Pierce Nathaniel, 2003, A Trial of a 9-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in Children with and Those without HIV Infection, The New England Journal of Medicine, Vol. 349; 1341-1348.

65. a) Lucero Marilla G., Nohynek Hanna, Williams Gail, Tallo Verónica, F. Simoes Eric A., Lupisan Socorro, Sanvictores Diozele, Forsyth Simon, Puumalainen Taneli, Ugpo Juanita, Lechago Marites, De Campo Margaret, Abucejo Ladesma Erma, Sombrero Lydia, Nissinen Antti, Soininen Anu, Ruutu Petri, Riley Ian, Mäkelä Helen P., 2009, Efficacy of an 11-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Against Radiologically Confirmed Pneumonia Among Children Less Than 2 Years of Age in the Philippines A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial, The Pediatric Infectious Disease Journal, Vol. 28, núm. 6; 445-462, b) Ochoa Sangrador Carlos, Andrés de Llano Jesús María, 2009, Una vacuna neumocócica conjugada 11-valente no reduce significativamente las neumonías adquiridas en la comunidad con diagnóstico radiológico en niños menores de dos años, Evid Pediatr, Vol.5, núm. 63.
66. Patente Europea, 2001, Vacunas de conjugados polisacárido neumocócico-neumolisina recombinante para la inmunización contra las infecciones neumocócicas, Oficina Española de Patentes y Marcas, Número de publicación: 2 152 421.

12. APÉNDICE

12.1 Tratamiento Antibiótico

En 1941, se inició la administración de penicilina en pacientes con enfermedades bacterianas, los betalactámicos son los antibióticos mayormente prescritos tanto en la atención primaria como clínica.

12.1.1 β -Lactámicos

Se clasifican por la presencia de un anillo betalactámico en su estructura, esta familia da origen a diversos grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas e inhibidores de las betalactamasas.

Las penicilinas son un grupo de antibióticos que contienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, esta estructura deriva de la condensación de una molécula de valina y una de

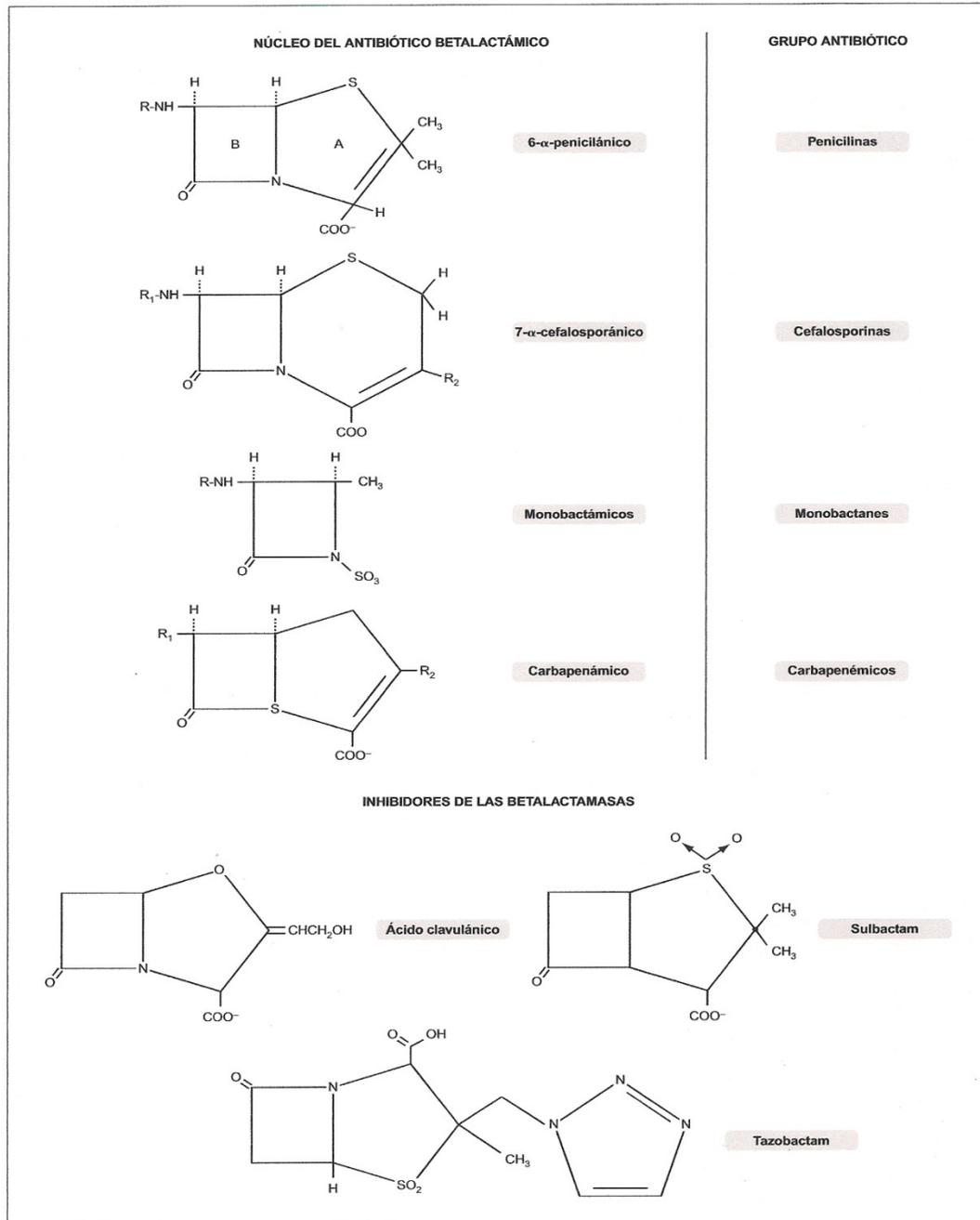
cisteína para dar lugar a un doble anillo. Además de la posición variante 6 del anillo betalactámico la cual define sus propiedades.

