



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**PCR MÚLTIPLE PARA LA SEROTIPIFICACIÓN DE
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE EN NIÑOS Y MADRES DE
COMUNIDADES INDÍGENAS WARAO DEL ESTADO DELTA
AMACURO, VENEZUELA**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por el bachiller **Rosneld Alfonzo Rivero Díaz** como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutores: Msc. Ma. Carolina Sisco
Dra. Guillermina Alonso

Caracas, Venezuela

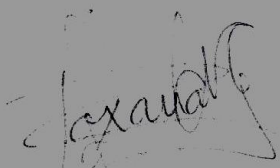
Mayo - 2014

PÁGINA DE APROBACIÓN DEL JURADO

DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DEL Br. ROSNELD A. RIVERO D.

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del Br. Rosneld A. Rivero D. C.I.V- 19960551, titulado "**PCR MÚLTIPLE PARA LA SEROTIPIFICACIÓN DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* EN NIÑOS Y MADRES DE COMUNIDADES INDÍGENAS WARAO DEL ESTADO DELTA AMACURO, VENEZUELA**", para optar al título de Licenciado en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

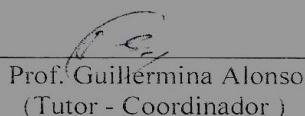
Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 07 días del mes de Mayo del año 2014, dejando constar que la Prof. Guillermina Alonso actuó como coordinadora del jurado examinador.



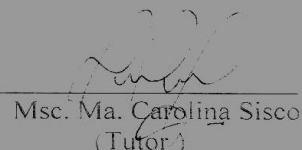
Prof. Roxana Gajardo



Lic. Keyla Gómez Castellanos



Prof. Guillermina Alonso
(Tutor - Coordinador)



Msc. Ma. Carolina Sisco
(Tutor)

DEDICATORIA

A mis Hermanos.

Por recordarme siempre, que con esfuerzo y dedicación todo se puede,
se superan dificultades, se vencen obstáculos y se construye la vida.

Gracias por Apoyarme!



AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo de felicidad.

A mi familia y amigos, por el amor y el apoyo en cada momento.

A mis compañeros de trabajo del Laboratorio de Tuberculosis, del Instituto de Biomedicina, especialmente a mi jefe el Dr. Jacobus de Waard y a la Lic. Keyla Gómez por sus enseñanzas.

A los estudiantes del 5to año de medicina, de la escuela José María Vargas de la UCV, a la Dra. Lily Verhagen y a la Lic. Ismar Rivera-Olivero por colaborar en la toma muestra de los hisopados nasofaríngeos.

A mis tutoras Msc. María Carolina Sisco y a la Dra. Guillermina Alonso, por haber creído en mí, haberme tenido la paciencia necesaria y por motivarme a seguir adelante en los momentos de desesperación.

RESUMEN

En Latinoamérica, los grupos indígenas se han identificado como una población con altas tasas de portación nasofaríngea por *Streptococcus pneumoniae*, en consecuencia, presentan riesgo elevado de padecer enfermedad neumocócica invasiva. En el presente estudio se evaluó el estado de portador nasofaríngeo y la distribución de los serotipos de *S. pneumoniae* en madres e hijos de la población indígena Warao del Estado Delta Amacuro, Venezuela; en el marco de un estudio de vacunación con la vacuna anti-neumocócica conjugada 13 valente (PCV-13), en la fase pre-vacunación. Para ayudar en la toma de decisiones y conocer la cobertura global teórica de la PCV-13, nos propusimos conocer los serotipos circulantes de *S. pneumoniae* en la población Warao en el año 2012. Se obtuvieron 984 hisopados nasofaríngeos, tomados de 308 madres y 676 niños, pertenecientes a 9 comunidades indígenas Warao. Se procedió a realizar su análisis microbiológico, aplicando estudios bacteriológicos convencionales y los aislados obtenidos fueron serotipificados por PCR múltiple. El estado de portador en los integrantes de esta etnia fue 46,04% (n=453); con los serogrupos/serotipos 6 (21,1%), 1 (11%) y 14 (8,6%) como principales colonizadores de la nasofaringe. El análisis de los datos obtenidos, tomando en cuenta la distribución de los distintos serogrupos/serotipos en madres y niños Warao, permite hacer un cálculo teórico sobre la cobertura de la vacuna PCV-13, que cubre los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A/B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 19A y 23F; teniendo una cobertura del 59,4% en la población indígena Warao en general (madres e hijos). La presencia de bacterias patógenas a nivel nasofaríngeo en la población Warao representa un riesgo para el desarrollo de infecciones severas del tracto respiratorio, la cual puede reducirse por medio de la vacunación. Desde 1999 Venezuela participa en el proyecto de Sistema de Redes de Vigilancia de los Agentes Responsables de Neumonías y Meningitis Bacterianas (SIREVA). A partir de esta fecha se inició la vigilancia de los tipos capsulares de *S. pneumoniae* causantes de enfermedad neumocócica invasiva.

