



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

DETERMINACIÓN DE SEROTIPOS DE *Streptococcus pneumoniae* EN NIÑOS  
PORTADORES SANOS MENORES DE 2 AÑOS DE EDAD POST  
INTRODUCCIÓN DE LA VACUNA PCV13 ANTINEUMOCÓCICA EN CINCO  
HOSPITALES DE LIMA-PERÚ

**Línea de investigación:**

**Biología celular y molecular**

Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología

**Autor:**

Gonzales Jaimes, Brayan Enrique

**Asesor:**

Salas Asencios, Ramsés  
(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

**Jurado:**

López Bulnes, Jorge Luis  
Sáez Flores, Gloria Maria  
Bohórquez Meza, Isabel Doris

**Lima - Perú**

**2022**

**Referencia:**

Gonzales, B. (2022). *Determinación de serotipos de Streptococcus pneumoniae en niños portadores sanos menores de 2 años de edad post introducción de la vacuna PCV13 antineumocócica en cinco hospitales de Lima-Perú*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/6000>



**Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)**

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

DETERMINACIÓN DE SEROTIPOS DE *Streptococcus pneumoniae* EN NIÑOS  
PORTADORES SANOS MENORES DE 2 AÑOS DE EDAD POST INTRODUCCIÓN DE  
LA VACUNA PCV13 ANTINEUMOCÓCICA EN CINCO HOSPITALES DE LIMA-  
PERÚ

Línea de investigación:

Biología Celular y Molecular

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

**Autor:**

Gonzales Jaimes, Brayan Enrique

**Asesor:**

Salas Asencios, Ramsés

(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

**Jurado:**

López Bulnes, Jorge Luis

Sáez Flores, Gloria Maria

Bohórquez Meza, Isabel Doris

**Lima, Perú**

**2022**

## **Dedicatoria**

A mi familia, en especial a mis padres Nancy y Jorge, quienes me apoyaron a lo largo de toda mi vida. Gracias a su enorme esfuerzo pude concluir mis estudios y este trabajo refleja el enorme agradecimiento y cariño que les tengo.

A mis abuelos Vicenta y Arturo que han estado conmigo y han creído en mi desde siempre. Y, a mi abuelita Cristina que le hubiera encantado poder ver este logro.

### **Agradecimientos**

A los miembros del Laboratorio de Infectología Pediátrica y a su investigadora principal, la Dra. Theresa Ochoa, por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones. Del mismo modo, agradezco a mis profesores Erik Mercado y David Durand, por sus enseñanzas y su amistad. A María Pinedo y Madheli Marcelo por su sustancial contribución en este trabajo.

Finalmente, un agradecimiento especial al Grupo peruano en Investigación en Neumococo (GPIN) por permitirme utilizar sus muestras y datos para la realización de esta tesis.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	7
ABSTRACT.....	8
I. INTRODUCCIÓN .....	9
1.1 Descripción y formulación del problema .....	9
1.2 Antecedentes.....	10
1.3 Objetivos.....	13
1.3.1 Objetivo General.....	13
1.3.2 Objetivos Específicos .....	13
1.4 Justificación .....	13
1.5 Hipótesis .....	14
II. MARCO TEÓRICO.....	15
2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación .....	15
2.1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	15
2.1.2 Epidemiología de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	16
2.1.3 Vacunas antineumocócicas conjugadas (PCVs).....	19
2.1.4 Serotipos de <i>S. pneumoniae</i> .....	20
2.1.5 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	22
III. MÉTODO.....	24
3.1 Tipo de investigación.....	24
3.2 Ámbito temporal y espacial .....	24
3.3 Variables .....	25

3.3.1	Variable independiente .....	25
3.3.2	Variable dependiente .....	25
3.4	Población y muestra.....	25
3.4.1	Población .....	25
3.4.2	Muestra .....	26
3.4.3	Aislamientos .....	26
3.4.4	Cepa control positivo.....	26
3.4.5	Cepa control negativo .....	26
3.5	Instrumentos .....	27
3.6	Procedimiento.....	27
3.6.1	Toma de muestra nasofaríngea .....	27
3.6.2	Identificación de <i>S. pneumoniae</i> .....	27
3.6.3	Extracción de ADN .....	28
3.6.4	Serotipificación Molecular .....	28
3.7	Análisis de datos .....	38
3.7.1	Cálculo de tamaño de muestra.....	38
3.7.2	Análisis descriptivo .....	38
3.8	Consideraciones éticas.....	39
IV.	RESULTADOS.....	41
4.1	Portación de <i>S. pneumoniae</i> .....	41
4.2	Características demográficas de niños portadores de <i>S. pneumoniae</i> .....	41
4.3	Serotipificación molecular .....	43

4.4	Distribución de Serotipos por hospitales .....	44
4.5	Distribución de Serotipos por grupo etario .....	46
4.6	Distribución de Serotipos vacunales, no vacunales y emergentes .....	48
V.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	50
VI.	CONCLUSIONES .....	55
VII.	RECOMENDACIONES .....	56
VIII.	REFERENCIAS .....	57
IX.	ANEXOS .....	74

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivos determinar la frecuencia de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en niños portadores sanos menores de 2 años de edad post introducción de la vacuna PCV13 conjugada antineumocócica en cinco hospitales de Lima-Perú, mediante la técnica de PCR multiplex secuencial, así como determinar la frecuencia serotipos vacunales y no vacunales y comparar las frecuencias con el estudio pre-vacunal. La frecuencia de portación de neumococo fue de 20.8%. Los serotipos/serogrupos 15B/15C y 6(6A/6B/6C/6D) fueron los más frecuentes y se encontraron en todos los hospitales y grupos etarios. Un posible impacto positivo de las vacunas antineumocócicas se hace evidente en la disminución de la frecuencia del serotipo 19F con respecto al estudio pre-vacunal, sin embargo, serotipos emergentes están tomando el lugar de los serotipos vacunales lo cual es preocupante ya que algunos de esos serotipos están relacionados con cuadros clínicos de gravedad y alta resistencia a antibióticos. De los serotipos determinados por el estudio, solamente el 20,7% fueron serotipos incluidos en la vacuna PCV13. La evidencia obtenida en esta investigación aporta información sobre la distribución de los serotipos que colonizan a niños menores de dos años que acuden a los principales centros de salud de la capital, y permitirá el planteamiento de nuevos estudios de vigilancia, importantes para la disminución de la colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* así como la incidencia de casos de ENI.

*Palabras claves:* portadores sanos, *Streptococcus pneumoniae*, vacuna antineumocócica, serotipo.

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the frequency of *Streptococcus pneumoniae* serotypes in healthy carrier children less than 2 years after the introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) in five hospitals in Lima-Peru, using sequential multiplex PCR technique and to determine the frequency of vaccine and non-vaccine serotypes, and compare the frequencies with the pre-vaccine study. The frequency of pneumococcus carriage was 20.8%. Serotypes/serogroups 15B/15C and 6(6A/6B/6C/6D) were the most frequent and were found in all hospitals and age groups. A possible positive impact of pneumococcal vaccines is evident in the frequency decrease of serotype 19F with respect to the pre-vaccine study, however, emerging serotypes are taking the place of vaccine serotypes, which is worrying since some of these serotypes are related to serious clinical conditions and high resistance to antibiotics. Total of serotypes determined by the study; only 20,7% were serotypes included in the PCV13 vaccine. The evidence obtained in this research provides information about of the distribution of the serotypes that colonize children under two years of age who attend the main health centers of the capital, and will allow the approach of new surveillance studies, important for the reduction of the nasopharyngeal carriage by *S. pneumoniae* as well as the incidence of IPD cases.

*Keywords:* healthy carriers, *Streptococcus pneumoniae*, pneumococcal vaccine, serotype.

## I. INTRODUCCIÓN

*Streptococcus pneumoniae* es la principal bacteria causante de neumonías en niños pequeños y común causante de otras infecciones graves como sepsis, meningitis e inflamación del oído (O'Brien et al., 2009; Wahl et al., 2018). Solamente en el año 2015, casi 300 000 niños menores de 5 años perdieron la vida por enfermedad neumocócica invasiva (ENI) en todo el mundo (Dadonaite y Roser, 2018). Es importante considerar que la portación asintomática previa de este patógeno precede a las infecciones neumocócicas, principalmente en el grupo de niños menores de 5 años (Bogaert et al., 2004)

La frecuencia de esta colonizado por neumococo de un niño menor de 5 años que vive en países de bajos ingresos va de 20% a 93%, pero esta frecuencia puede incrementarse aún más en los países catalogados como de bajos o medianos ingresos (Adegbola et al., 2014). Además, la subsiguiente incidencia de enfermedad neumocócica invasiva varía de diversos factores como la vacunación, edad (principalmente en niños pequeños), localización geográfica y la prevalencia particular de serotipos para la región (Dion et al., 2021). Sin embargo, los serotipos que comúnmente aislados que producen ENI, también se aíslan con frecuencia en niños sanos colonizados (Apte et al., 2021).

### 1.1 Descripción y formulación del problema

*Streptococcus pneumoniae* (neumococo) es un agente causal de diversas enfermedades graves como neumonía, meningitis (enfermedades neumocócicas invasivas, ENI). También es responsable de causar otitis media, sinusitis y neumonía no bacterémica (Enfermedades neumocócicas no invasivas). Se transmite por estornudos, tos y contacto directo entre personas (GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators, 2018).

En el Perú, la neumonía es una de las principales causas de muerte en niños: de 1996 al 2000, la neumonía era responsable del 20% de muertes en niños y el 30% al 50% de la

neumonía era causada por neumococo. En el 2004, las ENI cobraron la vida de 1 612 000 niños, de los cuales 716 000 eran menores de cinco años y 896 000 eran mayores a cinco; superando por mucho a las muertes producidas por rotavirus, fiebre amarilla, hepatitis B, tos ferina, etc. De esta manera, cinco a ocho niños menores de cinco años fallecen por neumonía producida por neumococo, en el Perú cada día (Padilla et al., 2010). En el 2014, la tasa de mortalidad por neumonía fue de 910 mil niños menores de cinco años (Padilla et al., 2017).

La colonización nasofaríngea ocurre comúnmente en los primeros dos años de vida y su prevalencia varía entre 30 - 60%, sin embargo, en países de bajos recursos puede ser tan alta como 76% (Adegbola et al., 2014b; Kaur et al., 2016). Asimismo, es el primer paso en la patogénesis de la enfermedad por neumococo es la portación nasofaríngea y esta conduce a infección no invasiva o invasiva, juega un rol importante en la transmisión horizontal en la población y es esencial. En el desarrollo de resistencia antibiótica, debido a que provee un ambiente para la recombinación genética e intercambio de material genético entre neumococo y otros estreptococos comensales (Bogaert et al., 2004; Cornick y Bentley, 2012).

## 1.2 Antecedentes

*Streptococcus pneumoniae* es una de las mayores causantes de morbilidad y mortalidad, especialmente en niños pequeños. Se estima que neumococo es responsable del 11,0% de las muertes relacionadas a infecciones en niños menores de cinco años (Elliott y Beeson, 2008), y de causar aproximadamente 800 000 muertes anuales en este grupo etario (O'Brien et al., 2009).

La presión que ejercen las vacunas neumocócicas conjugadas (PCVs) sobre las poblaciones circulantes de serotipos en ciertas zonas geográficas ha cambiado, dando lugar a la emergencia de serotipos no encapsulados. Estos serotipos se han reportado por lo general en portadores sanos, sin embargo, presentan mayor capacidad de formación de *biofilm* que las

cepas invasivas, lo que representa una preocupación ya que, para el desarrollo de ENI, el primer paso es la portación y al ser estos serotipos los emergentes y con una alta capacidad de formación de *biofilm* constituye un grave peligro en los años siguiente (Takeuchi et al., 2019).

Existen 94 serotipos de neumococo, y su frecuencia y rol en la colonización nasofaríngea y enfermedad invasiva difiere por edad, región geográfica y condiciones socioeconómicas. La introducción de las PCVs resulta en disminución de la enfermedad, de la portación nasofaríngea de serotipos vacunales y aumento de serotipos no vacunales, fenómeno conocido como reemplazo de serotipo (Weinberger et al., 2011).

El reemplazo de serotipos ha conducido al reconocimiento de serotipos no vacunales con importancia clínica (por ejemplo, el serotipo 19A luego de la introducción de la vacuna 7-valente) y puede tener un rol en el cambio de los patrones de susceptibilidad antibiótica en las cepas colonizantes, dado que algunos serotipos se caracterizan particularmente por su resistencia antibiótica (Dagan y Klugman, 2008).

Sobre la base de las observaciones epidemiológicas, se desarrolló la vacuna 13-valente (PCV13) que incluye seis serotipos adicionales (1, 3, 5, 6A, 7F y 19A) y en forma similar es factible que estemos frente a una nueva presión selectiva sobre el reemplazo de serotipos, con una disminución adicional de serotipos cubiertos por PCV13, como ya se viene evidenciando en estudios hechos en países luego de la introducción de esta vacuna (Zuccotti et al., 2014; Lee et al., 2014; Kaur et al., 2016; Valente et al., 2016; Nakano et al., 2016).

La vacuna PCV7 fue incorporada al calendario de vacunación del Perú en el año 2009, la vacuna PCV10 en el 2011 y la vacuna PCV13 en julio del 2015. A la fecha solo se ha publicado un estudio sobre portadores nasofaríngeos luego de la introducción de la vacuna PCV7, realizado en una comunidad andina entre 2009 y 2011, con 60,0% de cobertura de al menos dos dosis para PCV7 para el año 2011 en los 125 niños estudiados, encontrándose una

reducción de 48,0% a 28,8% de serotipos vacunales para PCV7, y un incremento correspondiente de 52,0% a 71,2% de serotipos no vacunales, no se reportaron cifras sobre la prevalencia de estado de portador (Hanke et al., 2016).

Las vacunas conjugadas pueden reducir la resistencia de neumococo en poblaciones vacunadas y no vacunadas mediante la reducción de portadores de serotipos resistentes, lo cual protege a la población vacunada y previene la transmisión de la enfermedad, y consecuentemente mediante el menor uso de antibióticos. Estudios han demostrado que la vacunación con PCV7 resultó en una disminución de la portación nasofaríngea de neumococo resistente a penicilina, sin embargo, se observó que dos años después de la reducción inicial de cepas resistentes, se incrementaron las cepas de resistencia intermedia, principalmente debido a la presencia del serotipo 19A (Dagan y Klugman, 2008), que posteriormente fue cubierto con PCV13.

La resistencia antibiótica de neumococo es un problema de preocupación mundial y puede conducir a fallas de tratamiento con incremento en la morbilidad y mortalidad, costos aumentados y uso de antimicrobianos de mayor toxicidad (Hauser et al., 2016). El patrón de resistencia de neumococo evoluciona con el tiempo y depende de varios factores como uso indiscriminado de antibióticos (presión antibiótica), uso de las vacunas conjugadas, reemplazo de serotipos, recombinación genética e intercambio genético (Cornick y Bentley, 2012).

En la actualidad no se conocen los posibles cambios en la frecuencia y distribución de serotipos de neumococo en niños portadores inmunizados con la vacuna antineumocócica conjugada (PCV13) a nivel local, regional o nacional en el Perú.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Objetivo General

- Determinar la frecuencia de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en niños portadores sanos menores de 2 años de edad post introducción de la vacuna PCV13 antineumocócica en cinco Hospitales de Lima-Perú.

### 1.3.2 Objetivos Específicos

- Determinar el porcentaje total de portación nasofaríngea de *Streptococcus pneumoniae* post introducción de la PCV13 en Lima-Perú.
- Determinar la frecuencia de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en cada sede del estudio y en cada grupo etario mediante la metodología de PCR multiplex secuencial.
- Comparar la distribución de serotipos vacunales y no vacunales con respecto al estudio previo y determinar los serotipos emergentes.

## 1.4 Justificación

En nuestro país, antes de la introducción de la vacuna heptavalente se encontró una prevalencia promedio de 27% de portadores nasofaríngeos en niños menores de dos años en un estudio realizado en siete regiones del Perú, entre 2007 y 2009, con una distribución de serotipos vacunales de 50%, 50,2% y 57,2% para las vacunas 7, 10 y 13-valente (PCV7, PCV10 y PCV13) respectivamente (Mercado et al., 2012).

Los datos obtenidos en el presente estudio serán importantes para evaluar la distribución de serotipos de *S. pneumoniae*, el posible cambio en las proporciones de los serotipos vacunales y no vacunales, identificar y determinar la frecuencia de serotipos clínicamente relevantes luego de la incorporación de la vacuna antineumocócica conjugada y

la implementación de la metodología de PCR multiplex secuencial para la determinación de los principales serotipos de *S. pneumoniae*.

### 1.5 Hipótesis

- H1: Existen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en niños portadores sanos menores de 2 años de edad post introducción de la vacuna PCV13 antineumocócica en cinco Hospitales de Lima-Perú.
- H0: No existen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en niños portadores sanos menores de 2 años de edad post introducción de la vacuna PCV13 antineumocócica en cinco Hospitales de Lima-Perú.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación

#### 2.1.1 *Streptococcus pneumoniae*

Conocida como neumococo, es una bacteria encapsulada Gram positiva que usualmente se disponen en diplococos o en cadenas cortas. Los neumococos son anaerobios facultativos,  $\alpha$  – hemolíticos, catalasa y oxidasa negativos, inmóviles, no formadores de esporas. Nutricionalmente, son exigentes, ya que requieren de sangre, la cual representa una fuente de catalasa para poder neutralizar el  $H_2O_2$  producido por la misma bacteria para su crecimiento. Crecen a  $37^\circ C$  de temperatura y 5% de  $CO_2$ , y suelen sufrir lisis en la fase estacionaria de crecimiento (Brooks et al., 2007).

Crece en medios enriquecidos como agar soya tripticasa o agar infusión cerebro/corazón con adición de 10% de sangre de cordero ya sea entera (agar sangre) o calentada (agar chocolate). Por lo general, se presenta formando colonias redondas, mucosas y no pigmentadas, de 1–3 mm de diámetro, las cuales al cabo de 48 horas manifiestan un aspecto umbilicado, con una depresión central producida por una autólisis celular progresiva. La  $\alpha$  – hemólisis se evidencia a través de un halo verdoso alrededor de las colonias (Preado, 2001).

