

Informe final publicable de proyecto

Investigacion de la etiología bacteriana y serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en niños con empiema pleural.

Código de proyecto ANII: FCE_1_2019_1_156632

Fecha de cierre de proyecto: 01/08/2023

ALGORTA, Gabriela (Responsable Técnico - Científico)
MOTA CIGANDA, María Inés (Co-Responsable Técnico-Científico)
ALONSO, Emilia (Investigador)
BADIA, federica (Investigador)
BETANCOR GARCÍA, laura (Investigador)
BISIO MAC EACHEN, Julieta (Investigador)
DALBORA ALVAREZ, Cecilia Patricia (Investigador)
MÉNDEZ, Ana Paula (Investigador)
PÍREZ GARCÍA, María Catalina (Investigador)
RIAL AREZO, Analía (Investigador)
GUTIERREZ CORREA, Claudia (Becario)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA (Institución Proponente) \\
ADMINISTRACIÓN DE SERVICIOS DE SALUD DEL ESTADO \\
INSTITUTO DE HIGIENE

Resumen del proyecto

El empiema pleural es una complicación grave presente en 10-15% de los niños hospitalizados por neumonía aguda comunitaria (NAC).

En Uruguay la vacunación universal con vacunas conjugadas para *Haemophilus influenzae* tipo b y neumococo determinó cambios epidemiológicos y disminución significativa de las hospitalizaciones por NAC y empiema. Aun así, *S. pneumoniae* sigue siendo el patógeno más frecuente de neumonía bacteriana y empiema.

Los cultivos de sangre y/o líquido pleural logran aislar el agente en menos del 40 % de los casos, pero la disponibilidad de técnicas de detección de ácidos nucleicos ha permitido mejorar este rendimiento.

El objetivo de este trabajo fue mejorar el diagnóstico etiológico mediante la incorporación de técnicas de detección de ácidos nucleicos para poder realizar una adecuada vigilancia epidemiológica, clínica y microbiológica de los casos de empiema pleural en niños.

Metodología. Se incluyeron 249 niños con diagnóstico de empiema pleural entre 2015 y 2022, de los cuales contábamos con alícuota de líquido pleural congelado en 126. Se aplicaron técnicas de PCR para la detección de los agentes bacterianos más frecuentes y para la serotipificación de neumococo directamente sobre muestras de líquido pleural. Se registraron variables clínicas, estado vacunal y resultados microbiológicos de los estudios convencionales realizados a estas muestras.

Resultados. Logramos aumentar el diagnóstico etiológico de 18 a 64% de los pacientes mediante la aplicación de técnicas moleculares y detección de antígenos capsulares. Los principales agentes detectados tanto por cultivo como por PCR fueron *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. pyogenes* y *S. aureus*. Mediante cultivo y serotipificación por Quellung logramos tipificar 17 aislamientos de neumococo. Mediante PCR y secuenciación del gen *cpsB* logramos serotipificar 50 aislamientos más de neumococo. Los serotipos más frecuentes fueron el 3, 1 y 19A; correspondiendo en su totalidad a 58 serotipos vacunales (de los cuales 9 niños estaban no vacunados o incorrectamente vacunados) y 9 serotipo no vacunales. No se encontraron diferencias en cuanto a complicaciones entre el serotipo 3 y el resto de los serotipos.

Conclusiones: La aplicación de técnicas moleculares permitió aumentar significativamente el porcentaje de diagnósticos etiológicos y serotipos de *S. pneumoniae* en empiemas pleurales.

Ciencias Médicas y de la Salud / Ciencias de la Salud / Enfermedades Infecciosas / Microbiología

Palabras clave: empiema pleural / *Streptococcus pneumoniae* / serotipos /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

La neumonía aguda comunitaria (NAC) es una de las mayores causas de morbilidad en niños a nivel mundial. *Streptococcus pneumoniae* es el agente etiológico más frecuentemente encontrado. Luego de la introducción de las vacunas neumococcicas conjugadas se ha reportado una disminución significativa de la incidencia de NAC en distintos países (UNICEF/WHO, Angoulvant F, Kaplan S, Wiese AD, López EL).

El empiema pleural (EP) es una complicación grave que se presenta en 10-15 % de los niños hospitalizados por NAC, determinando un aumento de la morbilidad-mortalidad, prolongación de los días de internación y requerimiento de tratamientos médicos y quirúrgicos más complejos. *S. pneumoniae* también es el agente etiológico más frecuente de EP, superando el 60% en algunos estudios. *Streptococcus pyogenes* y

Staphylococcus aureus le siguen en frecuencia; otros patógenos son *Haemophilus influenzae*, otras especies de *Streptococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycobacterium tuberculosis* (Krenke K, Liese JG).

El tratamiento del EP es complejo e incluye la administración de antibióticos, drenaje, administración de fibrinolíticos y cirugía videoasistida. Los resultados de los estudios microbiológicos por lo general no están disponibles en el momento de la toma de decisiones y además solo en un pequeño porcentaje pacientes se logra el aislamiento del agente, por lo que los tratamientos empíricos se basan en estudios epidemiológicos y datos microbiológicos locales. Por ello, los estudios sobre la etiología del EP tienen un importante impacto en el adecuado cuidado de estos pacientes (Badía F).

La confirmación del agente etiológico es dificultosa en la NAC. Las técnicas habituales de cultivo de sangre y/o líquido pleural logran aislar el agente en 5-10% de los casos. En niños con empiema este porcentaje puede aumentar a alrededor de 40%. Esto puede deberse a la administración de antibióticos previo a la extracción de las muestras, la labilidad de los agentes involucrados en la patología, el inadecuado manejo de las muestras, condiciones que pueden determinar que los microorganismos no estén viables y no se aislen en los medios de cultivo habituales.