ÍNDICE GENERAL

PÁGINA DE APROVACIÓN DEL JURADO	2
DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
ÍNDICE GENERAL	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	9
ABREVIATURAS	10
INTRODUCCIÓN	11
ANTECEDENTES	23
OBJETIVOS	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35
RESULTADOS	44
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	70
BIBLIOGRAFÍA	72
ANEXOS	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen al microscopio electrónico de transmisión de un corte ultrafino de una cepa de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	12
Figura 2. Tres enfermedades producidas por <i>Streptococcus pneumoniae</i>	13
Figura 3. Cobertura mundial de la vacuna antineumocócica conjugada heptavalente. ..	18
Figura 4. Organización genética del Locus <i>cps</i> de <i>S. pneumoniae</i>	20
Figura 5. Unidades repetitivas de los polisacáridos capsulares de los serotipos 6A, 6B y 6C junto con la organización de los respectivos clusters capsulares de <i>S. pneumoniae</i>	21
Figura 6. Reacción de Quellung	26
Figura 7. Esquema de trabajo propuesto por Pai y colaboradores, para la serotipificación de aislados de <i>S. pneumoniae</i> y su PCR múltiple estandarizada.	27
Figura 8. PCR múltiple de un solo paso, estandarizada por Coskún y colaboradores.	29
Figura 9. Estado Delta Amacuro. Visualización de las distintas comunidades pertenecientes a la etnia Warao para el estudio de vacunación.	34
Figura 10. Toma de muestra de un hisopado nasofaríngeo	35
Figura 11. Prueba de susceptibilidad a la optoquina para la identificación de <i>S. pneumoniae</i>	37
Figura 12. Estado de portación nasofaríngea por <i>S. pneumoniae</i> en la etnia Warao.	43
Figura 13. Frecuencia de serogrupos/serotipos de <i>S. pneumoniae</i> en la población Warao.	44
Figura 14. PCR Múltiple. Reacción 1	46

Figura 15. Porcentaje de colonización por <i>S. pneumoniae</i> en niños Warao, separados por grupo etario.	47
Figura 16. Distribución de los principales serogrupos/serotipos de <i>S. pneumoniae</i> en niños pertenecientes a comunidades indígenas Warao, por grupo etario.	48
Figura 17. Distribución de serogrupos/serotipos en madres pertenecientes a la etnia Warao.	49
Figura 18. Frecuencia de serogrupos/serotipos de <i>S. pneumoniae</i> en madres y niños Warao.	50
Figura 19. Colonización de la nasofaringe por <i>S. pneumoniae</i> en comunidades pertenecientes a la etnia Warao.	51
Figura 20. Cobertura teórica de la PCV-13 contra <i>S. pneumoniae</i> en la población Warao (madres e hijos).	55
Figura 21. PCR Múltiple. Reacción 2.	57
Figura 22. Distribución de serogrupos/serotipos de <i>S. pneumoniae</i> en niños durante los años 2004, 2008 y 2012.	62
Figura 23. Cobertura teórica alcanzada por la PCV-13, en los años 2004, 2008 y 2012.	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cebador para el gen <i>CpsA</i> , control positivo interno	39
Tabla 2. Cebadores empleados en la PCR múltiple para la detección de los serogrupos/ serotipos de <i>S. pneumoniae</i>	40
Tabla 3. Frecuencia de serogrupos/serotipos de <i>S. pneumoniae</i> en niños y madres pertenecientes a 9 comunidades Indígenas Warao	51
Tabla 4. Asociación entre serogrupos/serotipos de <i>S. pneumoniae</i>	54
Tabla 5. Secuencia de cebadores empleados en la PCR múltiple para la serotipificación de <i>S. pneumoniae</i>	80
Tabla 6. Resultados arrojados por el programa Minitab® 16 de Minitab Inc; una vez realizada la prueba de Chi-Cuadrado	84

ABREVIATURAS

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
α	Alfa
<i>cps</i>	Capsular polysaccharide synthesis Síntesis de la cápsula polisacáridica
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatos
CO ₂	Dióxido de carbono
°C	Grados centígrados
STGG	Skim milk-tryptone-glucose-glycerin Leche descremada- tripticasa de soya-glucosa-glicerol
μ L	Microlitros
μ m	Micrómetros
μ M	Micromolar
mM	Milimolar
mm	milímetros
M	Molar
NanA-B	Neuraminidasa
NT	No tipables, por nuestra PCR múltiple
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
SIREVA	Sistema de Redes de Vigilancia de los Agentes Responsables de Neumonías y Meningitis Bacterianas
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
TBE	Tris, borato y EDTA
TE	Tris HCl-EDTA

INTRODUCCIÓN

El pueblo Warao es la segunda tribu indígena más numerosa de Venezuela, después de los Wayúu (Hernández, 2009). Según información aportada por el último censo nacional de población y vivienda en el año 2011, la población Warao alcanzó aproximadamente la cantidad de 507.582 miembros, los territorios habitados por este grupo étnico se encuentran prevalentemente en el Delta del Orinoco. Suelen vivir en pequeñas comunidades en las que el contacto cercano y el limitado acceso a los sistemas de salud facilitan la diseminación de enfermedades, entre ellas infecciones por parásitos, tuberculosis e infecciones respiratorias agudas.

El tracto respiratorio superior es el nicho ecológico para muchas especies bacterianas tales como *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* y otros estreptococos α -hemolíticos (González y col., 2010). De este grupo de patógenos, *S. pneumoniae* es la causa más frecuente de infecciones respiratorias en países desarrollados y en vía de desarrollo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que las enfermedades neumocócicas causan cerca de 1,8 millones de muertes cada año, de las cuales 800.000 ocurren en niños menores de cinco años (Hsieh y col., 2008). Cabe destacar que la mortalidad a causa de *S. pneumoniae*, es mayor a la originada por cualquier otra bacteria patógena (Hsieh y col., 2008; González y col., 2010).

Streptococcus pneumoniae, comúnmente conocido como neumococo, fue identificado por primera vez por Sternberg en 1880 mediante la inoculación de conejos con su propia saliva (Sternberg, 1881). En 1884, Gram desarrolló la tinción que lleva su

nombre, con el objetivo de diferenciar bacterias y facilitar la visualización del neumococo en el tejido pulmonar (Gram, 1884). Ese mismo año, este microorganismo fue denominado *Micrococcus pneumoniae* (Klein, 1884), más tarde *Diplococcus pneumoniae* (Weichselbaum, 1886) y, finalmente, *Streptococcus pneumoniae* (Chester, 1901). No obstante, debe hacerse notar que esta última denominación no fue aceptada oficialmente hasta 1980 (Skerman y col., 1980).