Se identifica presuntivamente por su sensibilidad a la optoquina. Presenta un halo de al menos 14 mm, con un disco de 5  $\mu g$  de optoquina y 6 mm de diámetro (o de al menos 16 mm de inhibición si el diámetro del disco es de 10 mm). Cuando con la optoquina se tiene un halo de inhibición dudoso o menor al referido y se sigue sospechando que se trate del neumococo, se emplea la prueba de solubilidad en bilis (Montes y María García-Arenzana, 2007). Si la cepa sospechosa se solubiliza en presencia de sales biliares a una concentración de 10%, esta cepa se define como *S. pneumoniae* (Preado, 2001).

Además, el neumococo presenta factores de virulencia que median la adherencia, la invasión y/o antagonizan el sistema inmunitario del huésped. En *S. pneumoniae* se han identificado las enzimas neumocócicas  $\beta$ -galactosidasa, neuraminidasa A y  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa, las cuales degradan el moco e inhiben la eliminación mucociliar. Por otro lado, la autolisina *lytA* ayuda a la liberación de neumolisina, la cual daña el epitelio y reduce el latido ciliar. La cápsula y varias proteínas neumocócicas, incluidas *PspA*, proteína A de unión a colina (*CbpA*), enolasa (*Eno*) y proteína de la tríada de histidina neumocócica (*Pht*), bloquean la deposición del complemento (Weiser et al., 2018; Feldman y Anderson, 2020).

La cápsula externa a la pared celular de naturaleza polisacárida compleja constituye una de las estructuras más importantes de esta bacteria, debido a que es la piedra angular de la patogénesis de las infecciones neumocócicas. Esta estructura inhibe la opsonofagocitosis y previene la acumulación de moco durante la colonización. Del mismo modo, la composición antigénica de la cápsula es variable entre las cepas y permite agrupar a los *S. pneumoniae* en serotipos capsulares y serogrupos (Lannes-Costa et al., 2021; Preado, 2001).

### **2.1.2 Epidemiología de *Streptococcus pneumoniae***

Las neumonías neumocócicas son la principal causa de muerte infantil a nivel global (GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators, 2018). Además, el neumococo es la causa más común de neumonía infantil, meningitis bacterianas (Carapetis et al., 2005; Dadonaite y Roser, 2018), y neumonía adquirida en la comunidad (Masomian et al., 2020). Se estimó que la neumonía neumocócica causó 1,5 millones de muertes en todo el mundo en 2015, incluidas alrededor de 400 000 muertes en niños menores de 5 años (GBD 2015 LRI Collaborators, 2017).

En 2017, la Organización Mundial de la Salud incluyó a *S. pneumoniae* como uno de los 12 patógenos prioritarios para el desarrollo de nuevos antibióticos; además, la alta carga

continua de morbilidad y las crecientes tasas de resistencia a la penicilina y otros antibióticos han renovado el interés por la prevención contra este patógeno (World Health Organization, 2017). La prominencia de *S. pneumoniae* se debe a la combinación de altas tasas de portación, su adaptabilidad genética y su capacidad para cambiar de comensal a interacción patógena con su huésped (Weiser et al., 2018).

Neumococo es un colonizador habitual de las vías respiratorias superiores y, además de neumonía, provoca frecuentes infecciones asociadas a las vías respiratorias, como otitis media, sinusitis y bronquitis (Bogaert, et al., 2004; Brook y Gober, 2009; Shak et al., 2013). La transmisión de neumococos entre individuos ocurre a través del contacto cercano y los aerosoles, y la colonización se considera un requisito previo para la enfermedad, aunque muchas personas colonizadas no experimentan síntomas. En este proceso, la capacidad de *S. pneumoniae* de adherirse a las células epiteliales de la mucosa nasofaríngea representa un paso importante (Marquart, 2021).

En la población infantil, los aislamientos neumocócicos que se encuentran colonizando la nasofaringe constituyen el reservorio ecológico principal a partir del cual surgen y se diseminan las resistencias del microorganismo y reflejan los aislados circulantes en la comunidad (De Lencastre y Tomasz, 2002). La edad, vivir en condiciones de hacinamiento, asistencia a guardería y la existencia de procesos infecciosos de vías respiratorias altas son determinantes generalmente asociados a un mayor riesgo de colonización neumocócica, aunque no son considerados hallazgos universales, ya que varían por la ubicación geográfica (Marchisio et al., 2002; Regev-Yochay et al., 2004; Quintero et al., 2011; Adegbola et al., 2014b; Hosseini et al., 2015; Padilla et al., 2017; Ceyhan et al., 2021).

En nuestro país, neumococo es uno de los patógenos más importantes asociados con neumonía y meningococemia en niños (Ochoa et al., 2010). La prevalencia de este patógeno

varía según la población evaluada y las características del paciente. En 2006, *S. pneumoniae* se aisló en 18,6% de los aislamientos obtenidos de 193 niños atendidos en consulta externa o emergencia de establecimientos de Salud de Puno y Lima. Además, se identificó en 90,0% de los aislamientos provenientes de pacientes con neumonía adquirida en la comunidad (Padilla et al., 2010).

En una investigación realizada entre 2007 y 2009, con el objetivo de determinar el patrón de susceptibilidad antibiótica de cepas de neumococo aisladas de portadores nasofaríngeos sanos menores de 2 años de siete regiones del Perú, se observó que la frecuencia de este patógeno fue de 26,9% (572/2123) (Torres et al., 2013). Asimismo, entre 2009 y 2011 se realizaron evaluaciones transversales secuenciales de un estudio de cohorte prospectiva de niños de comunidades rurales del distrito de San Marcos (Cajamarca). Se obtuvieron 3 579 muestras nasofaríngeas de 833 niños y *S. pneumoniae* se detectó en el 68,9% de las muestras nasofaríngeas y en el 78,9% de muestras de niños que presentaron infecciones respiratorias agudas (Fan et al., 2016).

Por otro lado, en estudio de vigilancia de dos años de duración, realizado entre 2006 y 2008 en 11 hospitales públicos y cinco laboratorios privados en Lima en pacientes menores de 16 años, 101 cultivos de sitios estériles arrojaron *S. pneumoniae*, representando un episodio de una enfermedad neumocócica invasiva, de los cuales el 68,3% correspondieron a niños menores de 24 meses (Ochoa et al., 2010). En otra investigación de serie de casos de meningitis neumocócica en niños menores de 16 años, se reportaron 44 episodios de meningitis neumocócica, de las cuales 68,2% se presentaron en niños menores de 2 años. Además, la tasa de letalidad fue 32,6; y 92,9% de los casos letales ocurrieron en niños menores de dos años ( $p < 0,05$ ) (Davalos et al., 2016).

### 2.1.3 Vacunas antineumocócicas conjugadas (PCVs)

Desde 2006, la OMS ha recomendado que todos los países introduzcan la vacuna antineumocócica conjugada (PCV) en sus programas nacionales de inmunización para contribuir a la reducción de casos de enfermedad neumocócica invasiva (ENI), otitis media y neumonías. (World Health Organization, 2019). La primera PCV disponible para América Latina y el Caribe fue *Prevenar-7*® (Wyeth/Pfizer, EEUU), vacuna heptavalente (PCV7) que conjugaba polisacáridos de los antígenos capsulares de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F de *S. pneumoniae* con la proteína diftérica CRM<sub>197</sub> (Gómez et al., 2016).

Sin embargo, tras la introducción de la PCV7 en América Latina, no se obtuvieron los resultados esperados, principalmente debido a la baja cobertura alcanzada y por la limitada cantidad de serotipos que cubría, ya que en su diseño solo se consideró los serotipos prevalentes en los Estados Unidos (EE.UU), los cuales son distintos de los prevalentes en los países de América Latina (Talbird et al., 2010). En EE.UU, se observó una disminución en las muertes relacionadas con enfermedades neumocócicas invasivas después de la introducción de PCV7 (Wasserman et al., 2021).

Años más tarde, GlaxoSmithKline (GSK, Bélgica) puso a disposición del mercado la vacuna decavalente *Synflorix*®, que conjuga polisacáridos de los antígenos capsulares de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F de *S. pneumoniae* con la proteína D del *Haemophilus influenzae* no tipificable (HiNT), del serotipo 18C conjugado con el toxoide tetánico y del serotipo 19C conjugado con el toxoide diftérico, lo que le confiere a la vacuna la posibilidad de brindar protección adicional contra el HiNT (Prymula y Schuerman, 2009).

Por su parte, Pfizer introdujo *Prevenar-13*®. Esta vacuna 13-valente utiliza polisacáridos de los antígenos capsulares de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *S. pneumoniae* conjugados individualmente a la proteína diftérica CRM<sub>197</sub>

(Duggan, 2010). En EE.UU, los casos de ENI disminuyeron un 91,0%, de 15 707 en 1997 a 1382 en 2019. Las consultas anuales promedio por otitis media disminuyeron un 41,0%. de 78 visitas/100 niños antes de la introducción de PCV a 46 visitas/100 niños después de la introducción de PCV13 (Wasserman et al., 2021).

Desde 2012, la Alianza Global para Vacunas e Inmunización y otros canales de asistencia para el Desarrollo han trabajado para lograr una mejor cobertura de inmunización, y entre 2010 y 2016, se estima que la cobertura de PCV entre los niños ha aumentado en más de un 50,0% (Ikilezi et al., 2020). En nuestro país, la PCV7 se introdujo en 2008. Posteriormente, en 2011 se introdujo la PCV10 y desde el 2016 está en uso la vacuna PCV13 (Padilla et al., 2017). La disminución de casos de ENI es un indicador del impacto de las PCVs, sin embargo, la vigilancia de estos es difícil, especialmente en los países de bajos ingresos, como Perú (Weinberger et al., 2013).

Estudios previos informaron que los cambios en la portación nasofaríngea de *S. pneumoniae* tipo vacuna (VT) pueden ser utilizado como sustituto para monitorear los cambios en la incidencia de ENI entre niños menores de cinco años. Aunque la correlación no es del todo precisa, los estudios de portadores de neumococo han demostrado ser una buena estimación de la carga de la enfermedad (Weinberger et al., 2013). Por lo tanto, el seguimiento de los niños portadores sigue siendo importante para evaluar más a fondo el impacto de la implementación de las PCVs.

#### **2.1.4 Serotipos de *S. pneumoniae***

Existen al menos 98 serotipos de neumococo circulando en todo el mundo, categorizados según los componentes de glucano y los enlaces que constituyen el polisacárido capsular de cada serotipo. La gran diversidad de serotipos en *S. pneumoniae* es debido a la presencia de esta capsula de polisacárido el cual se une covalentemente al peptidoglucano y al

polisacárido de la pared celular bacteriana. Esta característica le permite a los serotipos neumocócicos ser inmunológicamente distintos entre ellos (Brooks et al., 2007). Sin embargo, los 10 serotipos más comunes causan el 62% de las enfermedades invasivas en todo el mundo (Masomian et al., 2020). La vigilancia del serotipo de *S. pneumoniae* es importante en las estrategias de enfermedad, transporte y vacunación. Cada serotipo difiere en su potencial causante de enfermedad, grupo de edad infectado y distribución geográfica (Varghese et al., 2017).

La introducción de las PCVs ha reducido drásticamente y mantiene tasas más bajas de serotipos vacunales (VT) de enfermedad neumocócica invasiva (GBD 2015 LRI Collaborators, 2017). Asimismo, los aislamientos de VT se volvieron poco frecuentes en muestras nasofaríngeas de niños vacunados (Kempf et al., 2015; Le Polain De Waroux et al., 2015). A pesar de esto, la vacunación también dio como resultado el fenómeno conocido como reemplazo de serotipos, provocando un aumento en la frecuencia de ENI, no ENI y portadores nasofaríngeos por serotipos no vacunales (NVT) (Weinberger et al., 2011; Feikin et al., 2013).

La vigilancia continua y la elección de serotipos para incluir en futuras vacunas sigue siendo clave para estrategias de prevención efectivas. La PCV13, que contiene 13 serotipos diferentes (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 19A, 19F, 18C y 23F), es la vacuna antineumocócica más utilizada en la actualidad.

Una revisión sistemática determinó que, tras su introducción, los serotipos distintos de PCV13 contribuyeron al 42,2 % de los casos de ENI infantil. Sin embargo, se observaron diferencias regionales (57,8% en América del Norte, 71,9% en Europa y 28,5% en América Latina). Por otro lado, los serotipos NVT predominantes en general fueron 22F, 12F, 33F, 24F, 15C, 15B, 23B, 10A y 38 (Balsells et al., 2017).

Los serotipos de neumococo se pueden identificar mediante Serología como la reacción de *Quellung* o hinchamiento capsular, la cual consiste en la precipitación entre el suero específico (anticuerpo) que reacciona con el polisacárido capsular (antígeno) haciéndola evidente al microscopio (OPS y INS, 2004). Otro método alternativo de identificación de serotipos de neumococo es mediante el uso de técnicas de Biología Molecular como la Reacción en cadena de la Polimerasa y *Whole Genome Sequencing* (WGS).

### **2.1.5 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)**

Una de las principales herramientas de diagnóstico utilizadas en la Biología Molecular es la Técnica de la Reacción en cadena de la Polimerasa (Rochelle et al., 1997). Está mundialmente difundida para el análisis de diversas enfermedades principalmente gracias a su versatilidad y adaptabilidad en las Ciencias de la Salud. La PCR permite la síntesis de Fragmentos específicos de ADN usando la enzima ADN-polimerasa, que participa en la replicación del material genético celular. Esta enzima sintetiza una secuencia complementaria de ADN como la ayuda de un pequeño fragmento (*primer* o cebador) que está conectado a una de las cadenas de ADN en el sitio específico elegido para el inicio síntesis. Los *primers* limitan la secuencia que se replicará y el resultado es la amplificación de una secuencia de ADN particular con miles de millones de copias (Murdoch, 1999).

Para el análisis de serotipificación molecular de neumococo se utiliza una PCR multiplex secuencial convencional para la identificación de serotipos más frecuentes en Latino América, dividido en ocho reacciones, el cual utiliza cinco pares de *primers* distintos por cada reacción con la finalidad de identificar el serotipo de interés y un par de *primers* adicional como control interno para *S. pneumoniae* [locus *cps* donde se ubican los genes responsables de la síntesis de la capsula de polisacárido (Mostowy et al., 2017; Muñoz et al., 1997)]. Este protocolo de PCR es un procedimiento estándar diseñado por Laboratorio de *Streptococcus* del

Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta en Estados Unidos, laboratorio de referencia mundial con respecto al estudio de *S. pneumoniae* y la enfermedad neumocócica invasiva (Center for Disease Control and Prevention of United States [CDC], 2014).

### III. MÉTODO

#### 3.1 Tipo de investigación

El presente estudio forma parte del estudio principal liderado por el Grupo Peruano de Investigación en Neumococo (GPIN), titulado: “Distribución de serotipos y sensibilidad antibiótica de neumococo en niños portadores nasofaríngeos luego de la introducción de la vacuna 13-valente en Lima, Perú” el cual fue un estudio transversal y multicéntrico, realizado entre 2016 y 2019, que incluyó a 1000 niños menores de dos años de edad que acudieron de forma ambulatoria a sus controles de crecimiento y desarrollo y/o vacunación a alguno de los centros de salud incluidos en el estudio (Hospital Nacional Cayetano Heredia, Instituto Nacional de Salud del Niño-Sede Breña, Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins, Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé y Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión). El estudio principal tuvo por objetivo determinar las frecuencias de los serotipos de neumococo en los aislamientos obtenidos de los menores participantes mediante *Whole Genome Sequencing* (WGS).

Este estudio de tesis cuenta con un diseño de corte transversal, multicéntrico descriptivo y utilizó los aislamientos colectados en el estudio principal previamente descrito.

#### 3.2 Ámbito temporal y espacial

El estudio se realizó en la provincia de Lima, perteneciente a la costa peruana, por el espacio de un año, en el cual se utilizaron las muestras de estudios previos los cuales analizaban muestras de hisopados nasofaríngeos de niños de dos meses a dos años de edad que acudían a sus controles de niño sano. Estos estudios incluyeron muestras provenientes de los hospitales: Hospital Nacional Cayetano Heredia, Instituto Nacional de Salud del Niño-Sede Breña, Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins, Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé y Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión entre los años 2016 a 2019.

### 3.3 Variables

#### 3.3.1 Variable independiente

- Portación de *Streptococcus pneumoniae*

#### 3.3.2 Variable dependiente

- Serotipo de *Streptococcus pneumoniae*

### 3.4 Población y muestra

#### 3.4.1 Población

El estudio principal liderado por el Grupo Peruano de Investigación en Neumococo (GPIN), enroló niños sanos entre dos meses y dos años de edad, atendidos en la consulta externa de pediatría, control del niño sano o consultorio de vacunación de los hospitales que participaron en el estudio principal.

El estudio principal seleccionó este grupo etario ya que la colonización ocurre principalmente en los primeros dos años de vida, describe la situación actual de los portadores que puede estar influenciado por efecto directo o indirecto de la PCV13 y es similar al estudio previo realizado por el grupo de investigación (Mercado et al., 2012).

Definición de niño sano: El estudio principal lo definió como niño que acudió a su control de crecimiento, desarrollo y/o colocación de vacunas en el hospital participante y cuyo padre o cuidador refirió que, al momento del enrolamiento, el niño no padecía de ninguna enfermedad importante. El niño podía tener una infección respiratoria leve (rinorrea, tos leve, estornudos, temperatura de 38 a 38.5°C) en cualquier estación del año.

### 3.4.2 Muestra

La muestra estuvo conformada por 1000 niños sanos atendidos en la consulta externa de pediatría, control del niño sano o consultorio de vacunación de los hospitales participantes del estudio. El muestreo se llevó a cabo por conveniencia en los hospitales participantes hasta alcanzar el tamaño muestral calculado (Anexo 5).

