

Tipificación capsular de *Streptococcus pneumoniae* por secuenciación del gen *cpsB* directamente de líquido pleural.

Cecilia D'Albora 1; Claudia Gutiérrez 1; Analía Rial 2; Gabriela Algorta 1; Laura Betancor 1-2; María Inés Mota 1.

(1) Universidad de la República, Unidad Académica Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina, Dr. Alfredo Navarro 3051. Instituto de Higiene, Montevideo, Uruguay.
(2) Universidad de la República, Unidad Académica Desarrollo Biotecnológico, Facultad de Medicina, Dr. Alfredo Navarro 3051. Instituto de Higiene, Montevideo, Uruguay.

INTRODUCCIÓN

El empiema pleural es una complicación grave que se presenta en 10-15% de los niños hospitalizados por neumonía aguda comunitaria. *Streptococcus pneumoniae* es el agente etiológico más frecuente. El cultivo logra recuperar el agente en menos del 40% de los casos, impidiendo la serotipificación por método de Quellung (gold standard). Los métodos moleculares aplicados directamente sobre las muestras clínicas prometen ser una herramienta importante para evitar este problema.

OBJETIVO

Identificar los serotipos de *S. pneumoniae* en muestras de líquido pleural con detección de este agente, mediante PCR y secuenciación de una región del gen *cpsB*.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Población de estudio:** 99 muestras de líquido pleural de niños con diagnóstico de empiema pleural hospitalizados entre 2015 y 2021 en un hospital pediátrico de referencia de Uruguay en las cuales *S. pneumoniae* fue identificado mediante cultivo y/o técnicas moleculares.
- Tipificación capsular:**
Técnica de Quellung: 17 muestras.
PCR y secuenciación de una región del gen *cpsB* (1017 pb) a partir de ADN total extraído de todas las muestras de líquido pleural (kit Blood & Tissue, Qiagen®) con posterior alineamiento de secuencias en GenBank para identificación de serotipo según González Siles.
- Análisis filogenético:** edición y alineamiento con secuencias de referencia (Leung et. al. 2012) utilizando el paquete SeqMan v.7.0.0, análisis filogenético con Seaview 5 (modelo Neighbour Joining de parámetros como modelo de sustitución nucleotídica, con valores de bootstrap determinados cada 1000 réplicas) y edición final con Figtree v1.4.4.

RESULTADOS

Tipificación capsular

Mediante técnica de Quellung se identificó el serotipo en 17 muestras de líquido pleural (tabla 1), por secuenciación del gen *cpsB* se identificó en 56 muestras (gráfico 1) ($p < 0,001$).

Análisis filogenético

El análisis filogenético (figura 1) realizado en base a las secuencias nucleotídicas de *cpsB* utilizando secuencias de referencia para cada serotipo confirmó la predicción realizada a partir de homología de secuencias en GenBank incluyendo aquellos aislamientos con asignación "probable" de serotipo. Se evidenció cierta variabilidad nucleotídica dentro del serotipo 3.

Tabla 1. Tipificación capsular por secuenciación de región del gen *cpsB* versus tipificación por técnica de Quellung. N=17

ID muestra	Serotipo Quellung	Serotipo sec. <i>cpsB</i>
3	3	3
17	3	3
28	3	3
33	1	1
42	8	8
79	12F	12B/F
81	3	3
88	1	1
100	9N	9N/9L
134	3	3
136	3	3
144	19A	19A
166	3	3
167	3	3
169	3	3
174	3	N/A
176	3	N/A

N/A: No Aplica. Muestras pendientes de secuenciación.

Figura 1. Árbol filogenético obtenido del análisis de las secuencias de gen *cpsB*.