Sus características de tinción con la técnica de Gram lo clasifican como una bacteria Gram positiva, de 1,2 a 1,8 μm de longitud, que presenta una forma oval con extremo distal lanceolado, generalmente, formando cadenas cortas o en parejas (diplococos). Es inmóvil, no forma endosporas y cuando se cultiva en placas de agar sangre en condiciones de anaerobiosis presenta una marcada α -hemólisis producto de la acción de la neumolisina que metaboliza la hemoglobina hasta un pigmento verdoso, debido a la producción de peróxido de hidrógeno, lo que permite clasificarlo dentro de los estreptococos α -hemolíticos (Barnard y Stinson, 1996; Brzin, 1969; 2008; Donkor, 2013).

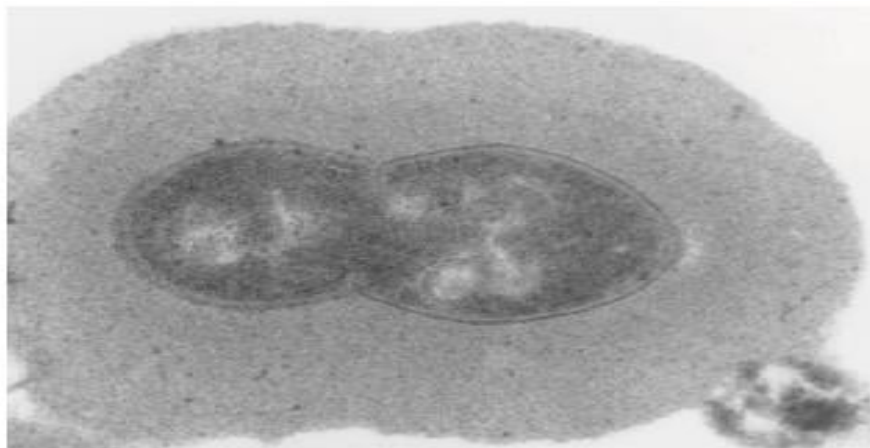


Figura 1. Imagen al microscopio electrónico de transmisión de un corte ultrafino de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* mostrando la cápsula polisacáridica que rodea a la célula. Tomado de: Kim y col., 1999.

S pneumoniae es capaz de adherirse y colonizar la nasofaringe, y una vez que esto ocurre, puede replicarse localmente o diseminarse por contigüidad a senos paranasales, trompa de eustaquio, bronquios y alvéolos, provocando neumonía, sinusitis, otitis media y bronquitis; o puede invadir el torrente sanguíneo o linfático, para causar meningitis, peritonitis, artritis séptica o endocarditis. Algunas de estas patologías se presentan en la figura 2.



Figura 2. Tres enfermedades producidas por *Streptococcus pneumoniae*. La pulmonía (izquierda) se produce cuando el neumococo desciende de las vías respiratorias superiores a los pulmones. La meningitis (centro) es una enfermedad invasiva en la que neumococo se aloja en una zona del cuerpo donde normalmente no hay bacterias. En la otitis media (derecha), la bacteria pasa de las fosas nasales o de la faringe al oído. Tomado de: <http://www.madrimasd.org/blogs/microbiologia/2008/06/23/95314>. (Consulta 01 de junio de 2013).

La posibilidad de ocurrir cualquiera de estos eventos lo determina la compleja interrelación germen/hospedero. Entre los factores que dependen del hospedero, se encuentran: la competencia inmune, la integridad de las barreras de resistencia y el estado de funcionalidad de su sistema inmune. Entre los que dependen del microorganismo están: la presencia de determinados factores de virulencia que ayudan a evadir los sistemas de

protección del individuo y desencadenan una potente respuesta inflamatoria, al interactuar con determinados receptores de patógenos en las células del hospedero.

Se pueden distinguir principalmente tres etapas en el proceso de patogénesis: adhesión/colonización, invasión, inflamación y shock (Nelson y col., 2007).

En la nasofaringe, *S. pneumoniae* se enfrenta a las barreras naturales de la mucosa respiratoria del hospedador, al sistema inmune y a otros patógenos que colonizan el mismo hábitat. Existen dos primeras barreras que pueden impedir que el neumococo colonice la mucosa respiratoria: el moco y la lisozima (Coonrod y col., 1991; Nelson y col., 2007; Shimada y col., 2008). Para superar estas barreras, *S. pneumoniae* ha desarrollado varias estrategias. La evasión del moco tiene lugar mediante tres vías. En primer lugar, el polisacárido capsular no se une a los residuos de ácido siálico presentes en la mucosa por su carga negativa, disminuyendo así la probabilidad de atrapamiento (Nelson y col., 2007). En segundo lugar, *S. pneumoniae* tiene varias exoglicosidasas (NanA y NanB) que degradan los glicoconjugados del moco, disminuyendo así la viscosidad del mismo y evitando el atrapamiento de la bacteria (Tong y col., 2001; King y col., 2006; Burnaugh y col., 2008). En tercer lugar, la neumolisina Ply, una citolisina tiol-activada con afinidad por el colesterol, produce poros en las membranas celulares, disminuyendo los movimientos ciliares de las células epiteliales y permitiendo que *S. pneumoniae* se adhiera a las mismas con más facilidad sin ser eliminado (Feldman y col., 1990, 2002).