### 3.4.3 Aislamientos

Se emplearon aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* del estudio principal de niños portadores de neumococo colectadas e identificadas entre los años 2016 a 2019, las cuales fueron identificadas por pruebas microbiológicas y adicionalmente por parte del estudio principal, una confirmación mediante detección del gen *lytA* por PCR convencional (datos no publicados en este estudio). Estos aislamientos se encontraban criopreservados a -80°C en el laboratorio central del estudio, el Laboratorio de Infectología Pediátrica (LIP) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

### 3.4.4 Cepa control positivo

Se emplearon cepas *Streptococcus pneumoniae* aisladas y analizadas por el estudio prevacunal pertenecientes a los serotipos: 14, 6, 23F, 19A, 9V/9A, 19F, 3, 15B/15C, 18, 17F, 1, 5, 9L/9N, 7F/7A, 16F, 8, 2, 4, 20, 22F/22A, 7C/7B/40, 12F/12A/44/46, 11A/11D, 10A, 23A, 21, 33F/33A/37, 15A/15F, 35F/47F, 13, 39, 23B, 35A/35C/42, 38/25F, 35B, 24, 10F/10C/33C, 34 Y 31 (Mercado et al., 2012).

### 3.4.5 Cepa control negativo

Se empleó la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

### 3.5 Instrumentos

- Ficha de recolección de datos (Anexo 2)
- Ficha de laboratorio (Anexo 3)
- PCR convencional multiplex secuencial
- Electroforesis en gel de agarosa

### 3.6 Procedimiento

#### 3.6.1 Toma de muestra nasofaríngea

En el estudio principal de niños portadores de neumococo, se realizaron hisopados nasofaríngeos a los voluntarios que consintieron su participación. Personal calificado tomó la muestra nasofaríngea utilizando un hisopo de Rayon (Puritan®, sterile rayon tipped applicators). Se tomó una muestra por paciente, siguiendo la técnica recomendada por la OMS (Torres et al., 2013). La técnica consistía en: sostener al paciente fijando su cabeza con cuidado y extendiéndola ligeramente, luego se introducía el hisopo por la fosa nasal en forma gentil y paralela a la base de la cavidad nasal hasta llegar a la nasofaringe, donde se rotó 180° y se retiró lentamente.

Los hisopados nasofaríngeos fueron colocados en medio de transporte STGG (leche descremada, tripticasa de soya, glucosa, glicerol) bajo técnica estéril, y se transportaron en una caja con hielo al Laboratorio de Infectología Pediátrica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (laboratorio central), dentro de las ocho horas desde su recolección.

#### 3.6.2 Identificación de *S. pneumoniae*

En el laboratorio central, los hisopos fueron colocados en 3 mL de THY enriquecido (Todd-Hewitt Broth con 0.5 % de extracto de levadura) e incubados de cuatro a seis horas a 37°C con una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. El crecimiento bacteriano se cultivó en Agar sangre

(Agar Trypticase de Soya enriquecido con sangre de carnero 5%) a las mismas condiciones previamente descritas por 24 horas. Se determinó el aislamiento de *S. pneumoniae* basado en la morfología de la colonia, alfa hemólisis, coloración Gram, solubilidad en bilis y sensibilidad a la optoquina según las recomendaciones dadas por la OMS para estudios en portadores de neumococo (Satzke et al., 2013).

Los aislamientos identificados como *S. pneumoniae* fueron criopreservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su futura confirmación y serotipificación molecular.

### **3.6.3 Extracción de ADN**

Las muestras previamente identificadas y almacenadas en el criobanco del laboratorio del estudio, fueron reactivadas en placas de Agar sangre a las mismas condiciones previamente descritas. Se extrajo el ADN mediante el uso de la resina Chelex-100® 5% (Walsh et al., 2013). Esta técnica consistía en resuspender los aislamientos neumocócicos en microtubos que contenían 200 uL de solución de Chelex-100® (Bio-rad, California, Estados Unidos) al 5% suplementado con 2 uL de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubaron durante 60 minutos a  $56^{\circ}\text{C}$ , luego se homogeneizaron durante 10 segundos y se incubaron durante 15 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, se homogeneizó y centrifugó los microtubos a 13,000 rpm durante 5 minutos y los almacenamos a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis molecular.

### **3.6.4 Serotipificación Molecular**

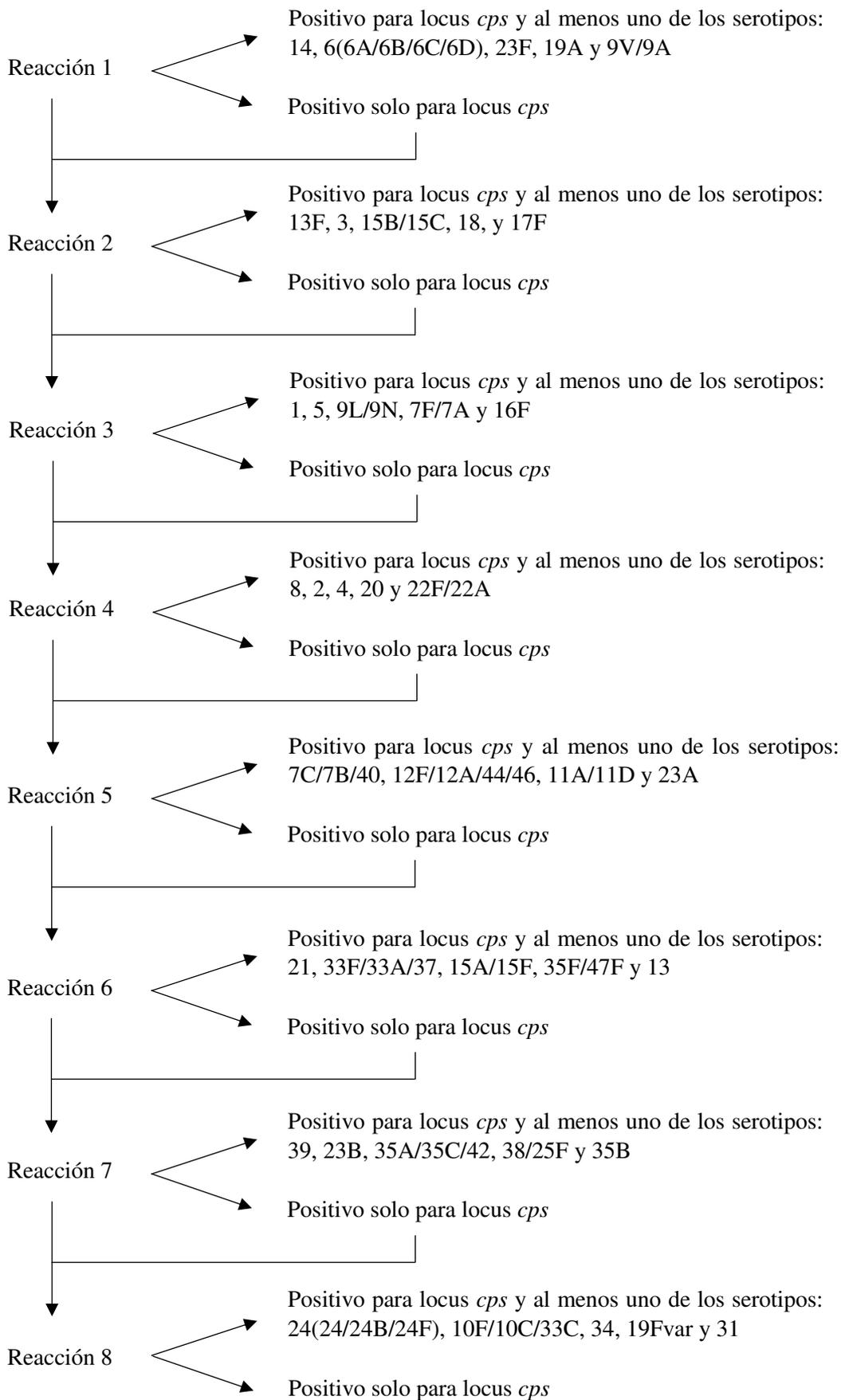
La serotipificación de los aislamientos neumocócicos se realizaron a través de un protocolo de PCR multiplex secuencial convencional diseñado por el laboratorio de referencia en el estudio de *S. pneumoniae* y la enfermedad neumocócica invasiva (el Laboratorio de Neumococo del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta en Estados Unidos) para la identificación de serotipos más frecuentes en Latino América (da Gloria

Carvalho et al., 2010) [Center for Disease Control and Prevention of United States (CDC), 2014] (Anexo 6), y estandarizado en el laboratorio central durante estudios previos.

El protocolo consistió en ocho reacciones sucesivas de PCR multiplex convencional (cinco serotipos/serogrupos por reacción) para la detección de los 40 serotipos/serogrupos de *S. pneumoniae* (Figura 1). La preparación de los productos se llevó a cabo utilizando una placa de 96 pocillos, designados para 5 controles positivos más 91 muestras. Posteriormente, los productos de PCR se llevaron a una corrida electroforética en un gel de Agarosa al 2% (de 51 pocillos) a 100 voltios por 90 minutos y se procedió al revelado del gel en un fotodocumentador Biorad®.

**Figura 1**

*Flujograma de las reacciones sucesivas de PCR multiplex para la serotipificación de neumococo*



**Tabla 1**

*Receta Master Mix (Rx1 – Rx4) por reacción para la determinación de serotipos de S. pneumoniae por PCR multiplex secuencial*

PCR	Rx-1		Rx-2		Rx-3		Rx-4	
#Rxns	1		1		1		1	
PCR H <sub>2</sub> O	11		11,1		10,5		11,9	
Buffer	5,0		5,0		5,0		5,0	
MgCl <sub>2</sub>	2,0		2,0		2,0		2,0	
dNTPs(10Mm)	0,5		0,5		0,5		0,5	
Primers(25uM)	0,2		0,2		0,2		0,2	
GoTaq®	0,2		0,2		0,2		0,2	
<b>Total</b>	<b>23</b>		<b>23</b>		<b>23</b>		<b>23</b>	
	CPSA-F	0,1	CPSA-F	0,1	CPSA-F	0,1	CPSA-F	0,1
	CPSA-R	0,1	CPSA-R	0,1	CPSA-R	0,1	CPSA-R	0,1
	14-F2	0,3	19F-F	0,5	1-F	0,3	8-F	0,2
	14-R2	0,3	19F-R	0,5	1-R	0,3	8-R	0,2
	6-F	0,3	3-F	0,3	5-F	0,3	2-F	0,3
	6-R	0,3	3-R	0,3	5-R	0,3	2-R	0,3
	23F-F	0,5	15B/C-F	0,3	9L/9N-F	0,5	4-F	0,3
	23F-R	0,5	15B/C-R	0,3	9L/9N-R	0,5	4-R	0,3
	19A-F3	0,3	18-F	0,4	7F/7A-F	0,7	20-F	0,3
	19A-R3	0,3	18-R	0,4	7F/7A-R	0,7	20-R	0,3
	9V/9A-F	0,5	17F-F	0,5	16F-F	0,5	22F/22A-F	0,5
	9V/9A-R	0,5	17F-R	0,5	16F-R	0,5	22F/22A-R	0,5
<i>Primers</i>	4		4,2		4,8		3,4	

*Nota.* Adicionar 2uL de muestra por cada reacción.

**Tabla 2**

*Receta Master Mix (Rx5 – Rx8) por reacción para la determinación de serotipos de S. pneumoniae por PCR multiplex secuencial*

PCR	Rx-5		Rx-6		Rx-7		Rx-8	
#Rxns	1		1		1		1	
PCR H <sub>2</sub> O	10,9		12,1		12,1		12,5	
Buffer	5,0		5,0		5,0		5,0	
MgCl <sub>2</sub>	2,0		2,0		2,0		2,0	
dNTPs(10Mm)	0,5		0,5		0,5		0,5	
Primers(25uM)	0,2		0,2		0,2		0,2	
GoTaq®	0,2		0,2		0,2		0,2	
Total	23		23		23		23	
	CPSA-F	0,1	CPSA-F	0,1	39-fwd	0,2	24-F	0,2
	CPSA-R	0,1	CPSA-R	0,1	39-rev	0,2	24-R	0,2
	7C/7B/40-F	0,3	21-F	0,2	CPSA-F	0,1	CPSA-F	0,1
	7C/7B/40-R	0,3	21-R	0,2	CPSA-R	0,1	CPSA-R	0,1
	12F/12A/44/46-F	0,5	33F/33A/37-F	0,3	23B-F	0,2	10F/C/33C-F	0,3
	12F/12A/44/46-R	0,5	33F/33A/37-R	0,3	23B-R	0,2	10F/C/33C-R	0,3
	11A/11D-F	0,3	15A/15F-F	0,3	35A/C/42-F	0,3	34-F	0,3
	11A/11D-R	0,3	15A/15F-R	0,3	35A/C/42-R	0,3	34-R	0,3
	10A-F	0,5	35F/47F-F	0,3	38/25F-F	0,3	31-F	0,5
	10A-R	0,5	35F/47F-R	0,3	38/25F-R	0,3	31-R	0,5
	23A-F	0,5	13-F	0,4	35B-F	0,5	19Fvar-F	0,2
	23A-R	0,5	13-R	0,4	35B-R	0,5	19Fvar-R	0,2
<i>Primers</i>	4,4		3,2		3,2		3,2	

*Nota.* Adicionar 2uL de muestra por cada reacción

**Tabla 3**

*Condiciones de termociclado y corrida electroforética (da Gloria Carvalho et al., 2010)*

<b>Parámetros del termociclado</b>		<b>Electroforesis post-reacción</b>	
1X	95°C por 15min	Agarosa al 2%	1,6g
35X	94°C por 30sec	1X buffer TAE	80mL
	54°C por 90sec	0,5µg/µL Bromuro de etidio	5,0µL
		Calentar/mezclar el gel por completo	
	72°C por 60sec	Mezclar 10µL de producto de PCR con 2µL 6X loading buffer	
1X	72°C por 10min	Cargar 10µL de muestra y 15µL 50bp marcador de pares de base	
∞	4°C	<b>Correr a 100V por 1:30 h</b>	

**Tabla 4**

*Lista de primers utilizados en 8 reacciones de PCR multiplex secuencial para la identificación de serotipos de S. pneumoniae*

<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Gen</b>	<b>pb</b>	<b>Referencia</b>
1-f	CTC TAT AGA ATG GAG TAT ATA AAC TAT GGT TA	wzy	280	Pai et al., 2006
1-r	CCA AAG AAA ATA CTA ACA TTA TCA CAA TAT TGG C			
2-f	TAT CCC AGT TCA ATA TTT CTC CAC TAC ACC	wzy	290	da Gloria Carvalho et al., 2010
2-r	ACA CAA AAT ATA GGC AGA GAG AGA CTA CT			
3-f	ATG GTG TGA TTT CTC CTA GAT TGG AAA GTA G	gal U	371	
3-r	CTT CTC CAA TTG CTT ACC AAG TGC AAT AAC G			
4-f	CTG TTA CTT GTT CTG GAC TCT CGA TAA TTG G	wzy	430	Pai et al., 2006
4-r	GCC CAC TCC TGT TAA AAT CCT ACC CGC ATT G			
6A/6B/6C /6D-f	AAT TTG TAT TTT ATT CAT GCC TAT ATC TGG	wci P	250	
6A/6B/6C /6D-r	TTA GCG GAG ATA ATT TAA AAT GAT GAC TA			
7C/7B/40 -f	CTA TCT CAG TCA TCT ATT GTT AAA GTT TAC GAC GGG A	wcv L	260	Pai et al., 2006
7C/7B/40 -r	GAA CAT AGA TGT TGA GAC ATC TTT TGT AAT TTC			
7F/7A-f	TCC AAA CTA TTA CAG TGG GAA TTA CGG	wzy	599	da Gloria Carvalho et al., 2010
7F/7A-r	ATA GGA ATT GAG ATT GCC AAA GCG AC			
8-f	GAA GAA ACG AAA CTG TCA GAG CAT TTA CAT	wzy	201	
8-r	CTA TAG ATA CTA GTA GAG CTG TTC TAG TCT			
9N/9L-f	GAA CTG AAT AAG TCA GAT TTA ATC AGC	wzx	516	Dias et al., 2007
9N/9L-r	ACC AAG ATC TGA CGG GCT AAT CAA T			

9V/9A-f	GGG TTC AAA G TC AGA CAG TG A ATC TTA A	wzy	816	da Gloria Carvalho et al., 2010
9V/9A-r	CCA TGA ATG A AA TCA ACA TT G TCA GTA GC			
10A- f	GGT GTA GAT TTA CCA TTA GTG TCG GCA GAC	wcr G	628	Pai et al., 2006
10A-r	GAA TTT CTT CTT TAA GAT TCG GAT ATT TCT C			
10F/10C/ 33C- f	GGA GTT TAT CGG TAG TGC TCA TTT TAG CA	wzx	248	da Gloria Carvalho et al., 2010
10F/10C/ 33C- r	CTA ACA AAT TCG CAA CAC GAG GCA ACA			
11A/11D- f	GGA CAT GTT CAG GTG ATT TCC CAA TAT AGT G GAT TAT	wzy	463	Pai et al., 2006
11A/11D- r	GAG TGT AAT TTA TTC CAA CTT CTC CC			
12F/12A/ 12B/ 44/46-f	GCA ACA AAC GGC GTG AAA GTA GTT G	wzx	376	Pai et al., 2006
12F/12A/ 12B/ 44/46-r	CAA GAT GAA TAT CAC TAC CAA TAA CAA AAC			
13-f	TAC TAA GGT AAT CTC TGG AAA TCG AAA GG	wzx	655	da Gloria Carvalho et al., 2010
13-r	CTC ATG CAT TTT ATT AAC CG C TTT TTG TTC			
14-f	GAA ATG TTA CTT GGC GCA GGT GTC AGA ATT	wzy	189	Dias et al. 2007
14-r	GCC AAT ACT TCT TAG TCT CTC AGA TGA AT			
15A/15F- f	ATT AGT ACA GCT GCT GGA ATA TCT CTT C GAT CTA	wzy	434	Pai et al., 2006
15A/15F- r	GTG AAC GTA CTA TTC CAA AC			
15B/15C- f	TTG GAA TTT TTT AAT TAG TGG CTT ACC TA	wzy	496	Pai et al., 2006
15B/15C- r	CAT CCG CTT ATT AAT TGA AGT AAT CTG AAC C			
16F-f	GAA TTT TTC AGG CGT GGG TGT TAA AAG	wzy	717	da Gloria Carvalho et al., 2010
16F-r	CAG CAT ATA GCA CCG CTA AGC AAA TA			