El manejo adecuado de las muestras, la incorporación de técnicas como la detección de antígenos o la detección de ácidos nucleicos permitirían aumentar la confirmación etiológica (Miller JM). Las técnicas de detección de ácidos nucleicos no requieren de bacterias viables, y han demostrado ser más sensibles que los cultivos bacterianos, incrementando de manera importante la detección de *S. pneumoniae* y otros agentes. Liese y col. en un estudio epidemiológico de EP entre 2010 y 2017 en Alemania detectaron bacterias en 448 (33,7%) de 1447 niños; esto se logró mediante hemocultivo en 106/1078 (9,8%), aislamiento del agente en cultivo de líquido pleural 222/646 (34,4%), detección de ácidos nucleicos en líquido pleural 239/449 (53,2%). En 34,2% de los niños solo se detectó el agente por PCR. Krenke y col. obtuvieron resultados similares en Polonia en el periodo 2011-2013. Los métodos moleculares les permitieron además detectar virus y bacterias que habitualmente no crecen en los medios de cultivo.

Alrededor de 15 serotipos de *S. pneumoniae* causan la mayoría de las enfermedades invasivas aunque se han descrito más de 90 serotipos capsulares. El conocimiento de los serotipos responsables de las enfermedades invasivas es importante para entender la epidemiología de neumococo, planificar planes de vacunación y evaluar el impacto de los planes actuales (Azzari C). La serotipificación se realiza habitualmente con antisueros mediante la reacción capsular de Quellung. Esta técnica tiene un alto costo, requiere de un operador entrenado, la interpretación es subjetiva y necesita del aislamiento de las bacterias en el cultivo. Hace ya algunos años se han desarrollado técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permiten la serotipificación directa en muestras de líquidos biológicos. Los genes de la síntesis del polisacárido capsular se localizan en el locus *cps*, típicamente con la misma organización genética y flanqueado por los genes conservados *dexB* y *aliA*. Los primeros 4 genes son conservados en casi todos los serotipos, mientras que la porción central del locus contiene los genes serotipo-específicos que sirven como base para su diferenciación mediante PCR (Pais R, Dias C). Otros trabajos más recientes han descrito la determinación del serotipo basado en la secuencia genética del locus *cps* (Leung MH, Gonzalez-Siles L, Dube FS).

En Uruguay la introducción de las vacunas conjugadas para *Haemophilus influenzae* tipo b en 1994 y la vacuna neumocócica 7 valente (VCN7v) en 2008 y posteriormente sustituida por la 13 valente (VCN13v) en 2010, determinaron cambios epidemiológicos y una disminución significativa de las hospitalizaciones por NAC y empiema paraneumónico.

En los 5 años previos a la vacunación universal con VCN7v se constató un aumento de las hospitalizaciones

de niños con empiema; *S. pneumoniae* fue el agente involucrado en más del 90% de los casos con etiología confirmada y los serotipos más frecuentemente involucrados fueron 14, 5, 1, 3, 9V, 7F, 6B y 19A. La aplicación de VCN7v determinó una reducción significativa de las hospitalizaciones por NAC, neumonía neumocócica y empiema neumocócico. Los serotipos más frecuentemente asociados a empiema (1, 3, 5, 7F y 19 A) no estaban incluidos en la vacuna VCN7v. Los serotipos 1 y 5 determinaron entre los años 2003 y 2004 un brote de NAC y empiema en hospitales de Uruguay. La posterior sustitución de la VCN7v por la VCN13v continuó y acentuó la disminución de las hospitalizaciones por NAC, neumonía neumocócica y empiema. Después del año 2010 *Streptococcus pneumoniae*, sigue siendo aún el patógeno más frecuente de neumonía bacteriana y empiema seguido de *S. aureus*, *H. influenzae* y *S. pyogenes* como agentes etiológicos (Pírez MC 2011 y 2014, Montano A, Ferrari AM, Hortal M, García Gabarrot G).

Antecedentes del equipo de trabajo

En el Hospital Pediátrico del Centro Hospitalario Pereira Rossell (CHPR) hace más de 25 años, se realiza la vigilancia de la etiología de los casos hospitalizados por NAC con o sin complicaciones. Esta información que surge de estudios clínicos, microbiológicos y epidemiológicos, se ha tenido en cuenta para establecer las pautas nacionales de tratamiento de estas patologías, y ha aportado información valiosa para la toma de decisiones en el momento de incorporar vacunas conjugadas, como la vacuna anti-*Haemophilus influenzae* tipo b y vacunas anti-neumocócicas. La vigilancia microbiológica de esta patología luego de la introducción de las vacunas es fundamental para evaluar posibles cambios epidemiológicos en cuanto a serotipos de *S. pneumoniae* (fenómeno de “reemplazo de serotipos”) y la frecuencia de otros agentes etiológicos (Slinger R).

En un estudio realizado por Ferrari AM y colaboradores sobre la “Etiología de la neumonía bacteriana adquirida en la comunidad en niños hospitalizados. Uruguay 1998-2004” el promedio anual de hospitalizaciones por NAC en niños en HP-CHPR fue 1339 (en promedio 8,7% de los egresos). *Streptococcus pneumoniae* fue el agente más frecuente todos los años identificándose en 512 casos (91,4% de los casos con etiología confirmada). Los agentes que le siguieron en frecuencia fueron *S. aureus* 25 casos; *H. influenzae* 19 casos y *S. pyogenes* en 4. Los serotipos predominantes de *S. pneumoniae* fueron: 14, 1 y 5, seguidos por serotipo 3 (80,6% del total de cepas tipificadas). Esos mismos serotipos fueron los más frecuentemente identificados en los casos de empiema pleural (EP), seguidos de 9V, 7F, 6B y 19A.