En la mayoría de las bacterias la adhesión se lleva a cabo a través de proteínas de superficie que se unen a carbohidratos del hospedador pero, de manera análoga, el microorganismo también puede interactuar con otras proteínas tanto del plasma como de la matriz extracelular eucariótica (Kadioglu y col., 2008). Se han descrito seis exoglicosidasas neumocócicas, la función de estas proteínas es, actuando aparentemente de manera coordinada, poner de manifiesto receptores glicosilados que facilitarían la adhesión del patógeno a las células del hospedador (King y col., 2006; Burnaugh y col., 2008; Jeong y col., 2009; King, 2010).

La migración paracelular es una importante estrategia utilizada por *S. pneumoniae* en la invasión, donde las bacterias atraviesan capas de células epiteliales o endoteliales (Pancholi y col., 2003). El plasminógeno, junto con las proteínas del neumococo que unen plasminógeno tiene un papel central en este proceso. En primer lugar, el plasminógeno, una proenzima, incrementa la adhesión del neumococo a la superficie epitelial. En segundo lugar, la activación de plasminógeno a plasmina, una serín proteasa de amplia actividad, permite a ésta unirse a las proteínas implicadas en las uniones estrechas intercelulares y degradar la cadherina del endotelio vascular (Attali y col., 2008), un componente esencial de tales uniones (Dejana y col., 2008). La ruptura de las uniones estrechas, puede permitir el acceso a *S. pneumoniae* a la membrana basal y, así, producir una posterior enfermedad invasiva.

La liberación de productos bacterianos, muchos de ellos altamente inmunogénicos, puede conducir a una respuesta inflamatoria descontrolada en el hospedador denominada

“tormenta de citoquinas” (*cytokine storm*). De hecho, la mayor parte del daño tisular y orgánico que tienen lugar durante la infección neumocócica, tanto en la neumonía como en la meningitis se produce como consecuencia de un estado inflamatorio excesivo, siendo esta situación la que ocasiona el shock que tiene lugar en muchos casos de infección causada por *S. pneumoniae* (Kim y col., 1999; Hanquet y col., 2010).

Al igual que muchas otras especies patógenas, en *S. pneumoniae* la cápsula polisacáridica es esencial para la virulencia (Fang, 2005). La composición química de la cápsula permite la distinción de 93 serotipos distintos con base en los azúcares y enlaces químicos que conforman las unidades repetitivas de los polisacáridos, los cuales pueden ser agrupados en 46 serogrupos que comprenden serotipos inmunológicamente relacionados (Mitchell, 2010; Noda y col., 2002).

Un serotipo es la unidad taxonómica básica y está representado por una cepa de referencia. Es un microorganismo infeccioso clasificado según los antígenos que presenta en la superficie celular o en la composición de la cápsula polisacáridica (Noda y col., 2002). Los serotipos permiten diferenciar organismos a nivel de sub-especie; algo de gran importancia en epidemiología. Adicionalmente los serotipos pueden ser agrupados según sus principales afinidades antigénicas en serogrupos.

Los 93 serotipos capsulares actuales de *S. pneumoniae* se agrupan en 46 serogrupos numerados del 1 al 48 (los números 26 y 30 no se utilizan). Algunos serogrupos como el 1, 2 y 3 incluyen un único serotipo mientras que otros, como el serogrupo 19, pueden contener hasta cuatro. Normalmente, el primer serotipo descrito en un serogrupo con varios serotipos se identifica con la letra F (por *first*) (Lund, 1970) y los siguientes con las letras A, B, C,

etc. Existen, no obstante, dos excepciones: el serogrupo 6 incluye los serotipos 6A, 6B y 6C; y en el serogrupo 9, las letras de los tres primeros serotipos descritos tienen relación con personajes históricos (L por Lederle, N por Neufeld y V por Valdemar) (Henrichsen, 1995).

Se han realizado muchos ensayos controlados, aleatorios y de gran escala, sobre las vacunas antineumocócicas. Entre estos se encuentran ensayos con la vacuna polisacárida 23-valente, la primera vacuna antineumocócica de polisacáridos capsulares no conjugados. Esta última es una mezcla de polisacáridos de *S. pneumoniae* preparados a partir de los 23 serotipos más frecuentes en enfermedad neumocócica invasiva: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F, y 33 (García y col., 2006). Esta vacuna tiene una eficacia del 60 al 70% en la prevención de la bacteriemia neumocócica en adultos, pero no es eficiente para niños menores a los 2 años. (SA-Leão y col., 2009). Sólo se recomienda para grupos selectos mayores de dos años en riesgo de adquirir enfermedad neumocócica invasiva, entre ellos adultos mayores a los 65 años.

En respuesta a esta serie de limitaciones, se han desarrollado una nueva generación de vacunas antineumocócicas conocidas como vacunas conjugadas. Las mismas conjugan individualmente el polisacárido capsular de cada serotipo de *S. pneumoniae* con una proteína transportadora, dando lugar a una vacuna combinada.

En este sentido, la vacuna antineumocócica conjugada 7-valente (PCV-7), que cubre los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, que causan con mayor frecuencia enfermedad neumocócica invasiva en niños y que presentan una mayor incidencia de resistencia a los

antibióticos de uso frecuente, fue autorizada en el año 2000 (Coskún y col., 2012). La vacuna no solo protege contra este tipo de infecciones sino que se ha demostrado que disminuye la colonización nasofaríngea de los niños que han recibido la vacuna produciendo una reducción en el número de infecciones por esta bacteria, en poblaciones de infantes y adultos, incluyendo personas mayores a los 65 años (efecto rebaño).