17F-f	TTC GTG ATG ATA ATT CCA ATG ATC AAA CAA GAG GAT	<i>wci</i> P	693	Pai et al., 2006	
17F-r	GTA ACA AAT TTG TAG CGA CTA AGG TCT GC				
18C/18F/ 18B/ 18A-f	CTT AAT AGC TCT CAT TAT TCT TTT TTT AAG CC	<i>wzy</i>	573		
18C/18F/ 18B/ 18A-r	TTA TCT GTA AAC CAT ATC AGC ATC TGA AAC				
19A-f	GAG AGA TTC ATA ATC TTG CAC TTA GCC A	<i>wzy</i>	566		Pimenta et al., 2009
19A-r	CAT AAT AGC TAC AAA TGA CTC ATC GCC				
19F-f	GTT AAG ATT GCT GAT CGA TTA ATT GAT ATC C	<i>wzy</i>	304		Pai et al., 2006
19F-r	GTA ATA TGT CTT TAG GGC GTT TAT GGC GAT AG				
20-f	GAG CAA GAG TTT TTC ACC TGA CAG CGA GAA G	<i>wci</i> L	514		Pai et al., 2006
20-r	CTA AAT TCC TGT AAT TTA GCT AAA ACT CTT ATC				
21-f	CTA TGG TTA TTT CAA CTC AAT CGT CAC C	<i>wzx</i>	192	da Gloria Carvalho et al., 2010	
21-r	GGC AAA CTC AGA CAT AGT ATA GCA TAG				
22F/22A- f	GAG TAT AGC CAG ATT ATG GCA GTT TTA TTG TC	<i>wcw</i> V	643	Pai et al., 2006	
22F/22A- r	CTC CAG CAC TTG CGC TGG AAA CAA CAG ACA AC				
23A-f	TAT TCT AGC AAG TGA CGA AGA TGC G	<i>wzy</i>	722	da Gloria Carvalho et al., 2010	
23A-r	CCA ACA TGC TTA AAA ACG CTG CTT TAC				
23B-f	CCA CAA TTA G CG CTA TAT TCA TTC AAT CG	<i>wzx</i>	199		
23B-r	GTC CAC GCT GAA TAA AAT GAA GCT CCG				
23F-f	GTA ACA GTT GCT GTA GAG GGA ATT GGC TTT TC	<i>wzy</i>	384		Pai et al., 2006
23F-r	CAC AAC ACC TAA CAC TCG ATG GCT ATA TGA TTC				

24F/24A/ 24B-f	GCT CCC TGC TAT TGT AAT CTT TAA AGA G	wzy	99	da Gloria Carvalho et al., 2010	
24F/24A/ 24B-r	GTG TCT TTT ATT GAC TTT ATC ATA GGT CGG				
31-f	GGA AGT TTT CAA GGA TAT GAT AGT GGT GGT GC	wzy	701	Pai et al., 2006	
31-r	CCG AAT AAT ATA TTC AAT ATA TTC CTA CTC				
33F/33A/ 37-f	GAA GGC AAT CAA TGT GAT TGT GTC GCG	wzy	339		
33F/33A/ 37-r	CTT CAA AAT GAA GAT TAT AGT ACC CTT CTA C				
34-f	GCT TTT GTA AGA GGA GAT TAT TTT CAC CCA AC	wzy	408		
34-r	CAA TCC GAC TAA GTC TTC AGT AAA AAA CTT TAC				
35A/35C/ 42-f	ATT ACG ACT CCT TAT GTG ACG CGC ATA	wzx	280		da Gloria Carvalho et al., 2010
35A/35C/ 42-r	CCA ATC CCA AGA TAT ATG CAA CTA GGT T				
35B-f	GAT AAG TCT GTT GTG GAG ACT TAA AAA GAA TG	wcr H	677		
35B-r	CTT TCC AGA TAA TTA CAG GTA TTC CTG AAG CAA G				
35F/47F-f	GAA CAT AGT CGC TAT TGT ATT TTA TTT AAA GCA A	wzy	517	Pai et al., 2006	
35F/47F-r	GAC TAG GAG CAT TAT TCC TAG AGC GAG TAA ACC				
38/25F/25 A-f	CGT TCT TTT ATC TCA CTG TAT AGT ATC TTT ATG	wzy	574		
38/25F/25 A-r	ATG TTT GAA TTA AAG CTA ACG TAA CAA TCC				
39-f	TCA TTG TAT TAA CCC TAT GCT TTA	wzy	98	da Gloria Carvalho et al., 2010	
39-r	TTG GTG GAG TAT CTC CAT TGT ATT GAA ATC TAC CAA				
cps A-f	GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC	wzg	160	Pai et al., 2006	
cps A-r	GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC				

### **3.7 Análisis de datos**

#### **3.7.1 Cálculo de tamaño de muestra**

Uno de los objetivos del estudio principal de portadores de neumococo fue comparar la distribución actual de serotipos con los resultados reportados previamente en el estudio pre-vacunal (Mercado et al., 2012) donde estudiaron una muestra de niños en Lima con características similares a estudio principal. Se esperó encontrar una disminución de los serotipos vacunales PCV13 entre los portadores, estimada en alrededor del 20% extrapolando de los datos publicados por Hanke et al. (Hanke et al., 2016) en una comunidad andina peruana.

Para una reducción mínima esperada de serotipos vacunales PCV13 de 17,5% (15-20%) (Mercado et al., 2012) entre los portadores, con un nivel de confianza de 95% y una potencia de 80%, se obtiene un tamaño de muestra de 727 niños, considerando un margen de seguridad de +10% el tamaño de muestra final será de 800 niños.

El estudio principal de portadores de neumococo colectó por conveniencia muestras consecutivas similares en cada una de las cinco sedes de del estudio (160 niños por sede). Por motivos del estudio principal y de los investigadores principales, se acordó enrolar 200 niños por cada sede.

#### **3.7.2 Análisis descriptivo**

Se construyeron tablas para describir las características demográficas de los participantes y la distribución de serotipos de neumococo por grupo etario y por hospitales. Se determinaron la frecuencia de portación de neumococo y de cada uno de los serotipos/serogrupos, individual y agrupada según la PCV13. Se comparó la

frecuencia de serotipos vacunales y no vacunales del estudio con los publicados en el estudio de vigilancia pasiva de niños portadores sanos (Mercado et al., 2012).

Para el manejo de los datos y la construcción de las tablas se utilizó el paquete estadístico Stata/SE versión 17.0 (StataCorp LP, College Station, TX, USA).

### **3.8 Consideraciones éticas**

El estudio principal fue evaluado por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y registrado en el Sistema Descentralizado de Información y Seguimiento a la Investigación (Anexo 1). Además, se obtuvo la aprobación del estudio en cada hospital participante y el equipo investigador veló por mantener la privacidad de los datos de cada niño.

Al realizar esta investigación, se cumplieron con los siguientes aspectos éticos:

- Del individuo y papel de los investigadores: Los investigadores afirmaron conocer las implicancias éticas en la concepción y desarrollo del estudio, como se mencionan seguidamente.
- Del diseño: No se realizaron ninguna intervención que altere el estado de salud del niño.
- Ética colectiva e individual: Las personas y la comunidad no se exponían a riesgos que puedan afectar su salud.
- Riesgos: Mínimo (dolor leve y/o incomodidad al momento del hisopado, raramente mínima excoriación de la mucosa). Se minimizó al máximo este riesgo contando con un personal entrenado para la toma de muestra y usando un hisopo muy delgado y de material apropiado
- Inconveniencias para los participantes: Incomodidad al momento del hisopado y de los padres de familia al momento de responder las preguntas.

- Consentimiento informado (Anexo 4): Los familiares fueron informados del estudio y se les invitó a firmar el consentimiento informado. Al ser éste, un estudio con riesgos mínimos y como no pertenece a la categoría de ensayo clínico, solamente se solicitó la firma de la madre o del padre o del apoderado.

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Portación de *S. pneumoniae*

El estudio principal de portadores de neumococo realizado entre los años 2016 a 2019 colectó y procesó 1000 muestras de hisopado nasofaríngeos de niños portadores sanos de los cinco hospitales participantes del estudio. Mediante las pruebas microbiológicas, se determinó que, entre el total de hisopados, 208 dieron positivo para *S. pneumoniae*, con un porcentaje de portación de *S. pneumoniae* de 20,8 % (208/1000).

### 4.2 Características demográficas de niños portadores de *S. pneumoniae*

En los niños colonizados por *S. pneumoniae*, la media de la edad fue de 11,7 meses (D.e: 6,1). El grupo de niños entre 6 a 12 meses de edad, representa el 28,8% de los niños colonizados y el grupo de 2 a 6 meses de edad, conforma el 19,2% de los portadores. La distribución de los sexos fue homogénea. Más del 95% de los niños estaban inmunizados con al menos una dosis de la PCV13 al momento de la toma de muestra y solo alrededor de 20% de los serotipos/serogrupos detectados en los aislamientos neumocócicos de los participantes estaban cubierto por la PCV13 (Tabla 5).

Del total de portadores, el 23,6% provinieron de muestras de niños enrolados del Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión y el 16,8% del Instituto Nacional de Salud Del Niño.

**Tabla 5***Características de los niños colonizados por S. pneumoniae (n=208)†*

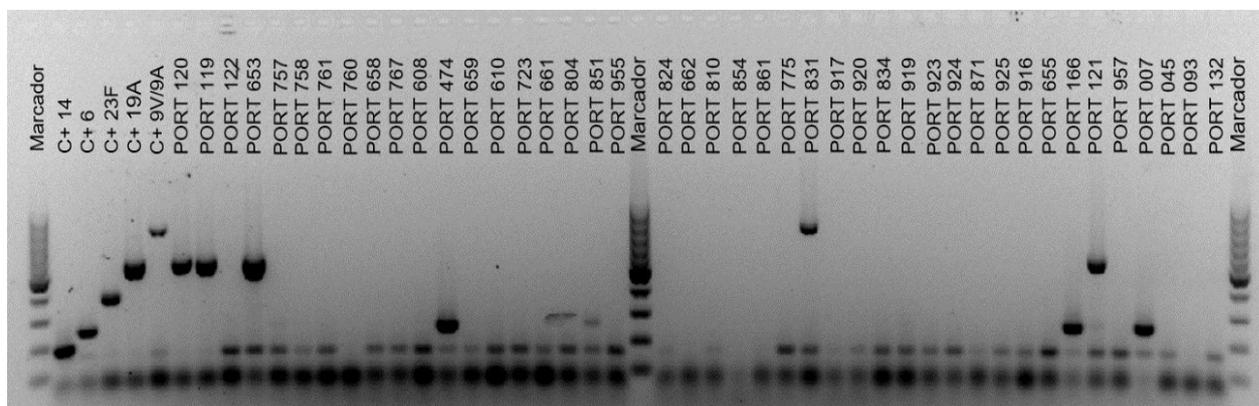
Características	n (%)
<b>Sexo</b>	
Femenino	106 (51,0)
Masculino	102 (49,0)
Edad (meses)*	11,7 ± 6,1
<b>Grupo etario (meses)</b>	
2 - 6	40 (19,2)
6 - 12	60 (28,8)
12 - 18	57 (27,5)
18 - 24	51 (24,5)
<b>Portación por sede de estudio</b>	
H. Carrión	49 (23,6)
H. San Bartolomé	47 (22,6)
H. Rebagliati	40 (19,2)
H. Cayetano	37 (17,8)
Inst. Del Niño	35 (16,8)
<b>PCV13</b>	
Vacunado	183 (95,3)
No vacunado	9 (4,7)
<b>Serotipo/Serogrupos vacunal</b>	
Si	43 (20,7)
No	165 (79,3)

*Nota.\** Media ± desviación estándar. † Algunos variables pueden sumar menos de 208 por datos faltantes.

### 4.3 Serotipificación molecular

**Figura 2**

*Corrida electroforética de la Reacción 1*



*Nota.* De izquierda a derecha, 5 controles positivos para la Rx1 (14, 6, 23F, 19A, 9V/9A), 3 marcadores de peso molecular (al inicio, al centro y al final del gel) y 42 muestras (PORT XXX). Muestra PORT 120, 119, 653, 121 (amplificaron para Serotipo 19A). PORT 474, 166, 007 (amplificaron para Serogrupo 6). PORT 831 (amplificó para Serogrupo 9V/9A).

Al evaluar la frecuencia de aislamientos positivos para cada reacción, la reacción 2 y la reacción 7 presentaron la mayor proporción de muestras positivas, siendo 20,5% (35/171) para Rx2 y 18,1% para Rx7 (105/19) (Tabla 6).

**Tabla 6***Distribución de muestras positivas por reacción*

Reacción	Muestras ingresadas a la Reacción	Positivo para un serotipo/serogrupo n (%)
Rx1	208	37 (17,8)
Rx2	171	35 (20,5)
Rx3	136	4 (2,9)
Rx4	132	0
Rx5	132	15 (11,4)
Rx6	117	12 (10,3)
Rx7	105	19 (18,1)
Rx8	86	5 (5,8)
Aislamientos no tipificables = 81		

*Nota.* Rx: Reacción

#### 4.4 Distribución de Serotipos por hospitales

Al evaluar la distribución de serotipos por hospitales, tanto el serotipo/serogrupo 15B/15C y 6(6A/6B/6C/6D) son los más frecuentes y están presentes en todos los hospitales participantes del estudio (Tabla 7). Los aislamientos de neumococo asignados como no tipificables (aislamientos con serotipos no comprendidos en la PCR multiplex secuenciada) representan el 38.9% del total de aislamientos analizadas, este porcentaje de aislamientos “No Tipificables” podría disminuir al realizarse las pruebas de serotipificación mediante la Reacción de *Quellung* o WGS.

**Tabla 7***Frecuencia de serotipos/serogrupos por hospitales*

Serotipo/ Serogrupo	H. Carrión n (%)	H. San Bartolomé n (%)	H. Rebagliati n (%)	H. Cayetano n (%)	I. del Niño n (%)	Frecuencia total n (%)
15B/15C	7 (14.3)	7 (14.9)	3 (7.5)	6 (16.2)	6 (17.1)	29 (13.9)
6(6A/6B/6C/6D)	4 (8.2)	9 (19.1)	6 (15.0)	4 (10.8)	1 (2.9)	24 (11.5)
19A	2 (4.1)	4 (8.5)	3 (7.5)	0	2 (5.7)	11 (5.3)
11A/11D	2 (4.1)	4 (8.5)	0	1 (2.7)	0	7 (3.4)
23B	2 (4.1)	0	2 (5)	2 (5.4)	1 (2.9)	7 (3.4)
15A/15F	1 (2)	2 (4.3)	2 (5)	1 (2.7)	0	6 (2.9)
23A	0	2 (4.3)	2 (5)	0	2 (5.7)	6 (2.9)
13	1 (2)	0	1 (2.5)	0	2 (5.7)	4 (1.9)
16F	0	1 (2.1)	1 (2.5)	2 (5.4)	0	4 (1.9)
19F	2 (4.1)	1 (2.1)	0	0	1 (2.9)	4 (1.9)
35B	0	2 (4.3)	1 (2.5)	0	1 (2.9)	4 (1.9)
39	1 (2.0)	1 (2.1)	0	2 (5.4)	0	4 (1.9)
24	0	0	0	1 (2.7)	2 (5.7)	3 (1.4)
38/25F	1 (2.0)	0	0	2 (5.4)	0	3 (1.4)
3	0	0	1 (2.5)	0	1 (2.9)	2 (1)
34	0	0	1 (2.5)	1 (2.7)	0	2 (1)
35F/47F	2 (4.1)	0	0	0	0	2 (1)
7C/7B/40	0	0	0	0	1 (2.9)	1 (0.5)
9V/9A	0	0	1 (2.5)	0	0	1 (0.5)
10A	0	1 (2.1)	0	0	0	1 (0.5)
23F	0	1 (2.1)	0	0	0	1 (0.5)
35A/5C/42	0	0	0	1 (2.7)	0	1 (0.5)
NT*	24 (49.0)	12 (25.5)	16 (40.0)	14 (37.8)	15 (42.9)	81 (38.9)
Total	49	47	40	37	35	208

*Nota.* \*NT: No tipificables, serotipos no detectables por PCR convencional multiplex secuencial.

#### **4.5 Distribución de Serotipos por grupo etario**

El serotipo/serogrupo 15B/15C fue el más frecuente para los grupos etarios de 2 a 6, 12 a 18 y 18 a 24 meses de edad, representando el 10,0%, 10,5% y 31,4% de los aislamientos respectivamente. En el caso del grupo de niños entre los 6 a 12 meses de edad, se encontró que el serogrupo 6(6A/6B/6C/6D) representa el 18,3% de los aislamientos neumocócicos en este grupo (Tabla 8). Del mismo modo que en el caso de hospitales, los aislamientos no tipificables representan gran parte de los aislamientos neumocócicos, estando presentes entre el 33% al 43% de aislamientos por cada grupo etario.

**Tabla 8***Frecuencia de serotipos/serogrupos por grupo etario*

Serotipo/ Serogrupo	2 a 6 meses n (%)	6 a 12 meses n (%)	12 a 18 meses n (%)	18 a 24 meses n (%)	Frecuencia total n=208
15B/15C	4 (10,0)	3 (5,0)	6 (10,5)	16 (31,4)	29
6(6A/6B/6C/6D)	3 (7,5)	11 (18,3)	5 (8,8)	5 (9,8)	24
19A	3 (7,5)	2 (3,3)	1 (1,8)	5 (9,8)	11
11A/11D	0	3 (5,0)	4 (7,0)	0	7
23B	3 (7,5)	1 (1,7)	2 (3,5)	1 (2,0)	7
15A/15F	0	2 (3,3)	2 (3,5)	2 (3,9)	6
23A	1 (2,5)	1 (1,7)	3 (5,3)	1 (2,0)	6
13	2 (5,0)	1 (1,7)	0	1 (2,0)	4
16F	1 (2,5)	2 (3,3)	0	1 (2,0)	4
19F	1 (2,5)	2 (3,3)	1 (1,8)	0	4
39	1 (2,5)	1 (1,7)	2 (3,5)	0	4
35B	2 (5,0)	2 (3,3)	0	0	4
24	1 (2,5)	0	1 (1,8)	1 (2,0)	3
38/25F	0	1 (1,7)	1 (1,8)	1 (2,0)	3
3	0	1 (1,7)	1 (1,8)	0	2
34	0	0	2 (3,5)	0	2
35F/47F	1 (2,5)	0	1 (1,8)	0	2
7C/7B/40	0	0	1 (1,8)	0	1
9V/9A	1 (2,5)	0	0	0	1
10A	0	0	1 (1,8)	0	1
23F	0	0	1 (1,8)	0	1
35A/35C/42	0	1 (1,7)	0	0	1
NT	16 (40,0)	26 (43,3)	22 (38,6)	17 (33,3)	81
Total	40	60	57	51	

*Nota.* \*NT: No tipificables, serotipos no detectables por PCR convencional multiplex secuencial.