Un estudio posterior sobre etiología de NAC y NAC complicada en niños hospitalizados en HP-CHPR fue publicado en 2014 por MC Pírez y colaboradores. El mismo abarcó 3 períodos: pre-vacunación (2003-2007), durante la implementación de VCN (2008) y post implementación (2009 a 2012). Los resultados revelaron que las tasas de hospitalización por neumonía y neumonía neumocócica descendieron 78.1% y 92.4% respectivamente desde el periodo prevacunal hasta el último año del periodo postvacunal. Se observó reducción significativa de los 13 serotipos incluidos en PCV13 y un aumento significativo de serotipos no vacunales.

Además las tasas de hospitalización por neumonía asociada a *Staphylococcus aureus* descendieron mientras que las asociadas a *H. influenzae* permanecieron estables.

Otro trabajo presentado en el Congreso Latinoamericano de Infectología Pediátrica SLIPE XXVII por este grupo de trabajo (Gutiérrez C 2017) describe la etiología del EP en niños asistidos en el HP-CHPR entre 2005-2017. Se realizó un estudio descriptivo, considerando períodos pre-vacunación (2005-2007), incorporación-VCN7/13 (2008-2010) y post-vacunación (2011-2016). Egresaron 912 niños con EP, tasa promedio anual de hospitalizaciones cada 10.000 egresos en cada período de 111, 55 y 29 (diferencia estadísticamente significativa entre ellos). En 36% de ellos se determinó la etiología mediante cultivo; la tasa promedio anual de empiema neumocócico fue 36, 21 y 6 respectivamente. *S. pneumoniae* sigue siendo el agente más frecuentemente aislado (278 casos) seguido por *S. aureus* 25 casos; *H. influenzae* 19 casos y

S. pyogenes en 8.

Habiendo incorporado técnicas de biología molecular con un uso off-label de la plataforma Biofire® FilmArray® (Biomerieux) con panel de meningitis/encefalitis hemos mejorado el diagnóstico etiológico del EP llegando a detectar la etiología en un 50% de las muestras (Gutiérrez C 2018). En dicho trabajo se analizaron 92 muestras de líquido pleural recibidas en el laboratorio de CHPR entre 1/8/2016 y 31/7/2018. Dieciséis por ciento (16%) de las mismas tuvieron desarrollo en el cultivo y 40% de las muestras con cultivo negativo tuvieron PCR positiva para *S. pneumoniae* y/o *H. influenzae*. Sin embargo, la mitad de los casos permanecen sin diagnóstico etiológico y en el grupo con PCR positiva para neumococo o *H. influenzae* desconocemos los serotipos correspondientes.

Abordaje

En este trabajo nos propusimos estudiar las características clínicas y microbiológicas de todos los niños con EP hospitalizados en el CHPR entre 2015 y 2022. Para mejorar el conocimiento de la etiología del EP y de los serotipos de neumococo involucrados, a los estudios microbiológicos habituales realizados en nuestro centro los complementaremos con nuevas técnicas de biología molecular aplicadas directamente sobre las muestras de líquido pleural. Para ello contamos con alícuotas de algunas de las muestras de líquido pleural que llegan al laboratorio de bacteriología del CHPR congeladas a -80°C (todas aquellas en las que luego del procesamiento habitual restaba muestra). Incorporamos PCR para el gen 16S rRNA y para el gen *cpsB* de neumococo con posterior secuenciación y alineamiento de secuencias utilizando la base de datos de Genbank® con el fin de detectar material genético de cualquier agente bacteriano presente en la muestra y poder tipificar la cápsula de neumococo.

Además se registraron datos de los pacientes a partir de las historias clínicas que nos permitieran evaluar la evolución de la enfermedad, presencia de complicaciones, tratamientos antibióticos instaurados, así como el estado vacunal de los niños y ver su asociación con etiología y serotipos de neumococo.

Con el análisis de los resultados esperamos mejorar el rendimiento del diagnóstico etiológico del EP y analizar si los serotipos de neumococo más frecuentemente detectados corresponden o no a los incluidos en la vacuna PVC13 presente en el Certificado Esquema de Vacunación (CEV). Establecer si los niños que enferman por serotipos vacunales de neumococo están correctamente vacunados o no. Determinar si existe relación entre algunos serotipos de neumococo y evolución clínica desfavorable.

Conocer los perfiles de sensibilidad de los agentes de EP y la adecuación de las pautas de tratamiento. En conjunto esperamos que todos estos datos nos permitan mejorar la vigilancia epidemiológica de los casos de EP en cuanto al conocimiento de los agentes etiológicos, los serotipos, susceptibilidad de los agentes a los antimicrobianos, presencia de complicaciones lo cual resulta indispensable a la hora de realizar recomendaciones sobre el tratamiento de esta enfermedad y sobre la adecuación de las vacunas disponibles.

Metodología/Diseño del estudio

Tipo estudio. Criterio de inclusión.

Estudio observacional, descriptivo, retrospectivo. Se incluyeron todos los niños con diagnóstico de empiema pleural (EP) hospitalizados en HP-CHPR entre 2015 y 2021.

Para el diagnóstico de empiema pleural se utilizará la siguiente definición: presencia en el líquido pleural (LP) de un criterio mayor (pus y/o evidencia de bacterias), y/o 2 criterios menores: glucosa menor o igual a 40 mg/dl, pH menor o igual a 7.10, lactato deshidrogenasa (LDH) mayor o igual a 1.000 UI/L, recuento de leucocitos mayor o igual a

10³/mm³ y 90% o más de leucocitos polimorfonucleares (PMN).

Recolección de los datos.

Se revisaron las bases de datos hospitalarias, identificando los niños con diagnóstico de EP. Se registraron los datos demográficos, enfermedades subyacentes, estado vacunal, presentación y evolución clínica, tratamientos instaurados. De los registros del laboratorio se obtuvieron resultados de leucocitosis, reactantes de fase aguda, citoquímico del LP, cultivos, sensibilidad antibiótica y resultado de FilmArray de las muestras de LP.