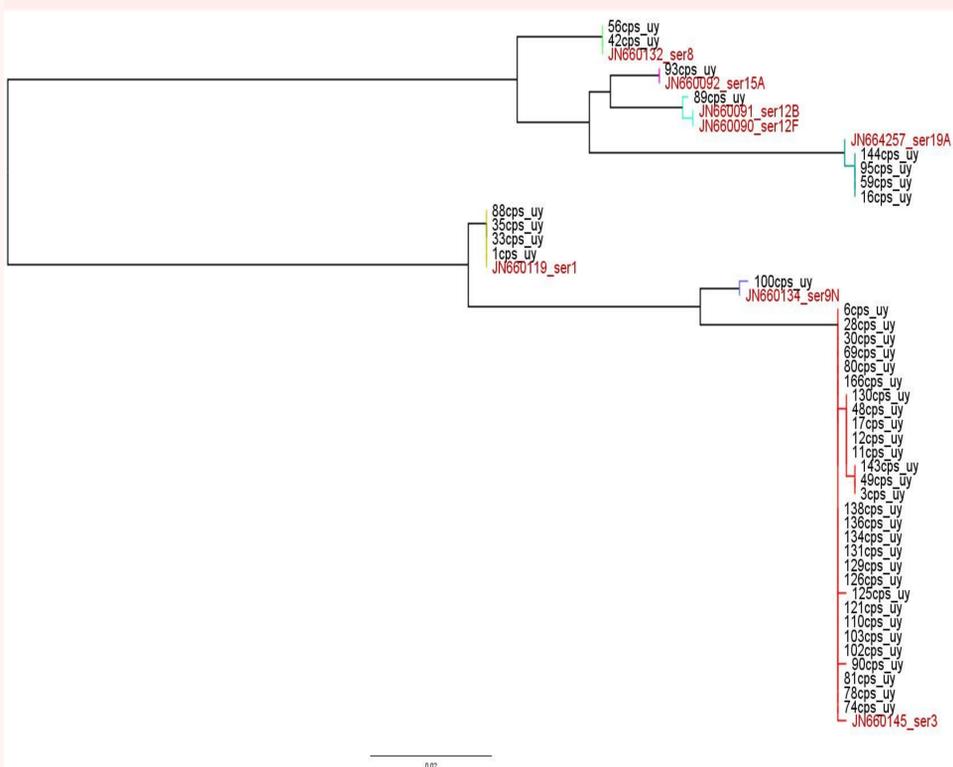
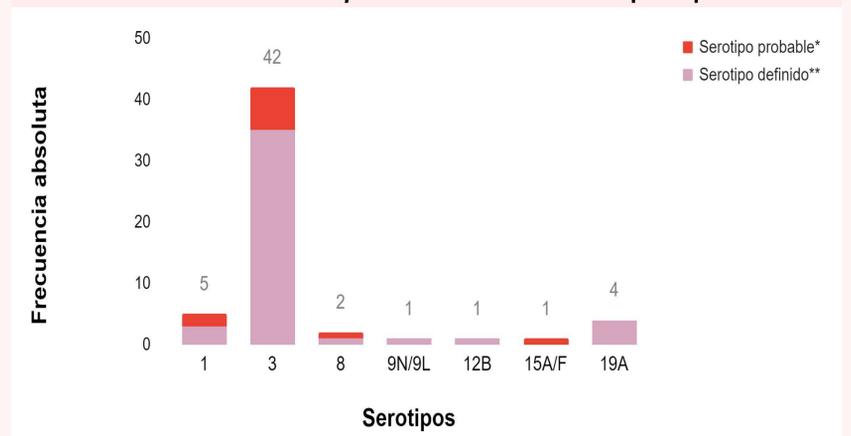


Gráfico 1. Distribución de serotipos de *S. pneumoniae* identificados mediante secuenciación de *cpsB* en 56 muestras de líquido pleural.



*Serotipo probable: porcentaje de identidad menor al 98% y mayor al 90%
**Serotipo definido: porcentaje de identidad mayor al 98%.

CONCLUSIONES

La aplicación de técnicas moleculares permitió aumentar significativamente la tipificación capsular de *S. pneumoniae* en muestras clínicas. Conocer los serotipos presentes en este tipo de complicaciones aporta datos para la optimización de medidas de prevención y tratamiento.

El análisis filogenético resultó útil para confirmar la identificación de serotipo por alineamiento de secuencias en GenBank y se observó variabilidad dentro del serotipo 3.

BIBLIOGRAFÍA