#### **4.6 Distribución de Serotipos vacunales, no vacunales y emergentes**

Al evaluar la frecuencia de los serotipos que se encuentran o no dentro de los serotipos incluidos en la vacuna PCV13 (VT) (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A) tenemos que el 20,7% (43/208) fueron serotipos o serogrupos que incluían por lo menos un serotipo cubierto por la vacuna PCV13; mientras que el 79,3% (165/208) fueron serotipos que no se encontraban cubiertos en la vacuna PCV13 (VNT). Este último grupo está representado mayoritariamente por aislamientos no tipificables (81 aislamientos), aislamientos de los serotipos 15B/15C (29 aislamientos), 11A/11D (7 aislamientos) y 23B (7 aislamientos) (Tabla 9).

El serotipo 15B/15C representó el principal serotipo emergente. Además, se han determinado serotipos no identificados en el anterior estudio, pero en baja frecuencia, como son los de los serotipos/serogrupos 39, 38/25F, 3 y 7C/7B/40.

Por otro lado, se observó una reducción en la frecuencia de los serotipos vacunales [Serotipo 14, 6(6A/6B/6C/6D) y 19F], lo cual podría deberse a un el impacto positivo de la vacuna antineumocócica en la distribución de serotipos predominantes en la era pre-vacunal.

**Tabla 9**

*Distribución de los serotipos del estudio Post-vacunal y del estudio Pre-vacunal*

*(Mercado et al. 2012).*

Serotipo / Serogrupo	Pre-vacunal n (%)	Post-vacunal n (%)
15B/15C	13 (4,7)	29 (13,9)
6(6A/6B/6C/6D)**	45 (16,4)	24 (11,5)
19A*	9 (3,3)	11 (5,3)
11A/11D	13 (4,7)	7 (3,4)
23B	3 (1,1)	7 (3,4)
23A	12 (4,4)	6 (2,9)
15A/15F	10 (3,6)	6 (2,9)
19F*	56 (20,4)	4 (1,9)
13	3 (1,1)	4 (1,9)
16F	2 (0,7)	4 (1,9)
35B	1 (0,4)	4 (1,9)
39	0	4 (1,9)
24(24A/24B/24F)	5 (1,8)	3 (1,4)
38/25F	0	3 (1,4)
35F/47F	5 (1,8)	2 (1,0)
34	3 (1,1)	2 (1,0)
3*	0	2 (1,0)
23F*	24 (8,7)	1 (0,5)
9V/9A**	4 (1,5)	1 (0,5)
10A	4 (1,5)	1 (0,5)
35A/5C/42	1 (0,4)	1 (0,5)
7C/7B/40	0	1 (0,5)
14*	13 (4,7)	0
33F/33A/37	3 (1,1)	0
18(18A/18B/18C/18F)**	2 (0,7)	0
4*	2 (0,7)	0
22F/22A	1 (0,4)	0
21	1 (0,4)	0
20	1 (0,4)	0
9L/9N	1 (0,4)	0
No Tipificable	38 (13,8)	81 (38,9)
<b>TOTAL</b>	<b>275</b>	<b>208</b>

*Nota.* \*Serotipo vacunal determinado por PCR convencional. \*\*Serogrupo que contiene al menos un serotipo vacunal.

## V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En esta investigación en niños portadores sanos menores de 2 años de edad realizada luego de la introducción de la PCV13 en cinco hospitales de Lima, se observó que la colonización nasofaríngea fue del 20,8%. Con respecto a los serotipos, 15B/15C y 6(6A/6B/6C/6D), fueron los más frecuentes y se aislaron en todos los hospitales participantes, representando en total el 13,9 y 11,5% de aislamientos respectivamente. Por otro lado, 20,7% de aislamientos presentaron serotipos o serogrupos que incluían por lo menos un serotipo vacunal de la PCV13. Entre los 165 aislamientos con serotipos no vacunales, el 49,1% (81 aislamientos) eran no tipificables y 17,6% correspondían a los serotipos 15B/15C.

En 2014, una revisión sistemática que incluyó estudios que identificaron la prevalencia del portadores nasofaríngeos de neumococo entre 1990 y 2012 en países de medianos y bajos ingresos, concluyó que las tasas de portación neumocócica entre niños menores de cinco años de países de medianos ingresos se encontraban entre 6,5% y 69,8% (Adegbola et al., 2014b). Nuestro estudio se realizó utilizando muestras colectadas entre 2016 y 2019 y se determinó una portación nasofaríngea dentro del rango determinado por Adegbola et al. (2014) (20,8%). Asimismo, es una tasa de portación similar a la reportada en investigaciones transversales realizados en niños menores de cinco años en España (19,7%) (Alfayate Miguélez et al., 2020), Chipre (25,3%) (Hadjipanayis et al., 2016) e Italia (27,0%) (Zuccotti et al., 2014) luego de la introducción de la PCV13.

Sin embargo, la frecuencia de portación neumocócica determinada en nuestro estudio es menor a la observada en un estudio prospectivo de una cohorte de 203 niños menores de 5 años, seleccionados aleatoriamente en una comunidad urbana ubicada en la periferia de la ciudad de Salvador (Brasil), realizado entre 2008 y 2009 antes de la

introducción de la PCV10, en el cual la prevalencia de portación neumocócica fue del 55,0% (398/721). Del mismo modo, se reportaron frecuencias más altas de portación en estudios transversales realizados luego de la introducción de la PCV en EE.UU (32,0%) (Desai et al., 2015), India (33,0%) (Swedan et al., 2016) y Grecia (45,1%) (Grivea et al., 2012). Esta diferencia en las frecuencias de portación nasofaríngea podría explicarse debido a que la PCV13 tiene una mayor cobertura a la PCV10 y la PCV7 (Duggan, 2010; Prymula y Schuerman, 2009), y por lo tanto esto sugiere que las PCVs contribuye a la disminución de la portación nasofaríngea de *S. pneumoniae*.

Adicionalmente, el estudio principal de portadores de neumococo confirmó mediante PCR convencional (detección del gen *lytA*) que solo el 89,1% eran *S. pneumoniae* (187/208). Esto podría reducir también el porcentaje de muestras no tipificables debido a que entre los 21 aislamientos no neumococo por PCR *LytA*, 3 fueron positivos para algún serotipo/serogrupo, mientras que los 18 restantes fueron no tipificables (probablemente un falso positivo por microbiología). Sin embargo, el PCR *LytA* ha mostrado una considerable correlación con la detección por microbiología en otro estudio realizado en niños portadores de comunidades rurales de Perú (Chien et al., 2013).

Por otro lado, los aislamientos neumocócicos de los serotipos, 15B/15C y 6(6A/6B/6C/6D) fueron recuperados en hisopados nasofaríngeos provenientes de todos los hospitales participantes, representando en total el 13,9 y 11,5% de aislamientos respectivamente. En una investigación longitudinal de tipo cohorte realizada entre 2013 y 2017 en Taiwán, que incluyó el seguimiento de 855 menores durante sus primeros tres años de vida, se determinó que del total de 90 aislamientos tipificables, el 16,7% correspondían al serotipo 15B/15C y solo se determinaron dos aislamientos del serotipo 6B. Además, el serotipo más frecuente fue el 23A (33,3%) (Tsai et al., 2020). En nuestro

estudio, ningún serotipo presentó frecuencias tan elevadas, incluso si se consideran solo a nivel de los aislamientos tipificables.

Del mismo modo, un estudio realizado en EE.UU tras la introducción de la PCV13, reportó que 15B/15C (14,2%) fue el segundo serotipo más frecuente. En esta investigación los serotipos comúnmente transportados incluyeron a 35B (15,2 %), 19A (9,6 %), 11A (8 %), 23B (5,6 %), 6C (5,3 %), 21 (5,0%) y 15A (5,0%) (Desai et al., 2015). En Turquía, los serotipos más comunes detectados fueron el 3 (18,3%), el 19F (14,2 %), 6A/B (8,1 %), 11A (8,1 %) y 15B (8,1%) (Kanık Yüksek et al., 2020). En este estudio 15B y 6A/B se presentaron con frecuencias similares, contrario a lo reportado en nuestro estudio. Además, es importante resaltar que recientemente se ha observado la relevancia clínica de los serotipos 15B, 15C, 23A y 11 en enfermedades neumocócicas invasivas (ENI) (Kaplan et al., 2013). Por ello, es importante continuar la vigilancia de la prevalencia de 15B/15C en la población peruana, ya que la portación nasofaríngea es el primer paso para el desarrollo de una ENI (Bogaert et al., 2004).

El 20,7% de aislamientos presentaron serotipos o serogrupos que incluían por lo menos un serotipo vacunal de la PCV13. En España, tras la introducción de la PCV7, solo el 8,7% del total de aislamientos de portadores nasofaríngeos neumocócicos eran serotipos vacunales de la PCV7, siendo 6B el más frecuente, seguido de 19F, 23F y 4. Además, se observó que 10,4% de los serotipos encontrados estarían incluidos en la PCV10 y un 28,9% en la PCV13 (García-Vera et al., 2011). Luego de la introducción de la PCV13 en EE.UU, el 13,9% de portadores eran serotipos PCV13, además se observó que los serotipos PCV13 disminuyeron significativamente del 29,0% al 3,0% ( $p < 0,001$ ), principalmente debido a la disminución del serotipo 19A del 25,8% al 3,0% (Desai et al., 2015). Por el contrario, en Turquía, en este periodo vacunal se reportó un porcentaje de aislamientos con serotipos vacunales superior a los antes mencionados (53,0%), siendo

el 3 el más frecuente (18,3%) (Kanık Yüksek et al., 2020). En nuestra investigación, el serotipo 3 solo se detectó en dos aislamientos neumocócicos. Estos hallazgos sugieren que la presión ejercida por las vacunas neumocócicas podría variar de acuerdo a otros factores.

Entre los 165 aislamientos con serotipos no vacunales, el 49,1% (81 aislamientos) eran no tipificables y 17,6% correspondían a los serotipos 15B/15C. En EE.UU, los serotipos no PCV13 (excluyendo 6C) aumentaron del 68,4% (78/114) al 97,0% ( $p < 0,001$ ) (Desai et al., 2015), lo que podría demostrar la presión ejercida por la PCV13. Otro estudio, que comparó la distribución de serotipos en EE.UU después de la introducción de la PCV7 y después de la PCV13, determinó que los serotipos distintos de PCV13 representaron el 91,0% de los aislamientos en la era de PCV13, siendo 35B, 21 y 23B los más comúnmente aislados (9-15 % del total de aislamientos neumocócicos cada uno) (Kaur et al., 2016). En Francia, de forma similar a nuestro estudio, 15B/15C fue el serotipo más frecuente del no PCV13 (22,4%), seguido de 23A/B (11,2%) y 35B (10,6%) (Dunais et al., 2015). Del mismo modo, en Turquía se observó que los serotipos más frecuentes fueron 15B (9,7%), 23F (8,7%), 23A (8,7%), 11A (6,7%), 19F (4,8%) y 15F (4,8%) (Ceyhan et al., 2021).

El serotipo 19A (5,3%) fue el tercer serotipo más frecuente. La introducción de la vacuna antineumocócica conjugada heptavalente (PCV7) en los Programas de Inmunización Infantil de rutina en todo el mundo dio como resultado que el serotipo 19A se convirtiera en una de las principales causas de la carga restante de enfermedad neumocócica en individuos vacunados y no vacunados (Isturiz et al., 2017), además se sugirió que había causado un aumento en la tasa de desarrollo de cepas resistentes a múltiples antibióticos (MDR) (Richter et al., 2013). En un estudio realizado en EE.UU realizado entre niños de 6 a 59 meses de edad, el serotipo 19A representó el 8,0% de los

aislamientos de portadores nasofaríngeos antes de la PCV7 y el 20,7% de los aislamientos después de la PCV7 (Sharma et al., 2013). Esta frecuencia es mayor a la encontrada en nuestra investigación realizada luego de la PCV13, vacuna que incluye al serotipo 19A.

Por otro lado, antes de la introducción generalizada de la PCV13 en países de América Latina y el Caribe, el serotipo 19A representaba el 4,1% de aislamientos neumocócicos colectados entre 1994 y 2008 (Castañeda et al., 2012). En 2010, el serotipo 19A se encontró en 1,8% de los aislamientos neumocócicos de São Paulo (Brasil), y se observó que su frecuencia aumentó progresivamente tras la introducción de la PCV10 (2,5% en 2013 y 6,0% en 2017) (Brandileone et al., 2016). Nuestros hallazgos también evidenciaron un incremento progresivo en la frecuencia de este serotipo (3,3% y 5,3% en el estudio pre y post-vacunal respectivamente).

Respecto a las limitaciones del estudio, la técnica de PCR multiplex secuencial para la identificación de serotipos de neumococo presentó un considerable porcentaje de aislamientos catalogados como no tipificables. Sin embargo, esta metodología sigue siendo costo beneficio comparada con técnicas como la reacción de *Quellung* o WGS debido a que, detecta los principales serotipos asociados a enfermedad invasiva y alta resistencia antimicrobiana. A pesar de esto, el presente estudio reporta los primeros datos sobre la distribución de serotipos tras la introducción de la PCV13. Además, evidencia el fenómeno de reemplazo o emergencia de serotipos que se está desarrollando en nuestra población evaluada. Asimismo, proporciona información sobre los principales serotipos circulantes, los cuales podrían ser incluidos en futuras vacunas neumocócicas.

## VI. CONCLUSIONES

- La portación de *S. pneumoniae* en la población estudiada luego de la introducción de la PCV13 fue de 20,8%.
- Serotipo/serogrupo 15B/15C y 6(6A/6B/6C/6D) fueron los más frecuentes y se encontraron en todos los hospitales y grupos etarios.
- La reducción de serotipos vacúnales ha venido consecuentemente con el incremento de serotipos no vacúnales emergentes.

## VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda implementar un programa de vigilancia epidemiológica de los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* circulantes como práctica habitual en los principales centros de salud del país, debido a la emergencia de serotipos que puedan llevar a fallas vacúnales y al incremento de casos de ENI por serotipos no cubiertos por las vacunas antineumocócicas.
- En menos de 10 años desde la introducción de la primera vacuna antineumocócica (PCV7) en el Perú se han evidenciado la reducción en la portación de serotipos vacunales, pero a su vez se observa un incremento de la portación de serotipos no vacunales. Debido a esto, se recomienda actualizar el plan nacional de vacunación con vacunas antineumocócicas de nueva generación como la PCV15 o la nueva PCV20 que brindan protección contra más serotipos.
- Se recomienda reorganizar la secuencia de reacciones de la PCR multiplex secuencial según el porcentaje de positivos por reacción (principalmente el orden de la Rx3 y Rx4) para optimizar el uso de los reactivos.

## VIII. REFERENCIAS

- Adegbola, R. A., DeAntonio, R., Hill, P. C., Roca, A., Usuf, E., Hoet, B., y Greenwood, B. M. (2014a). Carriage of *Streptococcus pneumoniae* and other respiratory bacterial pathogens in low and lower-middle income countries: A systematic review and meta-analysis. *PloS One*, 9(8), e103293. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103293>
- Alfayate Miguélez, S., Yague Guirao, G., Menasalvas Ruíz, A. I., Sanchez-Solís, M., Domenech Lucas, M., González Camacho, F., Ortíz Romero, M. M., Espejo García, P., Guerrero Gómez, C., Iofrío de Arce, A., Moreno Parrado, L., Sánchez Andrada, R. M., Cascales Alcolea, E., Lorente García, S., Paredes Reyes, P., Casquet Barceló, Á., López Yepes, M. L., Viguera Abellán, J. J., Sanz Mateo, G., y Murcian Pneumococcal Study Group, null. (2020). Impact of Pneumococcal Vaccination in the Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Healthy Children of the Murcia Region in Spain. *Vaccines*, 9(1), 14. <https://doi.org/10.3390/vaccines9010014>
- Apte, A., Dayma, G., Naziat, H., Williams, L., Sanghavi, S., Uddin, J., Kawade, A., Islam, M., Kar, S., Li, Y., Kyaw, M. H., Juvekar, S., Campbell, H., Nair, H., Saha, S. K., y Bavdekar, A. (2021). Nasopharyngeal pneumococcal carriage in South Asian infants: Results of observational cohort studies in vaccinated and unvaccinated populations. *Journal of Global Health*, 11, 04054. <https://doi.org/10.7189/jogh.11.04054>
- Balsells, E., Guillot, L., Nair, H., y Kyaw, M. H. (2017). Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in the post-PCV era: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 12(5), e0177113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177113>

- Bogaert, D., de Groot, R., y Hermans, P. (2004). Streptococcus pneumoniae colonisation: The key to pneumococcal disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 4(3), 144–154. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)00938-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)00938-7)
- Brandileone, M.-C. de C., Zanella, R. C., Almeida, S. C. G., Brandao, A. P., Ribeiro, A. F., Carvalhanas, T.-R. M. P., Sato, H., Andrade, A.-L., Verani, J. R., y Pneumococcal Carriage Study Group. (2016). Effect of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae among children in São Paulo, Brazil. *Vaccine*, 34(46), 5604–5611. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.09.027>
- Brook, I., y Gober, A. E. (2009). Bacteriology of spontaneously draining acute otitis media in children before and after the introduction of pneumococcal vaccination. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 28(7), 640–642. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181975221>
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., y Morse, S. A. (2007). Jawetz, Melnick y Adelberg's Medical Microbiology. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 7(3), 273–275.
- Carapetis, J. R., Steer, A. C., Mulholland, E. K., y Weber, M. (2005). The global burden of group A streptococcal diseases. *The Lancet Infectious Diseases*, 5(11), 685–694. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70267-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70267-X)
- Castañeda, E., Agudelo, C. I., De Antonio, R., Rosselli, D., Calderón, C., Ortega-Barria, E., y Colindres, R. E. (2012). Streptococcus pneumoniae serotype 19A in Latin America and the Caribbean: A systematic review and meta-analysis, 1990-2010. *BMC Infectious Diseases*, 12, 124. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-124>
- Center for Disease Control and Prevention of United States (CDC). (2014). *Protocol for Multiplex PCR - S. pneumoniae Serotyping—Clinical specimens—Latin America*

set. <https://www.cdc.gov/streplab/downloads/pcr-Latin-Amer-clinical-specimens.pdf>