Estudios microbiológicos convencionales.

El estudio microbiológico de los niños con empiema pleural incluye el cultivo de sangre y/o líquido pleural (LP).

No se requirió la extracción de muestras clínicas adicionales para los pacientes ya que se trabajó sobre las muestras de sangre y/o líquido pleural obtenidas rutinariamente como parte de los protocolos de atención y manejo de estos pacientes con EP.

Las muestras se procesaron mediante los métodos microbiológicos de rutina. Además en el caso de LP se realizó la detección de antígenos solubles por aglutinación de partículas de látex para *S. pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* tipo b (Pastorex TM Meningitis Bio-Rad®) y a partir del año 2016 se utilizó un sistema comercial cerrado de detección de ácidos nucleicos (RT-PCR) para *S. pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* (FilmArray®- Biomerieux), de ahora en más FA, con panel de Meningitis/Encefalitis. FA integra la extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos en la muestra y si bien no hay un diseño de panel aprobado para su uso en líquidos pleurales, nosotros lo aplicamos en forma experimental con buenos resultados.

Cuando existe sospecha clínica de enfermedad tuberculosa se realiza baciloscopia, RT-PCR para detección conjunta de micobacterias del complejo tuberculosis y resistencia a rifampicina (GeneXpert®- Cepheid) y se envía parte de la muestra al laboratorio nacional de referencia de la Comisión Honoraria de Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes.

En caso de recuperar gérmenes en los cultivos de sangre y/o LP, la identificación y susceptibilidad a los antimicrobianos se realizó en sistema automatizado VITEK 2® (Biomérieux) y se interpretó de acuerdo a las normas vigentes en la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Las muestras de hemocultivo con desarrollo bacteriano también se estudiaron con panel de hemocultivos (Blood Culture IDentification, BCID) de FilmArray®.

En el caso de *S. pneumoniae* también se hizo determinación de concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) por E-test para penicilina y cefotaxima. Para el caso de *Haemophilus influenzae* se realizó la detección de beta-lactamasas por el método de nitrocefina pero no se realizaron otros estudios de susceptibilidad a los antibióticos.

Todos los aislamientos recuperados de muestras de sangre y/o líquido pleural se remitieron al Departamento de Laboratorios de Salud Pública (DLSP) para su tipificación y en el caso de *H. influenzae* para el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana también.

Técnicas moleculares complementarias

Extracción de ácidos nucleicos de muestra de líquido pleural. La extracción de ADN de 126 muestras de líquido pleural almacenadas a -80 °C se realizó con kit comercial DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) siguiendo el protocolo para líquidos biológicos recomendado por el fabricante. En algunas muestras con alto contenido de sangre, pus o fibrina, se realizó una incubación adicional a 95 °C durante 15 minutos después de la digestión con proteinasa K para asegurar la lisis completa de las células bacterianas. Se obtuvo ADN de calidad (relación A260/280 > 1,6) en 123 muestras.

Control de calidad interno de la presencia de ADN en los extractos. Para evaluar los procedimientos de extracción de ADN, y corroborar la ausencia de inhibidores de la PCR en la muestra se amplificó el gen de la ARNasa P humana mediante RT-qPCR con los cebadores: RP1-F: AGATTTGGACCTGCGAGCG, RP1-R: GAGCGGCTGTCTCCACAAGT (Wozniak A).

Identificación bacteriana.

PCR de tiempo final para 16S rRNA.

En la PCR para amplificación de un fragmento de 798-bp del gen 16S rRNA correspondiente a la posición 8-806 del gen 16S rRNA de *Escherichia coli* se utilizaron los cebadores BAK11w-F (5'-AGTTTGATCTGGCTCAG-3') y PC3mod-R (5'-GGACTACHAGGGTATCTAAT-3') según Liese JG con modificaciones. El ciclado consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido de seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 58°C durante 25 s, extensión de cebadores a 72°C durante 30s y un paso de extensión final a 72°C durante 5 min. Mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con tinción de bromuro de etidio se visualizaron en transiluminador UV los productos de PCR. Aquellos amplicones con un tamaño de banda esperados para 16S rRNA fueron purificados con el kit comercial de purificación de ácidos nucleicos (Monarch® NEB) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y posteriormente enviados a Macrogen Inc, Korea para su secuenciación con los cebadores utilizados en la PCR.

Las secuencias de ADN fueron analizadas individualmente y alineadas; una vez obtenida la secuencia consenso se consultó a la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). La identificación se realizó en base de similitud de secuencia: se clasificó a nivel de especie cuando el porcentaje de identidad fue de al menos 99,0% con alguna secuencia de la base de datos, a nivel de Género cuando fue entre 97 y 99%, entre 97,0 % y 95,0 % como estrechamente relacionado con un género. Para aquellos aislados que comparten menos del 95 % de identidad con una secuencia de referencia, la base de datos de referencia puede ser insuficiente y/o el aislado puede representar una especie nueva (She CR).

PCR en tiempo real para gen Xisco.

Specific PCR-amplification primers for the "Xisco" gene sequence were designed: forward primer, Spne-CW-F2 (5'-TGA CGA TTC TAG GAA AAG ATA CAG-3'); and reverse primer, Spne-CW-R (5'-AGC AGG TGA CTG GTA GGT AAC-3') (Salvá-Serra F)

PCR en tiempo real para gen plyA.

La detección de este gen específico de la especie *S. pneumoniae* se realizó con cebadores PLY-F -TGG TGC CTA TGT TGC CCA AT y PLY-R CCC ATT TCT GTC CCA AGC CT.