La vacuna antineumocócica conjugada heptavalente dio lugar a una disminución significativa de las enfermedades invasivas, causadas por estos serotipos, debido a que aumenta la protección en niños menores de dos años e induce inmunidad en las mucosas, disminuyendo la colonización por *S. pneumoniae* (Whitney y col., 2003). La cobertura mundial de la PCV-7, se resume en la figura 3. Es de hacer notar que la incidencia de los serotipos no incluidos en la vacuna se incrementó en pacientes con enfermedad invasiva y portadores al mismo tiempo (Hanquet y col., 2010).

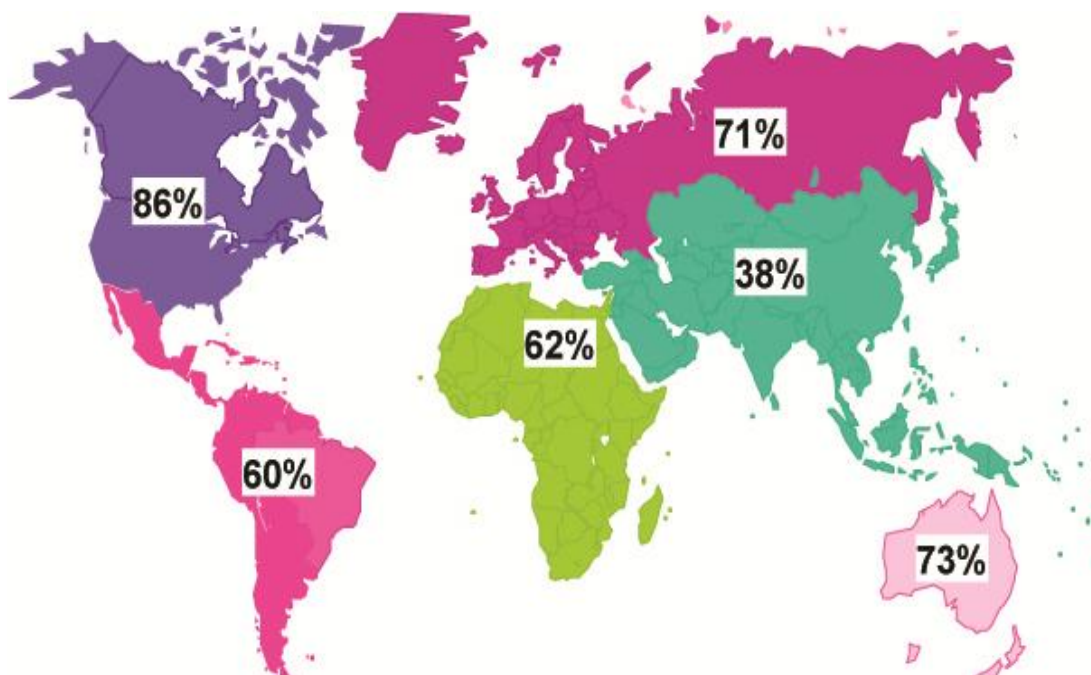


Figura 3. Cobertura mundial de la vacuna antineumocócica conjugada heptavalente. La vacuna tiene una cobertura del 86% de los serogrupos/ serotipos que circulan en Estados Unidos y Canadá. La

cobertura en Oceanía alcanzó el 73%. En Europa, la vacuna solo cubre el 71% de los serotipos frecuentes (en el caso de España, el 68%). Además, en regiones en las que la mortalidad infantil debida a *Streptococcus pneumoniae* es mayor, la cobertura estimada de la vacuna es aún inferior, siendo 62% en África, 60% en Latinoamérica y 38% en Asia.

Tomado de: <http://www.madrimasd.org/blogs/microbiologia/2008/06/23/95314> (Consulta 01 de junio 2013).

En contraste, en algunas poblaciones como las tribus indígenas americanas la eficacia de la vacuna es del 50%, por lo que ahora se están desarrollando nuevas vacunas para esas regiones donde se espera una mayor protección (Canción y col., 2013).

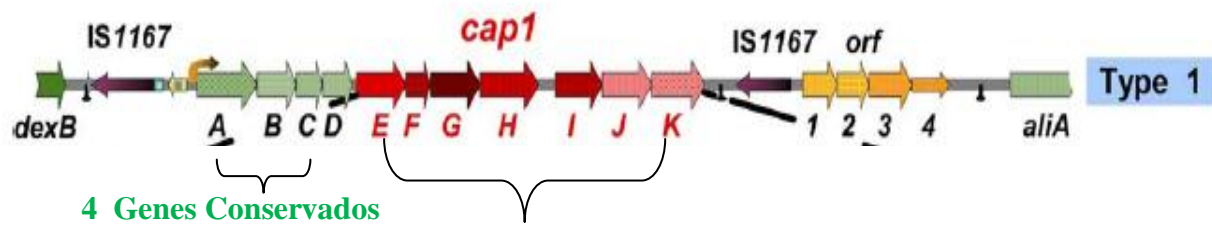
Existen variaciones en la prevalencia de cada serotipo en las distintas áreas geográficas y cambios a lo largo del tiempo en la circulación de los mismos. Este hecho condicionará variaciones en la efectividad de una misma vacuna con un número limitado de serotipos en regiones diferentes y en períodos distintos, por lo tanto, es evidente la necesidad de vacunas que ofrezcan cobertura a un número mayor de serotipos.