- Ceyhan, M., Karadag-Oncel, E., Hascelik, G., Ustundag, G., Gurbuz, V., Samlioglu, P., Yilmaz, N., Ozsurekci, Y., Yilmaz, E., Aykac, K., Oz, F. N., Uzum, O., Orsdemir-Hortu, H., Tanir, G., Yilmaz-Ciftoglu, D., y Kurugol, Z. (2021). Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children aged less than five years. *Vaccine*, 39(15), 2041–2047. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.03.028>
- Chien, Y.-W., Vidal, J. E., Grijalva, C. G., Bozio, C., Edwards, K. M., Williams, J. V., Griffin, M. R., Verastegui, H., Hartinger, S. M., Gil, A. I., Lanata, C. F., y Klugman, K. P. (2013). Density Interactions between *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* in the Nasopharynx of Young Peruvian Children. *The Pediatric infectious disease journal*, 32(1), 72–77. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318270d850>
- Cornick, J. E., y Bentley, S. D. (2012). *Streptococcus pneumoniae*: The evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides. *Microbes and Infection*, 14(7–8), 573–583. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.01.012>
- da Gloria Carvalho, M., Pimenta, F. C., Jackson, D., Roundtree, A., Ahmad, Y., Millar, E. V., O'Brien, K. L., Whitney, C. G., Cohen, A. L., y Beall, B. W. (2010). Revisiting pneumococcal carriage by use of broth enrichment and PCR techniques for enhanced detection of carriage and serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(5), 1611–1618. <https://doi.org/10.1128/JCM.02243-09>
- Dadonaite, B., y Roser, M. (2018). Pneumonia. *Our World in Data*. <https://ourworldindata.org/pneumonia>

- Dagan, R., y Klugman, K. P. (2008). Impact of conjugate pneumococcal vaccines on antibiotic resistance. *The Lancet. Infectious Diseases*, 8(12), 785–795.  
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70281-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70281-0)
- Davalos, L., Terrazas, Y., Quintana, A., Egoavil, M., Sedano, K., Castillo, M. E., Reyes, I., Chaparro, E., Silva, W., Campos, F., Saenz, A., Hernandez, R., Águila, O. del, Pinto, D. G., y Ochoa, T. J. (2016). Características epidemiológicas, clínicas y bacteriológicas de meningitis neumocócica en pacientes pediátricos de Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 33, 425–431.  
<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2016.333.2349>
- De Lencastre, H., y Tomasz, A. (2002). From ecological reservoir to disease: The nasopharynx, day-care centres and drug-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50 Suppl S2, 75–81.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkf511>
- Desai, A. P., Sharma, D., Crispell, E. K., Baughman, W., Thomas, S., Tunali, A., Sherwood, L., Zmitrovich, A., Jerris, R., Satola, S. W., Beall, B., Moore, M. R., Jain, S., y Farley, M. M. (2015). Decline in Pneumococcal Nasopharyngeal Carriage of Vaccine Serotypes After the Introduction of the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in Children in Atlanta, Georgia. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 34(11), 1168–1174.  
<https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000849>
- Dias, C. A., Teixeira, L. M., Carvalho, M. da G., y Beall, B. 2007. (2007). Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. *Journal of Medical Microbiology*, 56(9), 1185–1188.  
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.47347-0>

- Dion, S. B., Major, M., Gabriela Grajales, A., Nepal, R. M., Cane, A., Gessner, B., Vojcic, J., y Suaya, J. A. (2021). Invasive pneumococcal disease in Canada 2010-2017: The role of current and next-generation higher-valent pneumococcal conjugate vaccines. *Vaccine*, 39(22), 3007–3017. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.02.069>
- Duggan, S. T. (2010). Pneumococcal Polysaccharide Conjugate Vaccine (13-Valent, Adsorbed) [Prevenar 13®]. *Drugs*, 70(15), 1973–1986. <https://doi.org/10.2165/11205110-000000000-00000>
- Dunais, B., Bruno, P., Touboul, P., Degand, N., Sakarovitch, C., Fontas, E., Haas, H., Girard-Pipau, F., Ruimy, R., y Pradier, C. (2015). Impact of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* among children attending group daycare in southeastern France. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 34(3), 286–288. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000559>
- Elliott, S. R., y Beeson, J. G. (2008). Estimating the Burden of Global Mortality in Children Aged <5 Years by Pathogen-Specific Causes. *Clinical Infectious Diseases*, 46(11), 1794–1795. <https://doi.org/10.1086/588049>
- Fan, R. R., Howard, L. M., Griffin, M. R., Edwards, K. M., Zhu, Y., Williams, J. V., Vidal, J. E., Klugman, K. P., Gil, A. I., Lanata, C. F., y Grijalva, C. G. (2016). Nasopharyngeal Pneumococcal Density and Evolution of Acute Respiratory Illnesses in Young Children, Peru, 2009–2011. *Emerging Infectious Diseases*, 22(11), 1996–1999. <https://doi.org/10.3201/eid2211.160902>
- Feikin, D. R., Kagucia, E. W., Loo, J. D., Link-Gelles, R., Puhon, M. A., Cherian, T., Levine, O. S., Whitney, C. G., O'Brien, K. L., Moore, M. R., y Group, the S. R. S. (2013). Serotype-Specific Changes in Invasive Pneumococcal Disease after

- Pneumococcal Conjugate Vaccine Introduction: A Pooled Analysis of Multiple Surveillance Sites. *PLOS Medicine*, 10(9), e1001517. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001517>
- Feldman, C., y Anderson, R. (2020). Pneumococcal virulence factors in community-acquired pneumonia. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 26(3), 222–231. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000674>
- García-Vera, C., Ruiz Andrés, M. Á., Arana Navarro, T., Moneo Hernández, I., Castillo Laita, J. A., Macipe Costa, R., y Reville Pinilla, M. J. (2011). Serotipos de neumococo en nasofaringe de niños preescolares sanos tras la vacunación antineumocócica conjugada heptavalente. *Medicina Clínica*, 137(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2010.09.051>
- GBD 2015 LRI Collaborators. (2017). Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet. Infectious Diseases*, 17(11), 1133–1161. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30396-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30396-1)
- GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators. (2018). Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet. Infectious Diseases*, 18(11), 1191–1210. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30310-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30310-4)
- Gómez, J. A., Villaseñor-Sierra, A., Aguilar, G. M., Manjarrez, R. C., y Cervantes-Apolinar, M. Y. (2016). Estimación de la Relación Costo-Efectividad de las Vacunas Neumocócicas Conjugadas Prevenar-13 y Synflorix®, Utilizadas en Los

- Programas de Vacunación de Población Infantil Mexicana. *Value in Health Regional Issues*, 11, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.vhri.2016.07.009>
- Grivea, I. N., Sourla, A., Ntokou, E., Chryssanthopoulou, D. C., Tsantouli, A. G., y Syrogiannopoulos, G. A. (2012). Macrolide resistance determinants among *Streptococcus pneumoniae* isolates from carriers in Central Greece. *BMC Infectious Diseases*, 12, 255. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-255>
- Hadjipanayis, A., Efstathiou, E., Alexandrou, M., Panayiotou, L., Zachariadou, C., Petrou, P., y Papaevangelou, V. (2016). Nasopharyngeal Pneumococcal Carriage among Healthy Children in Cyprus Post Widespread Simultaneous Implementation of PCV10 and PCV13 Vaccines. *PLoS ONE*, 11(10), e0163269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163269>
- Hanke, C. R., Grijalva, C. G., Chochua, S., Pletz, M. W., Hornberg, C., Edwards, K. M., Griffin, M. R., Verastegui, H., Gil, A. I., Lanata, C. F., Klugman, K. P., y Vidal, J. E. (2016). Bacterial Density, Serotype Distribution and Antibiotic Resistance of Pneumococcal Strains from the Nasopharynx of Peruvian Children Before and After Pneumococcal Conjugate Vaccine 7. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 35(4), 432–439. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001030>
- Hauser, C., Kronenberg, A., Allemann, A., Mühlemann, K., y Hilty, M. (2016). Serotype/serogroup-specific antibiotic non-susceptibility of invasive and non-invasive *Streptococcus pneumoniae*, Switzerland, 2004 to 2014. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 21(21). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.21.30239>

- Hosseini, S. M., Poorolajal, J., Karami, M., y Ameri, P. (2015). Prevalence of Nasopharyngeal Carriage of Streptococcus pneumonia in Iran: A Meta-Analysis. *Journal of Research in Health Sciences*, 15(3), 141–146.
- Ikilezi, G., Augusto, O. J., Dieleman, J. L., Sherr, K., y Lim, S. S. (2020). Effect of donor funding for immunization from Gavi and other development assistance channels on vaccine coverage: Evidence from 120 low and middle income recipient countries. *Vaccine*, 38(3), 588–596. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.10.057>
- Isturiz, R., Sings, H. L., Hilton, B., Arguedas, A., Reinert, R.-R., y Jodar, L. (2017). Streptococcus pneumoniae serotype 19A: Worldwide epidemiology. *Expert Review of Vaccines*, 16(10), 1007–1027. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1362339>
- Kanık Yüksek, S., Tezer, H., Gülhan, B., Özkaya Parlakay, A., Güldemir, D., Coskun-Ari, F. F., Bedir Demirdağ, T., Kara Uzun, A., Kızılgün, M., Solmaz, S., Kılıç, S., Yalınay Çırak, M., y Baran Aksakal, F. N. (2020). Nasopharyngeal pneumococcal carriage in healthy Turkish children after 13-valent conjugated pneumococcal vaccine implementation in the national immunization program. *Journal of Infection and Public Health*, 13(2), 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.10.009>
- Kaplan, S. L., Barson, W. J., Lin, P. L., Romero, J. R., Bradley, J. S., Tan, T. Q., Hoffman, J. A., Givner, L. B., y Mason, E. O. (2013). Early trends for invasive pneumococcal infections in children after the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 32(3), 203–207. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318275614b>

- Kaur, R., Casey, J. R., y Pichichero, M. E. (2016). Emerging *Streptococcus pneumoniae* Strains Colonizing the Nasopharynx in Children after 13-Valent (PCV13) Pneumococcal Conjugate Vaccination in Comparison to the 7-Valent (PCV7) Era, 2006-2015. *The Pediatric infectious disease journal*, 35(8), 901–906. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001206>
- Kempf, M., Varon, E., Lepoutre, A., Gravet, A., Baraduc, R., Brun, M., Chardon, H., Cremniter, J., Croizé, J., Dalmay, F., Demachy, M.-C., Fosse, T., Grelaud, C., Hadou, T., Hamdad, F., Koeck, J.-L., Luce, S., Mermond, S., Patry, I., ... Lanotte, P. (2015). Decline in antibiotic resistance and changes in the serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with acute otitis media; a 2001–2011 survey by the French Pneumococcal Network. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(1), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.08.009>
- Lannes-Costa, P. S., de Oliveira, J. S. S., da Silva Santos, G., y Nagao, P. E. (2021). A current review of pathogenicity determinants of *Streptococcus* sp. *Journal of Applied Microbiology*, 131(4), 1600–1620. <https://doi.org/10.1111/jam.15090>
- Le Polain De Waroux, O., Flasche, S., Prieto-Merino, D., Goldblatt, D., y Edmunds, W. J. (2015). The Efficacy and Duration of Protection of Pneumococcal Conjugate Vaccines Against Nasopharyngeal Carriage: A Meta-regression Model. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 34(8), 858–864. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000717>
- Lee, G. M., Kleinman, K., Pelton, S. I., Hanage, W., Huang, S. S., Lakoma, M., Dutta-Linn, M., Croucher, N. J., Stevenson, A., y Finkelstein, J. A. (2014). Impact of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccination on *Streptococcus pneumoniae* Carriage in Young Children in Massachusetts. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 3(1), 23–32. <https://doi.org/10.1093/jpids/pit057>

- Marchisio, P., Esposito, S., Schito, G. C., Marchese, A., Cavagna, R., y Principi, N. (2002). Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Healthy Children: Implications for the Use of Heptavalent Pneumococcal Conjugate Vaccine. *Emerging Infectious Diseases*, 8(5), 479–484. <https://doi.org/10.3201/eid0805.010235>
- Marquart, M. E. (2021). Pathogenicity and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Cutting to the chase on proteases. *Virulence*, 12(1), 766–787. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1889812>
- Masomian, M., Ahmad, Z., Gew, L. T., y Poh, C. L. (2020). Development of Next Generation *Streptococcus pneumoniae* Vaccines Conferring Broad Protection. *Vaccines*, 8(1), E132. <https://doi.org/10.3390/vaccines8010132>
- Mercado, E. H., Egoavil, M., Horna, S. G., Torres, N., Velásquez, R., Castillo, M. E., Chaparro, E., Hernández, R., Silva, W., Campos, F. E., Sáenz, A., Hidalgo, F., Letona, C., Valencia, Á. G., Cerpa, R., López-de-Romaña, B., Pando, J., Torres, B., Castillo, F., ... Ochoa, T. J. (2012). Serotipos de neumococo en niños portadores antes de la vacunación antineumocócica en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 29(1), 53–60.
- Montes, M., y María García-Arenzana, J. (2007). Género *Streptococcus*: Una revisión práctica para el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25, 14–20. <https://doi.org/10.1157/13111833>
- Mostowy, R. J., Croucher, N. J., De Maio, N., Chewapreecha, C., Salter, S. J., Turner, P., Aanensen, D. M., Bentley, S. D., Didelot, X., y Fraser, C. (2017). Pneumococcal Capsule Synthesis Locus *cps* as Evolutionary Hotspot with Potential to Generate Novel Serotypes by Recombination. *Molecular Biology and Evolution*, 34(10), 2537–2554. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx173>

- Muñoz, R., Mollerach, M., López, R., y García, E. (1997). Molecular organization of the genes required for the synthesis of type 1 capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae*: Formation of binary encapsulated pneumococci and identification of cryptic dTDP-rhamnose biosynthesis genes. *Molecular Microbiology*, 25(1), 79–92. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4341801.x>
- Nakano, S., Fujisawa, T., Ito, Y., Chang, B., Suga, S., Noguchi, T., Yamamoto, M., Matsumura, Y., Nagao, M., Takakura, S., Ohnishi, M., Ihara, T., y Ichiyama, S. (2016). Serotypes, antimicrobial susceptibility, and molecular epidemiology of invasive and non-invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in paediatric patients after the introduction of 13-valent conjugate vaccine in a nationwide surveillance study conducted in Japan in 2012-2014. *Vaccine*, 34(1), 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.11.015>
- O'Brien, K. L., Wolfson, L. J., Watt, J. P., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N., Lee, E., Mulholland, K., Levine, O. S., Cherian, T., y Hib and Pneumococcal Global Burden of Disease Study Team. (2009). Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: Global estimates. *Lancet (London, England)*, 374(9693), 893–902. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61204-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61204-6)
- Ochoa, T. J., Egoavil, M., Castillo, M. E., Reyes, I., Chaparro, E., Silva, W., Campos, F., y Sáenz, A. (2010). Invasive pneumococcal diseases among hospitalized children in Lima, Peru. *Revista Panamericana De Salud Publica = Pan American Journal of Public Health*, 28(2), 121–127. <https://doi.org/10.1590/s1020-49892010000800008>

- Padilla, J., Espíritu, N., Rizo-Patrón, E., y Medina, M. C. (2017). Neumonías en niños en el Perú: Tendencias epidemiológicas, intervenciones y avances. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 28(1), 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2017.01.007>
- Padilla, J., Pérez, F., Galarza, R., Tantaleán Da Fieno, J., Suárez, V., Cabezas, C., Gadea, S., y Hajar, G. (2010). Perfil etiológico de la neumonía adquirida en la comunidad en niños de 2 a 59 meses en dos zonas ecológicamente distintas del Perú. *Archivos argentinos de pediatría*, 108, 516–523.
- Pai, R., Gertz, R. E., y Beall, B. (2006). Sequential Multiplex PCR Approach for Determining Capsular Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(1), 124. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.1.124-131.2006>
- Pimenta, F. C., Gertz Jr, R. E., Roundtree, A., Yu, J., Nahm, M. H., McDonald, R. R., Carvalho, M. da G., y Beall, B. W. (2009). Rarely Occurring 19A-Like cps Locus from a Serotype 19F Pneumococcal Isolate Indicates Continued Need of Serology-Based Quality Control for PCR-Based Serotype Determinations. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.00704-09>
- Preado J., V. (2001). Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*: BASIC MICROBIOLOGICAL ASPECTS. *Revista chilena de infectología*, 18, 6–9. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182001000000002>
- Prymula, R., y Schuerman, L. (2009). 10-valent pneumococcal nontypeable *Haemophilus influenzae* PD conjugate vaccine: Synflorix™. *Expert Review of Vaccines*, 8(11), 1479–1500. <https://doi.org/10.1586/erv.09.113>
- Quintero, B., Araque, M., van der Gaast-de Jongh, C., Escalona, F., Correa, M., Morillo-Puente, S., Vielma, S., y Hermans, P. W. M. (2011). Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* colonization in healthy