Tipificación capsular de neumococo por análisis de secuencias nucleotídicas de cpsB.

La PCR se realizó de acuerdo a protocolo de Gonzalez Siles et. al. con modificaciones. El ciclado consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido de seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 58°C durante 25 s, extensión de cebadores a 72°C durante 1 min y un paso de extensión final a 72°C durante 5 min.

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 50 minutos a 120V. Se incluyó marcador de peso molecular de 1kb para el análisis. Los productos de ADN teñidos con Bromuro de Etidio se visualizaron en transiluminador UV. Aquellos amplicones con un tamaño de banda esperado (aproximadamente 1061pb) fueron purificados con el kit comercial de purificación de ácidos nucleicos (Monarch® NEB) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los amplicones purificados fueron enviados a MacroGen Inc. Korea secuenciación con los cebadores utilizados en la PCR (directo cps1, 5'-GCA ATG CCA GAC AGT AAC CTC TAT-3' y reverso cps2, 5'-CCT GCC TGC AAG TCT TGA TT-3').

Las secuencias de ADN fueron analizadas individualmente y alineadas, una vez obtenida la secuencia consenso se consultó a la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) y se asignaron los serotipos correspondientes de acuerdo a los siguientes criterios: se definió el serotipo cuando el porcentaje de identidad fue mayor al 98% y la diferencia con el segundo serotipo fue mayor al 1%. En aquellos casos en que el porcentaje de identidad fue menor al 98% y mayor a 90% o la diferencia con el segundo serotipo fue menor al 1% se clasificaron como serotipo probable. Por último cuando el porcentaje de identidad fue menor al 1% se definió como serotipo indeterminado.

Validación de las técnicas de PCR 16S rRNA y cps: Para validar los resultados de la técnica de PCR se realizó análisis comparativo entre los resultados de aquellas muestras con cultivo identificadas y serotipificadas mediante la técnica de Quellung por el Departamento de Laboratorios de Salud Pública de nuestro país y los resultados obtenidos de la secuenciación de los fragmentos amplificados de 16S rRNA y cps en nuestro trabajo.

Estadística

Las variables continuas se presentan como medias, medianas y rangos. Los resultados de los diferentes estudios microbiológicos se muestran como frecuencia absoluta y relativa. Las diferencias entre proporciones se analizaron usando el test de Chi². Se aceptó significancia estadística a valores de p menores de 0.05. Para los cálculos se utilizó el programa OpenEpi (Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Versión. www.OpenEpi.com, actualizado 2013/04/06, accedido 2023/07/31).

Resultados, análisis y discusión

Características clínicas. Incluimos 249 niños con diagnóstico de empiema pleural hospitalizados en el Hospital Pediátrico del Centro Hospitalario Pereira Rossell entre enero de 2015 y diciembre de 2021.

Se realizó la revisión de los datos clínicos de los pacientes. Se analizaron los datos de 201 (80.7%) pacientes con empiema pleural para los que se tuvo acceso a la historia clínica. Los pacientes presentaron las siguientes características: 60,7% sexo masculino, media de edad 49,3 meses, 10,4% presentaban comorbilidades, 13,9% no tenían el esquema de vacunación vigente. Requirieron ingreso a CTI 41,3%, asistencia ventilatoria mecánica 15,9%, presentaron algún tipo de complicación 48,8% (sepsis, fístula broncopleurale, neumonía necrotizante, etc), un solo paciente falleció (0,5%).

Agentes etiológicos identificados.

Para la determinación del etiólogía se tuvo en cuenta la realización de varias técnicas pero no todas se aplicaron al mismo número de pacientes: se realizó cultivo a 233 pacientes determinación de antígenos capsulares en 84 pacientes y PCR por FilmArray a 91 pacientes en el laboratorio de microbiología del Centro Hospitalario Pereira Rossell.

Además en 123 niños de los cuales se pudo obtener ADN de las muestras congeladas de LP se realizó identificación por 16S en 74 muestras, Xisco en 123 y del gen *ply* 84.

Se identificó la etiología en 161 pacientes (65%). La identificación se obtuvo por cultivo en 46 pacientes (28%), antígenos capsulares en 11 pacientes (7%), antígenos capsulares y PCR en 38 pacientes (24%) y PCR 66 pacientes (41%).

Se identificó *S. pneumoniae* en 135 casos, 17 *H. influenzae* (8 tipo b y 9 no b), 10 *S. pyogenes*, 2 *S. aureus*, 3 cultivos polimicrobianos, 1 *S. intermedius*, 1 *S. sanguinis*, 1 *E. coli* y 1 *K. pneumoniae*, 2 *Mycobacterium tuberculosis complex*, 1 *Bacteroides vulgatus*, 1 *Prevotella melaninogenica*. Se detectaron coinfecciones en 14 niños: 10 *S. pneumoniae* y *H. influenzae* (4 tipo b y 6 no b), 1 *S. pyogenes* y *H. influenzae* tipo b, 1 *S. pneumoniae* y *B. vulgatus*, 1 *S. pneumoniae* y *M. tuberculosis complex*, 1 *Klebsiella pneumoniae* y *Prevotella melaninogenica*.

Serotipos de *S. pneumoniae*. Se pudo establecer el serotipo de neumococo en 73 (54%): 45 fueron serotipo 3, 7 serotipo 1, 4 serotipo 19A, 2 serotipo 8, 2 serotipo 12F, 1 serotipo 7B/C, 1 serotipo 9N, 1 serotipo 14, 1 serotipo 15A y 1 serotipo 24F. No se pudo diferenciar entre serotipos del mismo grupo: 1 serotipo 15A/F. Y por último en 1 caso no se pudo diferenciar entre los 1 probable 14/19F.