La vacuna antineumocócica conjugada 13-valente (PCV-13) contiene seis serotipos adicionales (1, 3, 5, 6A, 7F y 19A), y está reemplazando a la PCV-7 en varios países (Anexo 1). El serotipo 1 fue incluido debido a que representa más del 10% de todos los casos de enfermedad invasiva en niños menores de 5 años, además en conjunto con el serotipo 5 ha sido señalado como serotipo asociado a brotes de enfermedad en niños de países sub-desarrollados. El serotipo 19A ha sido también señalado como un importante agente causal de enfermedad invasiva (bacteriemia, meningitis y otitis media) en los últimos años, al igual que el serotipo 3. El serotipo 7F de *S. pneumoniae* está asociado en Europa a una alta mortalidad. La inclusión del serotipo 6A tiene un impacto mundial, debido a que se ha mantenido como el principal colonizador, además es uno de los más virulentos en adultos y es el principal causante de enfermedad invasiva en niños (Henriques y col., 2000).

Es importante realizar estudios donde se determinen los serotipos circulantes en una población, por medio de análisis que permitan estimar la cobertura teórica alcanzada de las vacunas actuales, predecir el resultado de su aplicación y desarrollar vacunas más eficaces en el futuro (Coskún y col., 2012). Dichos análisis se pueden realizar mediante los polisacáridos capsulares, estos pueden ser detectados y diferenciados en el laboratorio, a través de métodos inmunológicos usando antisueros específicos mediante la reacción de Quellung, descrita originalmente por Neufeld en 1902.

Debido a la gran diversidad de serotipos descritos hasta la fecha y el tiempo que se llevaría diferenciarlos en su totalidad, aunado con el alto costo que implica el uso de una gran cantidad de antisueros para detectarlos, resulta difícil la aplicación de esta técnica en muchos laboratorios, por lo que en los últimos años ha sido sustituida por métodos moleculares.

El locus que contiene los genes requeridos para la síntesis de la cápsula se denomina Locus *cps* (capsular polysaccharide synthesis, por sus siglas en inglés); por lo tanto codifica las enzimas necesarias para la síntesis del polisacárido, la proteína flipasa para el transporte a través de la membrana y la polimerasa para la formación del polisacárido que finalmente es ligado a la pared celular. La organización del Locus *Cps* se presenta a continuación.



Genes Específicos de cada Serotipo

Figura 4. Organización genética del Locus *cps* de *S. pneumoniae*. Los primeros cuatro genes *cpsA*, *cpsB*, *cpsC* y *cpsD* son conservados. A partir de *cpsE*, los genes comienzan a ser específicos de serotipo, es decir, genes específicos para la construcción del polisacárido capsular del serotipo indicado, en este caso serotipo 1. Tomado y adaptado de: Sisco, 2010.

El Locus *cps* exhibe una organización conservada, donde las secuencias específicas para cada serotipo están flanqueadas por secuencias comunes a todos los serotipos. (Mitchell, 2010; Noda y col., 2002; Sisco, 2010). Por ejemplo, se ha demostrado mediante estudios bioquímicos que los polisacáridos capsulares de los serotipos 6A y 6B son polímeros lineales con una unidad repetida que contiene cuatro monosacáridos: ramnosa, ribitol-fosfato, galactosa y glucosa (Park y col., 2007). La diferencia entre ambos radica en un enlace ramnosa $-(\alpha 1,3)$ -ribitol en el serotipo 6A y en un enlace ramnosa $-(\alpha 1,4)$ -ribitol en el serotipo 6B, lo cual se relaciona con un polimorfismo de un solo nucleótido en el gen de la ramnosil transferasa (*wciP*). La estructura de la unidad repetitiva del serotipo 6C también ha sido reportada y es más similar a la del serotipo 6A, presentando el enlace ramnosa $-(\alpha 1,3)$ -ribitol. Sin embargo es su configuración polisacáridica ocurre la sustitución de un azúcar (galactosa en 6A y 6B; glucosa en 6C) (Mavroidi y col., 2007).