- Venezuelan children. *European Journal of Clinical Microbiology y Infectious Diseases*, 30(1), 7–19. <https://doi.org/10.1007/s10096-010-1044-6>
- Regev-Yochay, G., Dagan, R., Raz, M., Carmeli, Y., Shainberg, B., Derazne, E., Rahav, G., y Rubinstein, E. (2004). Association between carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in Children. *JAMA*, 292(6), 716–720. <https://doi.org/10.1001/jama.292.6.716>
- Richter, S. S., Heilmann, K. P., Dohrn, C. L., Riahi, F., Diekema, D. J., y Doern, G. V. (2013). Pneumococcal Serotypes before and after Introduction of Conjugate Vaccines, United States, 1999–2011. *Emerging Infectious Diseases*, 19(7), 1074–1083. <https://doi.org/10.3201/eid1907.121830>
- Satzke, C., Turner, P., Virolainen-Julkunen, A., Adrian, P. V., Antonio, M., Hare, K. M., Henao-Restrepo, A. M., Leach, A. J., Klugman, K. P., Porter, B. D., Sá-Leão, R., Scott, J. A., Nohynek, H., O'Brien, K. L., y WHO Pneumococcal Carriage Working Group. (2013). Standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*: Updated recommendations from the World Health Organization Pneumococcal Carriage Working Group. *Vaccine*, 32(1), 165–179. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.08.062>
- Shak, J. R., Ludewick, H. P., Howery, K. E., Sakai, F., Yi, H., Harvey, R. M., Paton, J. C., Klugman, K. P., y Vidal, J. E. (2013). Novel role for the *Streptococcus pneumoniae* toxin pneumolysin in the assembly of biofilms. *MBio*, 4(5), e00655-00613. <https://doi.org/10.1128/mBio.00655-13>
- Sharma, D., Baughman, W., Holst, A., Thomas, S., Jackson, D., da Gloria Carvalho, M., Beall, B., Satola, S., Jerris, R., Jain, S., Farley, M. M., y Nuorti, J. P. (2013). Pneumococcal carriage and invasive disease in children before introduction of the 13-valent conjugate vaccine: Comparison with the era before 7-valent conjugate

- vaccine. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 32(2), e45-53.  
<https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3182788fdd>
- Swedan, S. F., Hayajneh, W. A., y Bshara, G. N. (2016). Genotyping and serotyping of macrolide and multidrug resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated from carrier children. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 34(2), 159–165.  
<https://doi.org/10.4103/0255-0857.176840>
- Takeuchi, N., Ohkusu, M., Wada, N., Kurosawa, S., Miyabe, A., Yamaguchi, M., Nahm, M. H., y Ishiwada, N. (2019). Molecular typing, antibiotic susceptibility, and biofilm production in nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 25(10), 750–757.  
<https://doi.org/10.1016/j.jiac.2019.02.007>
- Talbird, S. E., Taylor, T. N., Caporale, J., Ismaila, A. S., y Gomez, J. (2010). Residual economic burden of *Streptococcus pneumoniae*- and nontypeable *Haemophilus influenzae*-associated disease following vaccination with PCV-7: A multicountry analysis. *Vaccine*, 28 Suppl 6, G14-22.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.06.080>
- Torres, N., Velásquez, R., Mercado, E. H., Egoavil, M., Horna, G., Mejía, L., Castillo, M. E., Chaparro, E., Hernández, R., Silva, W., Campos, F. E., Sáenz, A., Hidalgo, F., Letona, C., Valencia, Á. G., Cerpa, R., López-de-Romaña, B., Torres, B., Castillo, F., ... Ochoa, T. J. (2013). Resistencia antibiótica de *Streptococcus pneumoniae* en portadores nasofaríngeos sanos de siete regiones del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 30(4), 575–582.
- Tsai, M.-H., Liao, S.-L., Chiu, C.-Y., Shih, H.-J., Hua, M.-C., Yao, T.-C., Lai, S.-H., Yeh, K.-W., Chen, L.-C., Chang, Y.-J., y Huang, J.-L. (2020). Longitudinal

- investigation of nasopharyngeal pneumococcal carriage in early childhood: The PATCH birth cohort study. *PLoS ONE*, *15*(8), e0237871.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237871>
- Valente, C., Hinds, J., Gould, K. A., Pinto, F. R., de Lencastre, H., y Sá-Leão, R. (2016). Impact of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on *Streptococcus pneumoniae* multiple serotype carriage. *Vaccine*, *34*(34), 4072–4078.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.06.017>
- Varghese, R., Jayaraman, R., y Veeraraghavan, B. (2017). Current challenges in the accurate identification of *Streptococcus pneumoniae* and its serogroups/serotypes in the vaccine era. *Journal of Microbiological Methods*, *141*, 48–54.  
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.07.015>
- Wahl, B., O'Brien, K. L., Greenbaum, A., Majumder, A., Liu, L., Chu, Y., Lukšić, I., Nair, H., McAllister, D. A., Campbell, H., Rudan, I., Black, R., y Knoll, M. D. (2018). Burden of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b disease in children in the era of conjugate vaccines: Global, regional, and national estimates for 2000–15. *The Lancet Global Health*, *6*(7), e744–e757.  
[https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(18\)30247-X](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30247-X)
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., y Higushi, R. (2013). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* *10*(4): 506-13 (April 1991). *BioTechniques*, *54*(3), 134–139.  
<https://doi.org/10.2144/000114018>
- Wasserman, M., Chapman, R., Lapidot, R., Sutton, K., Dillon-Murphy, D., Patel, S., Chilson, E., Snow, V., Farkouh, R., y Pelton, S. (2021). Twenty-Year Public Health Impact of 7- and 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccines in US

- Children. *Emerging Infectious Diseases*, 27(6), 1627–1636.  
<https://doi.org/10.3201/eid2706.204238>
- Weinberger, D. M., Bruden, D. T., Grant, L. R., Lipsitch, M., O'Brien, K. L., Pelton, S. I., Sanders, E. A. M., y Feikin, D. R. (2013). Using Pneumococcal Carriage Data to Monitor Postvaccination Changes in Invasive Disease. *American Journal of Epidemiology*, 178(9), 1488–1495. <https://doi.org/10.1093/aje/kwt156>
- Weinberger, D. M., Malley, R., y Lipsitch, M. (2011). Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet (London, England)*, 378(9807), 1962–1973. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62225-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62225-8)
- Weiser, J. N., Ferreira, D. M., y Paton, J. C. (2018). *Streptococcus pneumoniae*: Transmission, colonization and invasion. *Nature Reviews. Microbiology*, 16(6), 355–367. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0001-8>
- World Health Organization. (2017). *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- World Health Organization. (2019). Pneumococcal conjugate vaccines in infants and children under 5 years of age: WHO position paper –February 2019 — Vaccins antipneumococciques conjugués chez les nourrissons et les enfants de moins de 5 ans: note de synthèse de l’OMS – février 2019. *Weekly Epidemiological Record = Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 94(08), 85–103.
- Zuccotti, G., Mameli, C., Daprai, L., Garlaschi, M. L., Dilillo, D., Bedogni, G., Faccini, M., Gramegna, M., Torresani, E., PneuMi Study Group (PMSG), Ballerini, E., Benincaso, A., Bonvissuto, M., Bricalli, D., Brioschi, M., Calloni, C. S., Camiletti, M. I., Colella, G., De Angelis, L., ... Vessia, C. (2014). Serotype distribution and antimicrobial susceptibilities of nasopharyngeal isolates of

Streptococcus pneumoniae from healthy children in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine era. *Vaccine*, 32(5), 527–534.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.12.003>

## IX. ANEXOS

## Anexo A: Aprobación ética del estudio principal

CONSTANCIA

El Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el comité institucional de ética en investigación aprobó la ENMIENDA/MODIFICACIÓN del proyecto de investigación señalado a continuación.

**Título del Proyecto** : "Distribución de serotipos y sensibilidad antibiótica de neumococo en niños portadores nasofaríngeos luego de la introducción de la vacuna 13-valente en Lima, Perú".

**Código de inscripción** : 101321

**Investigador principal** : Alcarraz Alcarraz, Mosheh Miso

La **enmienda/modificación** corresponde a los siguientes documentos:

1. **Protocolo de investigación**, versión 1.1 recibida en fecha 14 de mayo del 2018.
2. **Consentimiento informado**, versión 2.1 recibida en fecha 04 de mayo del 2018.

Lima, 29 de mayo del 2018.

  
 Dra. Frine Samalvides Cuba  
 Presidenta  
 Comité Institucional de Ética en Investigación



## Anexo B: Instrumento de recolección de datos del estudio principal

### Ficha de Recolección de Datos

**Proyecto** Distribución de serotipos y sensibilidad antibiótica de neumococo en niños portadores nasofaríngeos luego de la introducción de la vacuna 13-valente en Lima, Perú.

INFORMACIÓN GENERAL	
1. CODIGO:	2. DNI No. :
3. HOSPITAL:	
4. NOMBRE DEL NIÑO:	
5. NOMBRE DEL PADRE, MADRE O APODERADO:	
6. N° HISTORIA CLÍNICA:	
7. FECHA DE NACIMIENTO (dd-mm-aa):	
8. EDAD: _____ meses	
9. SEXO: Masculino ___ Femenino ___	
10. DIRECCION:	
11. TELEFONO:	
12. FECHA DE RECOLECCION DE LA MUESTRA (dd-mm-aa):	
13. CENTRO DE VACUNACIÓN:	
INFORMACIÓN CLÍNICA	
14. DURACIÓN DE LA LACTANCIA MATERNA EXCLUSIVA:	
15. DURACIÓN DE LACTANCIA MATERNA:	
16. NÚMERO DE OTROS NIÑOS MENORES DE 6 AÑOS EN EL MISMO DOMICILIO:	
17. ASISTENCIA A GUARDERIA: Si _____ No _____ ¿Cuántas veces por semana? _____ ¿Cuántas horas/día? _____	
18. CONDICION CLINICA AL MOMENTO DEL ENROLAMIENTO: A. Asintomático: _____ B. Patología respiratoria leve: _____ Tos leve: _____ Estornudos: _____ Rinorrea: _____ Fiebre <38.5°C: _____	
19. USO RECIENTE DE ANTIBIOTICOS (Últimos 3 meses): Si ___ No ___ ¿Hace cuánto tiempo? _____	
20. HOSPITALIZACION PREVIA (Últimos 3 meses) Si ___ No ___ ¿Hace cuánto tiempo? _____ Motivo/diagnóstico: _____	
21. ESTADO DE INMUNIZACION PARA NEUMOCOCO (N° de dosis de vacunas) PCV10: 0 ( ) 1 ( ) Fecha: ___/___/___ 2 ( ) Fecha: ___/___/___ 3 ( ) Fecha: ___/___/___ PCV13: 0 ( ) 1 ( ) Fecha: ___/___/___ 2 ( ) Fecha: ___/___/___ 3 ( ) Fecha: ___/___/___	

## Anexo C: Ficha de laboratorio del estudio principal

FICHA DE LABORATORIO														
DATOS DEL CULTIVO														
1	Código:													
2	Hospital:													
3	Fecha de toma del cultivo	dd-mm-aa: ___/___/___												
4	Cultivo de:													
DATOS BACTERIOLÓGICOS (LABORATORIO CENTRAL DEL ESTUDIO)														
5	Fecha de verificación del cultivo:	dd-mm-aa: ___/___/___												
6	Morfología de la colonia:													
7	Alfa hemólisis:	Si:		Otro:										
8	Coloración Gram													
9	Solubilidad en bilis	Si:		No:										
10	Sensibilidad a la optoquina	_____ mm			Si		No							
11	RESULTADO: <i>Streptococcus pneumoniae</i> :				Si		No							
SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA (Ref 21)														
		Disco (mm)	S-I-R (por disco)				MIC (ug/ml)	S-I-R (por MIC)						
12	Penicilina (disco de oxacilina)		S	≥ 20	I		R		S	≤ 2	I	4	R	> 8
13	Ceftriaxona	-							S	≤ 0.5	I	1	R	≥ 2
14	Azitromicina		S	≥ 18	I	14-17	R	≤ 13						
15	Cloranfenicol		S	≥ 21	I	1	R	≤ 20						
16	TMP/SMX		S	≥ 19	I	16-18	R	≤ 15						
17	Clindamicina		S	≥ 19	I	16-18	R	≤ 15						
18	Tetraciclina		S	≥ 28	I	25-27	R	≤ 24						
19	Levofloxacino		S	≥ 17	I	14-16	R	≤ 13						
20	Rifampicina		S	≥ 19	I	17-18	R	≤ 16						
21	Vancomicina		S	≥ 17	I	-	R	-						
22	Linezolid		S	≥ 21	I	-	R	-						
SEROTIPO														
23	Fecha de análisis del serotipo	dd-mm-aa: ___/___/___												
24	Resultado del serotipo													
		Corregido		Digitado										
COMENTARIOS														

## Anexo D: Consentimiento informado del estudio principal

### HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Proyecto: Distribución de serotipos y sensibilidad antibiótica de neumococo en niños portadores nasofaríngeos luego de la introducción de la vacuna 13-valente en Lima, Perú.**

**Sede Hospitalaria:** \_\_\_\_\_

**Investigadores del Proyecto:**

Dr. Mosheh M. Alcarraz (Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), Hospital Cayetano Heredia (HCH)), Dra. Alessandra Luna (UPCH), Lic. Erik H. Mercad (UPCH), Dr. Eduardo Chaparro (HCH), Dr. Francisco Campos (Hospital San Bartolomé), Dra. Olguita Del Águila (Hospital Nacional E. Rebagliati M.), Dra. María Esther Castillo (Inst. Nacional de Salud del Niño), Dr. Andrés Saenz (Hospital Daniel Alcides Carrión), Dra. Theresa J. Ochoa Woodell (UPCH).

**1) ¿De qué se trata el proyecto?**

El neumococo es un microbio que puede ubicarse en el interior de la nariz y la garganta de niños sanos; pero, en ocasiones, puede producir enfermedades como meningitis (infección al cerebro), neumonía, infecciones en el oído, entre otras. La transmisión del neumococo se ve facilitada por el elevado número de niños que tienen microbios en la nariz. Hoy tenemos vacunas contra el neumococo, pero no eliminan totalmente la presencia del neumococo en la nariz (estado de portador). El propósito de este estudio es saber si su hijo tiene el neumococo en la nariz a pesar de estar sano. Para esto, le tomaremos una muestra de la nariz con un hisopo y le haremos algunas preguntas sobre la salud de su hijo. También nos interesa conocer si existe resistencia del neumococo contra los antibióticos (si funcionan o no). Esto lo mediremos en el laboratorio. Su niño no recibirá ningún tratamiento. En este proyecto participarán aproximadamente 1000 niños de 5 hospitales de Lima.

**2) ¿Quiénes pueden participar en el proyecto?**

Podrán participar niños de 2 meses a 2 años de edad que acuden al Programa de Control del Niño Sano o al Programa de Crecimiento y Desarrollo o a Vacunación de este hospital. Pueden participar niños sanos o con una leve infección respiratoria superior (resfriado común, tos leve, rinitis o "moquitos", estornudos, temperatura menor de 38.5°C). Pueden participar niños vacunados o no contra el neumococo.

**3) ¿Cómo se realizará la toma y análisis de la muestra?**

Se usará un hisopo flexible y muy delgado, especialmente diseñado para este tipo de muestras. Se sostendrá al niño fijando su cabeza con cuidado, se introducirá el hisopo por la fosa nasal y se deslizará suavemente hasta al fondo de la nariz. Luego se retirará y se colocará en un medio especial para el crecimiento del neumococo. Las muestras se analizarán en el Laboratorio de Infectología Pediátrica de la UPCH. Las muestras las guardaremos por 10 años, para poder buscar otros microbios en el futuro.

**Favor de leer cuidadosamente lo siguiente, marcar "SI" o "No" e incluir sus iniciales y la fecha.**

Estoy de acuerdo con que la muestra de la nariz de mi hijo se almacene para uso futuro de investigaciones relacionada a otros microbios, aprobados por los Comités de Ética de investigación en seres humanos.

\_\_\_ SI \_\_\_ NO Iniciales \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Deseo que se me contacte para estudios futuros si son aprobados por los Comités de Ética (de la UPCH y/o del Hospital) para que yo tenga la opción de proveer consentimiento para que un investigador use las muestras de mi hijo.

( ) Sí, quiero la opción de proveer consentimiento nuevamente cada vez que un estudio futuro se apruebe

( ) No, no necesito proveer consentimiento nuevamente cada vez que se apruebe un estudio futuro

Iniciales \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

**4) ¿Existe algún riesgo para el niño que participa en el proyecto?**

El tomar esta muestra en su niño le puede causar cierta incomodidad y leve dolor (por la presencia del hisopo en la nariz). En muy raras ocasiones se puede observar una mínima coloración de sangre en la punta del hisopo que no tiene ningún peligro. No existen riesgos para la salud del niño con este procedimiento.

**5) ¿Existe algún beneficio por participar en el proyecto?**

No hay un beneficio directo para usted o su hijo; sin embargo, este proyecto dará aportes científicos a la comunidad. El estudio permitirá saber si su niño es portador sano de neumococo. Si su niño está sano, no requiere tratamiento. Conocer el tipo de neumococo nos ayudará a vigilar el efecto de las vacunas en nuestro país. Además, conocer la resistencia a los antibióticos permitirá dar un adecuado tratamiento en el futuro a los niños que acuden a este hospital por alguna enfermedad en la que se sospeche neumococo.

Consentimiento Informado General. Estudio Portadores. Versión 2.1 Mayo 2018



**APROBADO**

APROBACION 28.05.18

**6) ¿Quién va a saber la identidad del participante en el proyecto?**

Toda la información del niño, así como los resultados personales de los exámenes serán dados a conocer sólo al padre, madre o persona responsable del niño. Los nombres de los participantes serán debidamente codificados. La información obtenida será manejada con la mayor confidencialidad; será guardada en un archivo especial, al cual sólo tendrán acceso los investigadores.

**7) ¿A quién llamo si tengo preguntas?**

Usted podrá comunicarse con el médico investigador que trabaja en su hospital, llamando al Dr(a).....al número....., quien con gusto resolverá sus dudas o preguntas. Además, podrá comunicarse con la Dra. Frine Samalvides Cuba, Presidenta del Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia al teléfono 319-0000 anexo 201355, para resolver cualquier problema en relación al trato que recibe durante el estudio. También puede comunicarse con el Dr....., Presidente del Comité de Ética del Hospital....., llamando al teléfono: .....

**8) ¿Qué puede pasar si no deseo que mi hijo participe en este proyecto?**

Usted tiene la posibilidad de colaborar con el estudio o de rechazar su participación. El no aceptar participar en este estudio no causará ningún tipo de perjuicio a su menor hijo, el cual seguirá siendo atendido de la misma manera en el hospital. Usted puede retirar a su niño del estudio en cualquier momento.