De los pacientes en quienes se pudo identificar el serotipo se pudo analizar la historia clínica de 62 (85%). De estos, 40 correspondieron a serotipo 3, 7 a serotipo 1, 4 a serotipo 19A, 2 a serotipo 8, 2 a serotipo 12F, 1 serotipo 7B/C, 1 serotipo 9N, 1 serotipo 14, 1 serotipo 15A, y 1 serotipo 24F.

Presentaron complicaciones 10 (25%) pacientes con serotipo (1 bacteriemia, 2 shock sépticos, y 7 fallos respiratorios). De los pacientes con identificación de otros serotipos 5 (18,5%) presentaron complicaciones (1 bacteriemia, 1 shock sépticos, y 5 fallos respiratorios) ($p=0,62$). Ningún paciente analizado falleció.

El estado vacunal de los niños era el siguiente:

serotipo 3: 1 no vacunado, 2 incorrectamente vacunados, 37 correctamente vacunados.

serotipo 1: 3 no vacunados, 2 incorrectamente vacunados y 3 correctamente vacunados.

serotipo 14: 2 correctamente vacunados.

serotipo 19A: 1 incorrectamente vacunado y 2 correctamente vacunados.

H. influenzae tipo b. Se identificó el serotipo b en 8 de 17 *H. influenzae* detectados. De ellos 6 estaban correctamente vacunados y 3 incorrectamente vacunados.

Susceptibilidad antibiótica. De los estudios de susceptibilidad antibiótica se destaca que todas las cepas de *S. pneumoniae* fueron sensibles a los betalactámicos para los puntos de corte de sitio no meníngeo (≤ 2 mg/L), 3 resultaron resistentes a clindamicina, 4 a eritromicina y 2 a trimetoprim sulfametoxazol.

Las cepas de *H. influenzae* fueron negativas para la producción de betalactamasas y sensibles a todos los antibióticos testados (betalactámicos, clindamicina, levofloxacina, eritromicina, linezolid y trimetoprim

sulfametoxazol).

Una de las 2 cepas de *S.aureus* fue resistente a meticilina con un perfil de resistencia comunitario y otra presentó resistencia aislada a eritromicina.

Las cepas de *S.pyogenes* resultaron sensibles a los beta-lactámicos, eritromicina y clindamicina y levofloxacina.

Control de calidad de la extracción de ADN del líquido pleural. Se realizó PCR real time para el gen *ARNasaP* para verificar que la extracción de ácidos nucleicos de las muestras de líquido pleural fue realizada correctamente. Se realizó una curva con diluciones de las muestras y obtuvimos resultados positivos hasta una concentración de 2-10 pg/mL de ADN total (cuantificado por espectrofotometría). Se logró amplificar el gen en todas las muestras.

Identificación bacteriana mediante 16S rRNA.

Se realizó PCR para fragmento de 798 pb del gen 16S rRNA en 99% de las muestras. Se secuenciaron los productos de amplificación de 16S rRNA de 74 muestras y se compararon con las bases de datos NCBI mediante la herramienta BLASTn obteniéndose la identificación a nivel de especie en 68 muestras: 51 *S. pneumoniae*, 10 *H. influenzae*, 5 *Streptococcus pyogenes*, 1 *Bacteroides vulgatus* y 1 *Escherichia coli*; a nivel de género 3 *S. pneumoniae*, 1 *H.influenzae* y 1 *Prevotella melaninogenica*; y como estrechamente relacionado al género 1 *S. pneumoniae* y 1 *Staphylococcus hominis*.

Detección de *S.pneumoniae*:

Para la detección de *S. pneumoniae* en las muestra de líquido pleural se realizaron las siguientes técnicas:
Cultivo (n=126)

Detección de antígenos capsulares (n=67)

Detección de ácidos nucleicos por FA (n=69)

Detección de ácidos nucleicos por 16s rRNA (n=125)

Detección de ácidos nucleicos por Xisco (n=126)

Detección de ácidos nucleicos por ply (n=84)

Comparación de técnicas. Para la comparación de las diferentes técnicas en cuanto a rendimiento diagnóstico se definió como muestra positiva para *S. pneumoniae* el aislamiento de la bacteria en el cultivo, la detección mediante PCR para 16s rRNA con un porcentaje de identidad mayor o igual a 99%, o la detección de antígenos capsulares o ácidos nucleicos en por lo menos dos del resto de las técnicas (FA, Xisco o ply).

Según esta definición se identificaron 94 *S.pneumoniae*. Se calculó la sensibilidad y especificidad para cada una de las técnicas, los resultados se muestran en la tabla 1.

Detección de serotipos capsulares por secuenciación de *cpsB*.

Para la verificación de la técnica se compararon los resultados de la secuenciación con el serotipo obtenido mediante la técnica de Quellung en aquellas muestras con desarrollo en el cultivo derivadas al Departamento de Laboratorios de Salud Pública (Tabla 2).

Se definieron 3 categorías:

coincidencia: porcentaje de identidad mayor al 98% y diferencia con el segundo serotipo mayor al 1%.

serogrupo específico: porcentaje de identidad no permitió diferenciar entre distintos tipos del mismo

serogrupo.

concordante: porcentaje de identidad no permite diferenciar serotipos pero incluye el resultado obtenido por técnica de Quellung con un porcentaje de identidad mayor al 98%.

Se secuenciaron los productos de amplificación de *cpsB* de 49 muestras y se compararon con las bases de datos NCBI mediante la herramienta BLASTn obteniéndose la identificación de 25 serotipo 3 y 5 probables serotipo 3, 3 serotipo 1 y 2 probable serotipo 1, 4 serotipo 19A, 1 serotipo 8 y 1 probable serotipo 8, 1 identificación a nivel de serogrupo 9n/9l (detalle ** tabla 3), 1 probable identificación de serogrupo 15A/15F y 1 identificación concordante entre los serotipos 12B, 46, 12A, 44 y 12F (detalle * tabla 3). En 5 muestras no se pudo determinar el serotipo por secuenciación.