Las cefalosporinas son fármacos estructuralmente similares a las penicilinas, su estructura básica está constituida por el núcleo cefem, que consiste en la unión de un anillo dihidrothiacínico y un anillo betalactámico, modificaciones en las cadenas laterales origina diversas cefalosporinas.

Las carbapenemas consisten en un anillo betalactámico fusionado con uno pirrolidínico compartiendo un nitrógeno. Son los antibióticos de más amplio espectro y actividad, debido a que modificaciones en las cadenas laterales, así como su posición espacial, condiciona una mayor afinidad por las proteínas fijadoras de penicilina diana, incremento de la potencia, del espectro antibacteriano y de la resistencia a las betalactamasas.

Los monobactámicos son derivados del ácido 3-aminomonobactámico, posee una estructura betalactámica sencilla con una estructura monocíclica en la que el anillo betalactámico no está fusionado a otro secundario.

12.1.2 Estructuras



12.1.3 Mecanismos de Acción

Los betalactámicos son agentes bactericidas que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana e inducen además un efecto autolítico, la destrucción de la pared celular bacteriana se produce como consecuencia de la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglucano

Las enzimas transpeptidasas y carboxipeptidasas ubicadas entre la membrana plasmática y la pared celular, fijan a las penicilinas y otros betalactámicos. Los betalactámicos actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano la lisis se produce con concentraciones que superan entre 4 y 10 veces la concentración mínima inhibitoria (CIM).

12.1.4 Mecanismos de Resistencia

Las bacterias son capaces de desarrollar resistencia a los antibióticos betalactámicos por varios mecanismos, que en ocasiones se asocian. Puede ser cromosómico, plasmídico o por transposones, la resistencia cromosómica aparece por mutación, mientras que los plásmidos y los transposones pueden ser autotransferibles entre bacterias. Los mecanismos implicados podrían ser: alteración de la permeabilidad, modificación de las dianas, producción de enzimas o expresión de bombas de eliminación activa.

12.2 Método de obtención de neumolisina recombinante

CULTIVO EN FASE MEDIA LOGARÍTMICA DEL SCS1 DE *E. coli* RECOMBINANTE