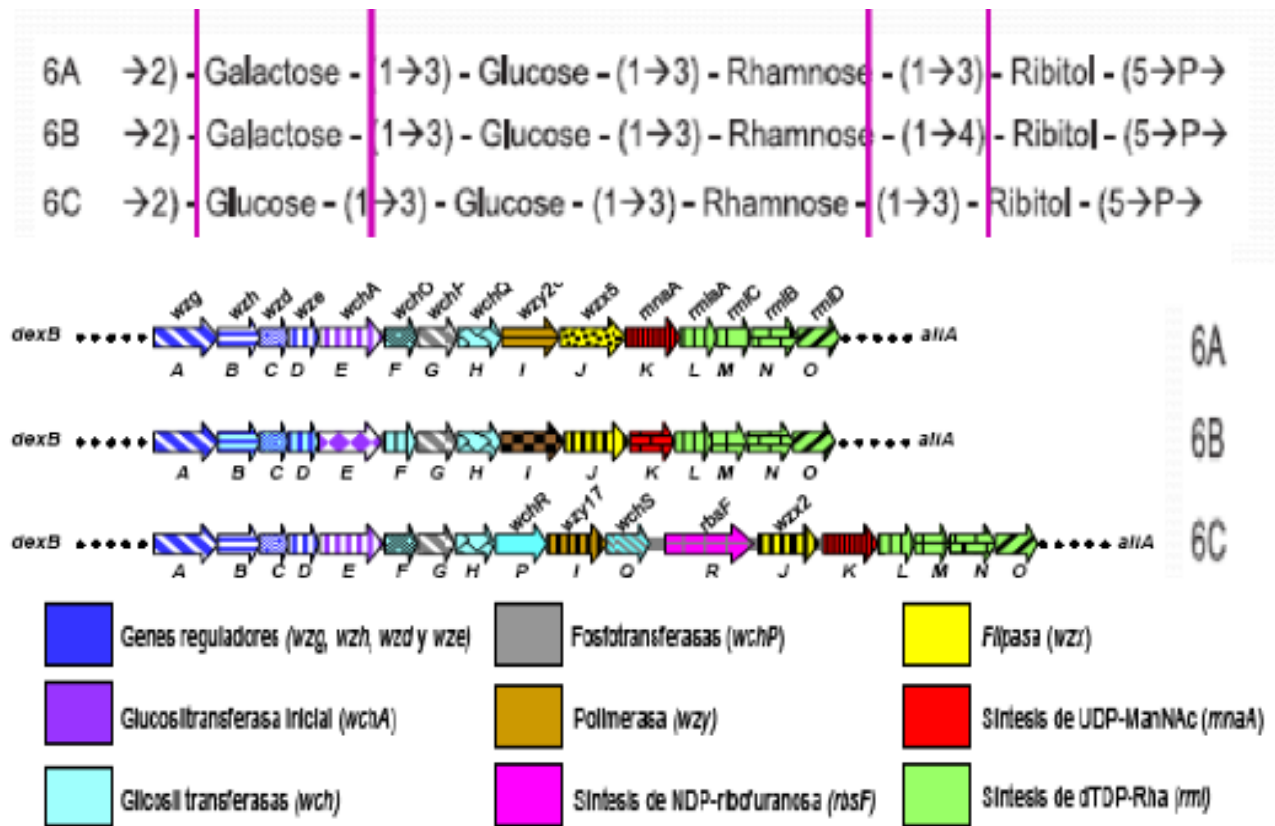


Figura 5. Unidades repetitivas de los cps serotipos 6A, 6B y 6C junto con la organización de los respectivos clusters capsulares de *S. pneumoniae*. En la parte superior se comparan las estructuras de los serotipos presentes en el serogrupo 6; las diferencias entre los polisacáridos se muestra enmarcado. Nótese que la diferencia entre los serotipos 6A o 6B y 6C radica en la existencia de un azúcar (Galactosa o Glucosa) respectivamente y la diferencia entre los serotipos 6A o 6C y 6B es en base a un enlace (α -1,3 o α -1,4). En la parte inferior se detallan los genes capsulares que se encuentran situados entre los genes *dexB* y *aliA* en el genoma de *S. pneumoniae*. Los genes que poseen más del 90% de identidad se representan por flechas del mismo color y sombreado. Para nombrar los genes se ha utilizado la nomenclatura clásica de Bernheimer y Wermundsen, 1972 .Modificado de trabajos previos de Bentley y col., 2006.

Se han reportado altas tasas de infección respiratoria en poblaciones indígenas de todo el mundo, principalmente en Venezuela, por lo que se hace necesario realizar estudios para determinar los serotipos de *S. pneumoniae* circulantes en la población, con apoyo de técnicas moleculares, como lo es la PCR múltiple. Estos trabajos permitirán inferir el resultado de la introducción de vacunas neumocócicas conjugadas, que tendrían un impacto positivo para la etnia Warao, debido a que permitirá disminuir la incidencia de enfermedad neumocócica invasiva en estas comunidades.

ANTECEDENTES

Se estima que todos los niños en algún momento de su etapa preescolar han sido portadores de *S. pneumoniae* en al menos una ocasión, siendo los seis meses de vida la edad media de la primera colonización por *S. pneumoniae*. Teniendo en cuenta que la mayoría de los niños sanos han sido portadores de este microorganismo, muy pocos finalmente desarrollan enfermedad invasiva. Sin embargo, aunque la mayoría de los niños no van a padecer enfermedad, van a ser los principales reservorios y transmisores de la bacteria en el hogar y la comunidad (Vera, 2010).

S. pneumoniae es parte de la flora comensal del tracto respiratorio superior en conjunto con *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* y otros estreptococos α -hemolíticos, en donde la colonización nasofaríngea es un proceso dinámico por el recambio constante de especies. Existe un equilibrio entre la flora autóctona y los gérmenes que transitoriamente invaden la nasofaringe, por ejemplo: *S. pneumoniae* compete con *Streptococcus viridans* o *Staphylococcus aureus*, pero tiene una relación positiva con *Neisseria meningitidis*.

Además de estas interacciones ecológicas, existen factores del entorno determinantes de las modificaciones de la flora nasofaríngea. Estos factores aumentan la posibilidad de portar *S. pneumoniae* en la infancia, y van desde el hacinamiento, las condiciones socioeconómicas, el tabaquismo, la asistencia o no a guarderías y centros escolares, dormir en posición decúbito dorsal (boca arriba) y la infección viral concomitante. Es de hacer notar, que la colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae*, así

como la enfermedad neumocócica invasiva, es más prevalente en determinadas etnias, como los indios Apache y Navajo, población nativa de Alaska, Amerindios y población aborigen australiana (Watt y col., 2007; Millar y col., 2009; Verhagen y col., 2013)

Los estudios de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* son de gran utilidad para determinar los grupos en riesgo y, al mismo tiempo, permiten conocer la distribución de los serotipos circulantes en la población y evaluar el impacto de la utilización de vacunas antineumocócicas.

Un hecho central en la epidemiología de las infecciones neumocócicas es la colonización nasofaríngea, ya que es el paso previo a la infección y representa el reservorio de la enfermedad. Se ha estimado que entre un 25% y un 60% de los niños menores de 4 años están colonizados. En poblaciones no vacunadas frente a *S. pneumoniae*, los serotipos que con más frecuencia colonizan la nasofaringe son el 1, 3, 6A/B, 14, 19F y 23F (Picazo y col., 2011).