De los 134 *S. pneumoniae* identificados se determinó el serotipo por cultivo en 27 (20%) y con el agregado de las técnicas moleculares se logró la determinación en 67 (50%) ($p < 0,0001$). Los serotipos identificados se detallan en la Tabla 3.

Discusión

A pesar de la disminución de la NAC y sus complicaciones mediante la vacunación con *Haemophilus influenzae* tipo b y PCV7/13 en nuestro país, el EP sigue siendo una complicación que determina importante morbilidad en niños. El agente más frecuente es *S. pneumoniae* (84%), seguido por *H. influenzae*, *S. pyogenes* y *S. aureus*.

La aplicación de técnicas no dependiente de cultivo como los antígenos capsulares y más recientemente las técnicas de detección de ácidos nucleicos han mejorado sustancialmente el conocimiento de la etiología de estas enfermedades, ya que el cultivo suele ser negativo debido sobre todo a la administración previa de antibióticos. En este trabajo el aumento del rendimiento diagnóstico mediante el uso de estas técnicas fue de 2 veces y media con respecto al cultivo pasando de un 18 a un 65% de los pacientes. Es de destacar además que si bien en prácticamente todos los casos se hizo cultivo, no en todos se pudieron aplicar técnicas moleculares y de detección de antígenos, ya sea por falta de disponibilidad de los sistemas comerciales o por falta de muestra de LP para realizar las técnicas complementarias (16S, Xisco y ply), con lo cual todas estas técnicas están infravaloradas en cuanto a su sensibilidad en este trabajo.

Al no contar con una tenencia gold standard contra la cual comparar el rendimiento de cada una de las técnicas aplicadas, es que definimos un estándar propio como fue detallado en materiales y métodos. De acuerdo a este la técnica más sensible fue la detección del gen ply seguido de detección por FA y luego por gen Xisco, con valores mayores al 90%.

La aplicación de identificación bacteriana por análisis de fragmentos de 16S rDNA para *S. pneumoniae* así como de del gen capsular *cpsB* fue verificada comparando con las técnicas estandar de identificación y serotipificación a partir de cultivos bacterianos, con coincidencia en 94% y 88% respectivamente. Cabe destacar que no hubo errores en la identificación ni en la tipificación capsular sino que las no coincidencias se debieron a la falta de amplificación en 1 muestra para 16S rRNA y en 2 muestras que amplificaron débilmente para *cps* por lo cual no se pudieron secuenciar. La limitante fue que en un % importante de muestras no pudimos obtener amplificación específica y por tanto no se pudo secuenciar. Creemos que esto se debe a la naturaleza de las muestras y el extenso tiempo de conservación (de hasta hasta 7 años) a -80°C. Para resolver este problema nos propusimos en una próxima etapa analizar estas muestras por el RT-PCR usando los cebadores y condiciones establecidas por el CDC. En ese sentido empezamos a trabajar

colaborativamente con el laboratorio de bacteriología del DLSP para la realización de dichas PCR.

Los serotipos de neumococo correspondieron en su mayoría al serotipo 3. Si bien dicho serotipo se encuentra incluido en las vacunas PCV7 y PCV13 se sabe que la protección no es total para dicho serotipo y por ello se está investigando en el desarrollo de nuevas vacunas que mejoren la protección contra la enfermedad producida por el serotipo 3.

Conclusiones y recomendaciones

S. pneumoniae es el agente más frecuente de EP, seguido de *H. influenzae* y *S. pyogenes*. El serotipo 3 continua es el más frecuentemente recuperado dado cuenta de más de la mitad de los casos por lo cual contar con una vacuna eficaz contra este serotipo sería deseable para disminuir aún más los casos de esta enfermedad.

Las técnicas moleculares mejoran significativamente el rendimiento diagnóstico de esta enfermedad aumentando los casos con etiología identificada y serotipos de *S.pneumoniae* con respecto al cultivo.

Referencias bibliográficas

Angoulvant F, Levy C, Grimprel E, Varon E, Lorrot M, Biscardi S, Minodier P, Dommergues MA, Hees L, Gillet Y, Craiu I, Zenkhri F, Dubos F, Guen CG, Launay E, Martinot A, Cohen R. Early impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on community-acquired pneumonia in children. *Clin Infect Dis*. 2014 Apr;58(7):918-24. doi: 10.1093/cid/ciu006. Epub 2014 Feb 13

Azzari C, Moriondo M, Indolfi G, Cortimiglia M, Canessa C, et al. (2010) Realtime PCR Is More Sensitive than Multiplex PCR for Diagnosis and Serotyping in Children with Culture Negative Pneumococcal Invasive Disease. *PLoS ONE* 5(2): e9282. doi:10.1371/journal.pone.0009282

Badía, F; Assandri, E; Pujadas, M; Machado, MK; Varela, A; Gutierrez, C; Mota, I; Le Pera, V; Puglia P; Piñeiro S; Kenny J; Algorta, G; Pírez MC Catalina. Hospitalizaciones por empiema paraneumónico en un hospital pediátrico de referencia entre los años 2005 y 2016. XXXI Congreso Uruguayo de Pediatría, Montevideo octubre 2017

Carvalho Mda G, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee L, Mayer LW, Steigerwalt A, Whaley M, Facklam RR, Fields B, Carlone G, Ades EW, Dagan R, Sampson JS. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. *J Clin Microbiol*. 2007;45(8):2460-6;doi:10.1128/JCM.02498-06.