**9) ¿Hay que realizar algún pago para participar en el proyecto?**

No. La toma y el procesamiento de las muestras obtenidas serán totalmente gratuitos.

El resultado del examen estará disponible en el consultorio durante dos meses o de lo contrario, podrá solicitar el resultado al médico investigador. La entrega del resultado no le ocasionará ningún gasto. Usted o su hijo no recibirán ningún pago por participar.

**10) DECLARACIÓN VOLUNTARIA DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Entiendo que la participación de mi hijo en este estudio es libre y voluntaria, si no deseo que mi hijo(a) participe, éste no se verá afectado de ningún modo. Si decido que mi hijo(a) participe, la participación será totalmente gratuita. He leído este consentimiento informado y acepto voluntariamente la participación de mi hijo. Una copia de este documento me será entregado.

Nombre del Niño

Nombre del padre, madre o apoderado

Firma del padre, madre o apoderado

Fecha y Hora

Nombre del testigo\*

Firma del testigo

Fecha y Hora

Nombre de quien obtiene el consentimiento

Firma de quien obtiene el consentimiento

Fecha y Hora

\*En caso de que el padre, madre sean menores de edad, analfabetos o que no hablen castellano, el testigo será el traductor

Consentimiento Informado General. Estudio Portadores. Versión 2.1 Mayo 2018



**APROBADO**

F. APROBACIÓN 29/05/18

### Anexo E: Cálculo de tamaño de muestra del estudio principal

- Población previa (no expuestos a los afectados de la vacuna, controles históricos): 1000 (Número de niños estudiados en Lima).
- Proporción de portadores de Lima: 275/1000 (27,5%).
- Proporción de serotipos PCV13 en niños de Lima: 148/275 (54%) de los portadores o 148/1000 (14,8%) de la muestra total (Redondeo 15%).
- Porcentaje esperado de reducción de serotipos PCV13: 17,5% (15 a 20%).
- Proporción esperada de serotipos PCV13 en los portadores:  $54\% - 17,5\% = 36,5\%$ .
- Proporción esperada de serotipos PCV13 en la muestra total:  $27,5\%$  (proporción de portadores)  $\times 0,365 = 10\%$  de la muestra total estudiada.

Para el cálculo del tamaño muestral se utilizó la plataforma de acceso libre openepi.com, con la fórmula para estudio transversal, de cohorte y ensayo clínico.

Resultados del cálculo:

	Reducción esperada de serotipos PCV13 en los portadores		
	15%	17,5%	20%
% de serotipos PCV13 en No expuestos	15	15	15
% de serotipos PCV13 en Expuestos	10,7	10	9,4
Tamaño de muestra	1003	727	727

- Tamaño de la muestra No expuestos = 727
- Tamaño de la muestra de Expuestos = 727
- Calculo con escenario alternativo de reducción de serotipos de PCV13 (15% y 20%).

Con fines del estudio principal se esperó una reducción, mínima del 17,5%, con un nivel de confianza de 95% y una potencia de 80%, lo que resultaba en un tamaño de muestra de 727, considerando un margen de seguridad de +10% el tamaño de muestra final fue de 800 niños.

**Anexo F: Concentración y plantilla de cálculo de concentraciones de *primers* por reacción y serotipo proporcionado por Centers for Disease Control and Prevention [Center for Disease Control and Prevention of United States (CDC), 2014].**

Purpose: *S. pneumoniae* serotyping directly from clinical specimens - Latin America

Reagent	Final Conc.	Volume (µL)	Total Rxns	Final Volume*
PCR H <sub>2</sub> O	vary	3.5	20	70
2X PCR Buffer - QIAGEN Multiplex PCR Kit (cat#206143)		12.5	20	250
Fwd Primers	vary	see below		
Rev Primers	vary	see below		
Clinical sample DNA [QIAamp DNA Mini Kit (cat# 51306)] (see extraction protocol)	n/a	5.0	20	
<b>Total</b>		<b>25.0</b>	<b>20</b>	<b>500.0</b>

Date: \_\_\_\_\_ 2014

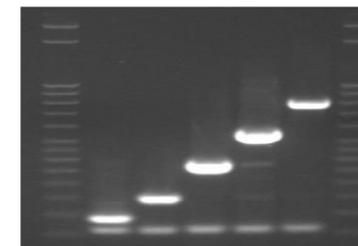
<b>Number of Rxns:</b>	<b>20</b>
------------------------	-----------

Thermal Cycling Parameters		Post-Reaction Electrophoresis	
1X	95°C for 15min	2% Nusieve Agarose (cat# 50090)	1.6g
35X	94°C for 30sec	1X TAE	80mL
	54°C for 90sec	0.5µg/µL EtBr	5.0µL
	72°C for 60sec	Heat/mix gel completely.	
1X	72°C for 10min	Mix 10µL PCR Product + 2µL of loading buffer	
∞	4°C	Load 10µL of sample and 15µL of 50-bp ladder (cat# 70538-3)	
		<b>Run at 100V for 1:30 h</b>	

Primer Info		To get 25µM:		Primer Concentrations (µM)		
Reaction I (Primer ID)	Original Conc. (µM)	Primer (µL)	Water (µL)	Conc. (µM)   rxn	Per X Rxns (µM)	Amount to add (µL)
CPSA-F (913424)	454.92	13.74	236.26	0.1	20	2.0
CPSA-R (913425)	484.20	12.91	237.09	0.1	20	2.0
14-F (914845)	458.38	13.63	236.37	0.3	20	6.0
14-R (914846)	438.64	14.25	235.75	0.3	20	6.0
6A/6B/6C/6D-F (914837)	479.21	13.04	236.96	0.3	20	6.0
6A/6B/6C/6D-R (914838)	442.67	14.12	235.88	0.3	20	6.0
23F-F (905349)	306.9	20.36	229.64	0.5	20	10.0
23F-R (905350)	394.39	15.85	234.15	0.5	20	10.0
19A-F (914855)	444.55	14.06	235.94	0.3	20	6.0
19A-R (914856)	447.73	13.96	236.04	0.3	20	6.0
9V/9A-F (913426)	330.24	18.93	231.07	0.5	20	10.0
9V/9A-R (913427)	219.76	28.44	221.56	0.5	20	10.0
				<b>4.0</b>		<b>80.0</b>

bp  
160  
189  
250  
384  
566  
816

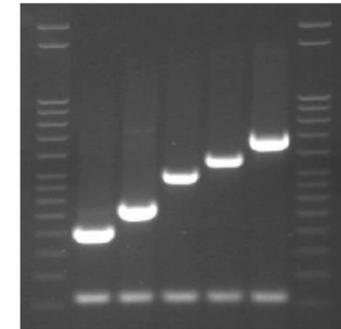
Latin America Reaction I



14 6 23F 19A 9V

Primer Info		To get 25 $\mu$ M:		Primer Concentrations ( $\mu$ M)			
Reaction 2 (Primer ID)	Original Conc. ( $\mu$ M)	Primer ( $\mu$ L)	Water ( $\mu$ L)	Conc. ( $\mu$ M)   rxn	Per X Rxns ( $\mu$ M)	Amount to add ( $\mu$ L)	bp
CPSA-F	255.27	24.48	225.52	0.1	20	2.0	160
CPSA-R	271.86	22.99	227.01	0.1	20	2.0	
19F-F (903759)	381.06	16.40	233.60	0.5	20	10.0	304
19F-R (903760)	403.38	15.49	234.51	0.5	20	10.0	
3-F (914831)	415.41	15.05	234.95	0.3	20	6.0	371
3-R (914832)	444.44	14.06	235.94	0.3	20	6.0	
15B/15C-F (914849)	478.59	13.06	236.94	0.3	20	6.0	496
15B/15C-R (914850)	427.81	14.61	235.39	0.3	20	6.0	
18/C/18F/18B/18A-F (914853)	449.23	13.91	236.09	0.3	20	6.0	573
18/C/18F/18B/18A-R (914854)	419.56	14.90	235.10	0.3	20	6.0	
17F-F (903755)	419.33	14.90	235.10	0.5	20	10.0	693
17F-R (903756)	360.93	17.32	232.68	0.5	20	10.0	
				4.0		80.0	

Latin America Reaction 2

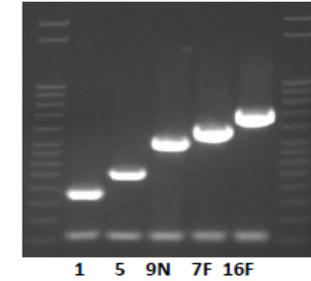


19F 3 15B 18 17F

Primer Info		To get 25 $\mu$ M:		Primer Concentrations ( $\mu$ M)		
Reaction 3 (Primer ID)	Original Conc. ( $\mu$ M)	Primer ( $\mu$ L)	Water ( $\mu$ L)	Conc. ( $\mu$ M)   rxn	Per X Rxns ( $\mu$ M)	Amount to add ( $\mu$ L)
CPSA-F (913424)	454.92	13.74	236.26	0.1	20	2.0
CPSA-R (913425)	484.20	12.91	237.09	0.1	20	2.0
1-F (914827)	419.17	14.91	235.09	0.3	20	6.0
1-R (914828)	496.11	12.60	237.40	0.3	20	6.0
5-F (914835)	485.51	12.87	237.13	0.3	20	6.0
5-R (914836)	353.73	17.67	232.33	0.3	20	6.0
9N/9L-F (906187)	424.63	14.72	235.28	0.5	20	10.0
9N/9L-R (906188)	490.97	12.73	237.27	0.5	20	10.0
7F/7A-F (918151)	381.91	16.37	233.63	0.4	20	8.0
7F/7A-R (918152)	472.92	13.22	236.78	0.4	20	8.0
16F-F (918138)	484.05	12.91	237.09	0.4	20	8.0
16F-R (918139)	424.71	14.72	235.28	0.4	20	8.0
				4.0		80.0

bp  
160  
280  
362  
516  
599  
717

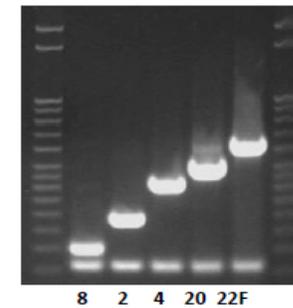
Latin America Reaction 3



Primer Info		To get 25 $\mu$ M:		Primer Concentrations ( $\mu$ M)		
Reaction 4 (Primer ID)	Original Conc. ( $\mu$ M)	Primer ( $\mu$ L)	Water ( $\mu$ L)	Conc. ( $\mu$ M)   rxn	Per X Rxns ( $\mu$ M)	Amount to add ( $\mu$ L)
CPSA-F (913424)	454.92	13.74	236.26	0.1	20	2.0
CPSA-R (913425)	484.20	12.91	237.09	0.1	20	2.0
8-F (911983)	440.26	14.20	235.80	0.2	20	4.0
8-R (911984)	474.20	13.18	236.82	0.2	20	4.0
2-F (914829)	432.37	14.46	235.54	0.3	20	6.0
2-R (914830)	374.93	16.67	233.33	0.3	20	6.0
4-F (914833)	462.37	13.52	236.48	0.3	20	6.0
4-R (914834)	478.61	13.06	236.94	0.3	20	6.0
20-F (903761)	390.2	16.02	233.98	0.3	20	6.0
20-R (903762)	313.49	19.94	230.06	0.3	20	6.0
22F/22A-F (903763)	404.13	15.47	234.53	0.5	20	10.0
22F/22A-R (903764)	331.63	18.85	231.15	0.5	20	10.0
				3.4		68.0

bp  
160  
201  
290  
430  
514  
643

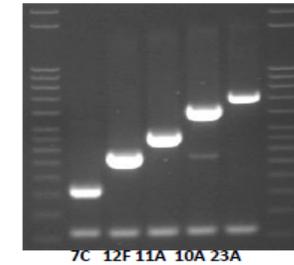
Latin America Reaction 4



Primer Info		To get 25 $\mu$ M:		Primer Concentrations ( $\mu$ M)		
Reaction 5 (Primer ID)	Original Conc. ( $\mu$ M)	Primer ( $\mu$ L)	Water ( $\mu$ L)	Conc. ( $\mu$ M)   rxn	Per X Rxns ( $\mu$ M)	Amount to add ( $\mu$ L)
CPSA-F (913424)	454.92	13.74	236.26	0.1	20	2.0
CPSA-R (913425)	484.20	12.91	237.09	0.1	20	2.0
7C/7B/40-F (807802)	397.69	15.72	234.28	0.3	20	6.0
7C/7B/40-R (807803)	406.43	15.38	234.62	0.3	20	6.0
12F/12A/44/46-F (914843)	440.29	14.20	235.80	0.5	20	10.0
12F/12A/44/46-R (914844)	417.99	14.95	235.05	0.5	20	10.0
11A/11D-F (914841)	457.45	13.66	236.34	0.3	20	6.0
11A/11D-R (914842)	440.9	14.18	235.82	0.3	20	6.0
10A-F (906191)	433.65	14.41	235.59	0.5	20	10.0
10A-R (906192)	442.5	14.12	235.88	0.5	20	10.0
23A-F (903765)	519.51	12.03	237.97	0.5	20	10.0
23A-R (903766)	482.31	12.96	237.04	0.5	20	10.0
				4.4		88.0

bp  
160  
260  
376  
463  
628  
722

Latin America Reaction 5

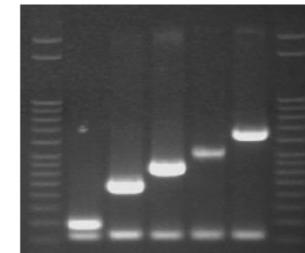


7C 12F 11A 10A 23A

Primer Info		To get 25 $\mu$ M:		Primer Concentrations ( $\mu$ M)		
Reaction 6 (Primer ID)	Original Conc. ( $\mu$ M)	Primer ( $\mu$ L)	Water ( $\mu$ L)	Conc. ( $\mu$ M)   rxn	Per X Rxns ( $\mu$ M)	Amount to add ( $\mu$ L)
CPSA-F (913424)	454.92	13.74	236.26	0.1	20	2.0
CPSA-R (913425)	484.20	12.91	237.09	0.1	20	2.0
21-F (914857)	455.75	13.71	236.29	0.2	20	4.0
21-R (914829)	432.37	14.46	235.54	0.2	20	4.0
33F/33A/37-F (807842)	469.65	13.31	236.69	0.3	20	6.0
33F/33A/37-R (807843)	462.94	13.50	236.50	0.3	20	6.0
15A/15F-F (914847)	458.05	13.64	236.36	0.3	20	6.0
15A/15F-R (914848)	472.92	13.22	236.78	0.3	20	6.0
35F/47F-F (807848)	534.78	11.69	238.31	0.3	20	6.0
35F/47F-R (807849)	397.42	15.73	234.27	0.3	20	6.0
13-F (911987)	397.93	15.71	234.29	0.4	20	8.0
13-R (911988)	458.52	13.63	236.37	0.4	20	8.0
				3.2		64.0

bp  
160  
192  
338  
434  
517  
655

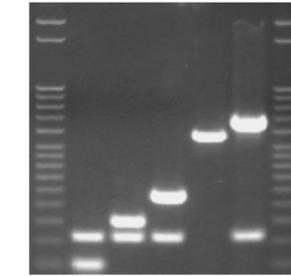
Latin America Reaction 6



21 33F 15A 35F 13

Primer Info		To get 25µM:		Primer Concentrations (µM)			bp
Reaction 7 (Primer ID)	Original Conc. (µM)	Primer (µL)	Water (µL)	Conc. (µM)   rxn	Per X Rxns (µM)	Amount to add (µL)	
39-F (911999)	416.04	15.02	234.98	0.2	20	4.0	98
39-R (912000)	428.01	14.60	235.40	0.2	20	4.0	
CPSA-F (913424)	454.92	13.74	236.26	0.1	20	2.0	160
CPSA-R (913425)	484.20	12.91	237.09	0.1	20	2.0	
23B-F (914859)	509.56	12.27	237.73	0.2	20	4.0	199
23B-R (914860)	461.18	13.55	236.45	0.2	20	4.0	
35A/35C/42-F (911997)	503.85	12.40	237.60	0.3	20	6.0	280
35A/35C/42-R (911998)	488.57	12.79	237.21	0.3	20	6.0	
38/25F/25A-F (807850)	453.44	13.78	236.22	0.3	20	6.0	574
38/25F/25A-R (804851)	412.76	15.14	234.86	0.3	20	6.0	
35B-F (914863)	446.26	14.01	235.99	0.5	20	10.0	677
35B-R (918606)	431.88	14.47	235.53	0.5	20	10.0	
				3.2		64.0	

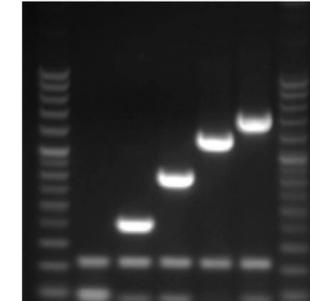
Latin America Reaction 7



39 23B 35A 38 35B

Primer Info		To get 25µM:		Primer Concentrations (µM)			bp
Reaction 8 (Primer ID)	Original Conc. (µM)	Primer (µL)	Water (µL)	Conc. (µM)   rxn	Per X Rxns (µM)	Amount to add (µL)	
24F/24A/24B-F (911995)	458.05	13.64	236.36	0.2	20	4.0	99
24F/24A/24B-R (911996)	453.69	13.78	236.22	0.2	20	4.0	
CPSA-F (913424)	454.92	13.74	236.26	0.1	20	2.0	160
CPSA-R (913425)	484.20	12.91	237.09	0.1	20	2.0	
10F/10C/33C-F (911985)	450.73	13.87	236.13	0.3	20	6.0	248
10F/10C/33C-R (911986)	448.77	13.93	236.07	0.3	20	6.0	
34-F (807844)	463.03	13.50	236.50	0.3	20	6.0	408
34-R (807845)	465.17	13.44	236.56	0.3	20	6.0	
19Fvar-F (13826)	437.65	14.28	235.72	0.2	20	4.0	585
19Fvar-R (13827)	489.89	12.76	237.24	0.2	20	4.0	
31-F (906193)	449.31	13.91	236.09	0.5	20	10.0	701
31-R (906194)	445.43	14.03	235.97	0.5	20	10.0	
				3.2		64.0	

Latin America Reaction 8



24 10F 34 19Fv 31