Dube FS, van Mens SP, Robberts L, et al. Comparison of a Real-Time Multiplex PCR and Sequotyping Assay for Pneumococcal Serotyping. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137349. Published 2015 Sep 3. doi:10.1371/journal.pone.0137349

Ferrari AM, Pírez MC, Martínez A, Algorta G, Chamorro F, Guala MJ, Zabala C, Giachetto G, Montano A. Etiología de la neumonía bacteriana adquirida en la comunidad en niños hospitalizados. Uruguay 1998-2004. *Rev Chil Infect* 2007; 24 (1): 40-47.

Gonzales-Siles L, Salvà-Serra F, Degerman A, et al. Identification and capsular serotype sequotyping of *Streptococcus pneumoniae* strains. *J Med Microbiol*. 2019;68(8):1173-1188. doi:10.1099/jmm.0.001022

Gutiérrez C, Badia F, Mota MI, Varela A, Assandri E, Le Pera V, Machado K, Pujadas M, Pírez C, Algorta G. Etiología del empiema pleural en niños en la era vacunal. XVII Congreso Latinoamericano de Infectología Pediátrica, XXXVI Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica, 2017

Gutiérrez C, Mota MI, Varela A, Algorta G. Diagnóstico etiológico del empiema pleural utilizando el panel meningoencefalitis FilmArray®. Congreso Infectología Pediátrica en el Conosur, 2018.

Hortal M, Estevan M, Laurani H, Iraola I, Meny M and Paysandú/Salto Study Group Hospitalized children with pneumonia in Uruguay: Pre and post introduction of 7 and 13-valent pneumococcal conjugated vaccines into the National Immunization Program. *Vaccine* 2012; 30 (33): 4897-5058.

Kaplan SL, Barson WJ, Lin PL, Romero JR, Bradley JS, Tan TQ, Hoffman JA, Laurence B, Givner LB, and Mason EO. Early trends for invasive pneumococcal infections in children after the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32:203–207.

Krenke K, Sadowy E, Podsiay E, Hryniewicz W, Demkow U, Kulus M. Etiology of parapneumonic effusion and pleural empyema in children. The role of conventional and molecular microbiological tests. *Respiratory Medicine* 116 (2016) 28e33

Leung MH, Bryson K, Freystatter K, Pichon B, Edwards G, Charalambous BM, et al. (2012) Sequotyping: serotyping *Streptococcus pneumoniae* by a single PCR sequencing strategy. *J Clin Microbiol* 50: 2419–2427. doi: 10.1128/JCM.06384-11 PMID: 22553238

Liese JG, et al., Changes in the incidence and bacterial aetiology of paediatric parapneumonic pleural effusions/ empyema in Germany, 2010e2017: a nationwide surveillance study, *Clinical Microbiology and Infection* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.10.020>

López EL, Glatstein E, Ezcurra GC, Iacono M, Teplitz E, Garner AV, Lazzarini DL, Vázquez M, Contrini MM. Rapid Decrease in Rates of Hospitalization Resulting From Invasive Pneumococcal Disease and Community-Acquired Pneumonia in Children Aged <60 Months After 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Introduction in Argentina. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2017 Feb 23. doi: 10.1093/jpids/piw089. [Epub ahead of print]

Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S et al. A guide to utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis* 2018: XX (XX XXXX). Download from <https://academic.oup.com/CID/advance-article-abstract/doi/10.1093/cid/ciy381/5046039> by guest on 02 July 2018.

Montano A; Algorta G; Pérez MC; Farcilli R; Pascale G; Ferrari AM. Enfermedades invasivas por *Haemophilus influenzae* tipo b. Impacto de la vacunación en los niños que ingresan al Centro Hospitalario Pereira Rossell. *RevMed Uruguay* 2001; 17 (3): 166-170.

Pérez M, Algorta G, Cedres M, Helena Sobrero, Adriana Varela, Giachetto G, Montano A. Impact of Universal Pneumococcal Vaccination on Hospitalizations for Pneumonia and Meningitis in Children in Montevideo, Uruguay. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. Volume 30, Number 8, August 2011: 669-74.

Pérez MC, Algorta G, Chamorro F, Romero C, Varela A, Cedres A, Giachetto G, Montano A. Changes in hospitalizations for pneumonia after universal vaccination with pneumococcal conjugate vaccines 7/13 valent and *H. influenzae* type b conjugate vaccine in a pediatric referral hospital in Uruguay. *The Pediatr Infect Dis J* 2014; 33 (7): 753-759.

Pneumonia: the forgotten killer of children, 2006. Geneva: UNICEF/WHO 2006. Available at: www.unicef.org.

Salv`a-Serra Francisco, Connolly Gwendolyn, Moore Edward R.B., Gonzales-Siles Lucia, Detection of “Xisco” gene for identification of *Streptococcus pneumoniae* isolates, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* (2017), doi:10.1016/j.diagmicrobio.2017.12.003

She, R. C., Simmon, K. E., & Petti, C. A. (n.d.). Identification of Bacteria by DNA Target Sequencing in a Clinical Microbiology Laboratory. *Molecular Microbiology*, 479–489. doi:10.1128/9781555816834.ch30

Slinger R, Duval M, Langill J, Bromwich M, MacCormick J, Chan F, Vaccani JP. Direct molecular detection of a broad range of bacterial and viral organisms and *Streptococcus pneumoniae* vaccine serotypes in children with otitis media with effusion. *BMC Res Notes* 2016; 29;9:247. doi: 10.1186/s13104-016-2040-4.

Wiese AD, Griffin MR, Zhu Y, Mitchel EF Jr, Grijalva CG Changes in empyema among U.S. children in the pneumococcal conjugate vaccine era. *Vaccine*. 2016;34(50):6243–6249. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.10.062. Epub 2016 Nov 7.

Wozniak, A., Cerda, A., Ibarra-Henríquez, C. et al. A simple RNA preparation method for SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR. *Sci Rep* 10, 16608 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73616-w>

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)