En adultos, debido a que la prevalencia de colonización es menor que en niños, es difícil caracterizar el patrón de serotipos presentes de *S. pneumoniae*. Sin embargo, en un estudio llevado a cabo por el Departamento de Medicina Interna de Chile, durante el 2007, se observó que los serotipos más prevalentes encontrados en la población fueron el serogrupo 6 (18%) y el serotipo 14 (15%), después en orden de importancia estuvieron los serotipos 19F (9%), 15 A (9%) y 5 (6%). Es decir, tan sólo 2 serotipos correspondieron casi a la mitad de los biotipos prevalentes en la portación en adultos: 6 y 14 (Altuzarra y col., 2007). Estos resultados coinciden con los obtenidos por el Sistema de Redes de Vigilancia

de los Agentes Responsables de Neumonías y Meningitis Bacterianas en el período 2000-2005, donde caracterizaron aislamientos invasivos de 3.406 cepas de *S. pneumoniae* en adultos de América Latina y el Caribe. Este grupo de investigadores encontró que el serotipo 14 fue el principal colonizador de la nasofaringe con 8,9% del total de aislados, seguido del serogrupo 6 con 8,5% y el serotipo 3 con 7,3% (Gabastou y col., 2008).

Se reconocen 93 serotipos de *S. pneumoniae*, en base a las diferencias de composición de la cápsula polisacáridica y se agrupan en 46 serogrupos en el sistema de nomenclatura Danés, donde al serogrupo se le asigna un número y al serotipo una letra (Noda y col., 2002; Kadioglu, 2008).

La serotipificación de los neumococos aislados de pacientes con diversos síndromes clínicos, por lo general no es necesaria. Sin embargo, en algunos estudios donde los protocolos tienen por objeto evaluar la eficacia de una vacuna y la transmisión de microorganismos será necesario seroagrupar y serotipificar los aislamientos de *S. pneumoniae*.

En un principio la reacción de Quellung era utilizada tradicionalmente para serotipificar aislados de *S. pneumoniae*. Es una reacción bioquímica y específica que usa anticuerpos polivalentes para que se unan a la cápsula de *S. pneumoniae* (von Gottberg y col., 2013); se produce cuando un anticuerpo tipo específico se une al polisacárido capsular

de *S. pneumoniae* y causa un cambio en el índice refractivo de la cápsula, cambiando el aspecto de la misma (Kadioglu, 2008).

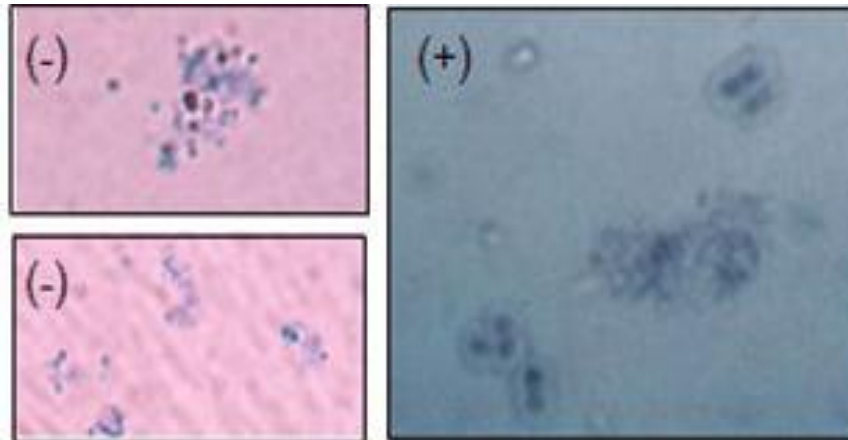


Figura 6. Reacción de Quellung. Los anticuerpos empleados reconocen los polisacáridos en la superficie de la cápsula e inducen un cambio en el índice refractivo de la capsula, que al ser visto al microscopio da la apariencia de un hinchamiento capsular (a la derecha prueba positiva, para esta reacción). El resultado debe ser observado al microscopio por un técnico entrenado. Tomado de http://www.proteomika.com/index.php?option=com_content&task=view&id=339&Itemid=331 (Consulta 06 de Junio de 2013).

Los procedimientos basados en la reacción de Quellung son procesos laboriosos y complejos, que requieren de personal especializado para una correcta interpretación del resultado, aunado con el alto costo que implica usar una gran cantidad de antisueros en esta técnica.

En consecuencia, se propone utilizar una PCR múltiple que permite la detección de 38 serotipos comunes, para ser aplicado en aislados de *S. pneumoniae* provenientes de muestras tomadas con hisopados nasofaríngeos en niños y madres, habitantes del pueblo Warao.

El desarrollo de la PCR múltiple para la serotipificación de *S. pneumoniae* fue publicado por primera vez por Lawrence y colaboradores en el año 2003 (Lawrence y col., 2003). Los investigadores aseguraron que todos los cebadores empleados tuviesen una temperatura de alineamiento similar para que ninguna reacción de amplificación se viera favorecida sobre otra, adicionalmente verificaron que los productos de amplificación obtenidos fuesen de tamaños diferentes para que pudieran ser distinguidos, tras el empleo de electroforesis en geles de agarosa.

En la investigación de Pai y colaboradores en el 2006, se presenta una PCR múltiple capaz de detectar 28 serotipos de *S. pneumoniae*, reportando discrepancias entre los resultados obtenidos por el método de PCR múltiple y la Reacción de Quellung. En estos casos, el método de PCR fue preciso debido a que el re-ensayo de las cepas por el método tradicional, demostró la presencia de errores atribuidos al personal que ejecuta la técnica, especialmente a la hora de diferenciar serotipos comprendidos dentro del mismo serogrupo, lo que fortalece el concepto que los métodos moleculares pueden proporcionar una metodología más confiable. El trabajo propuesto por estos autores se resume en la figura 7.

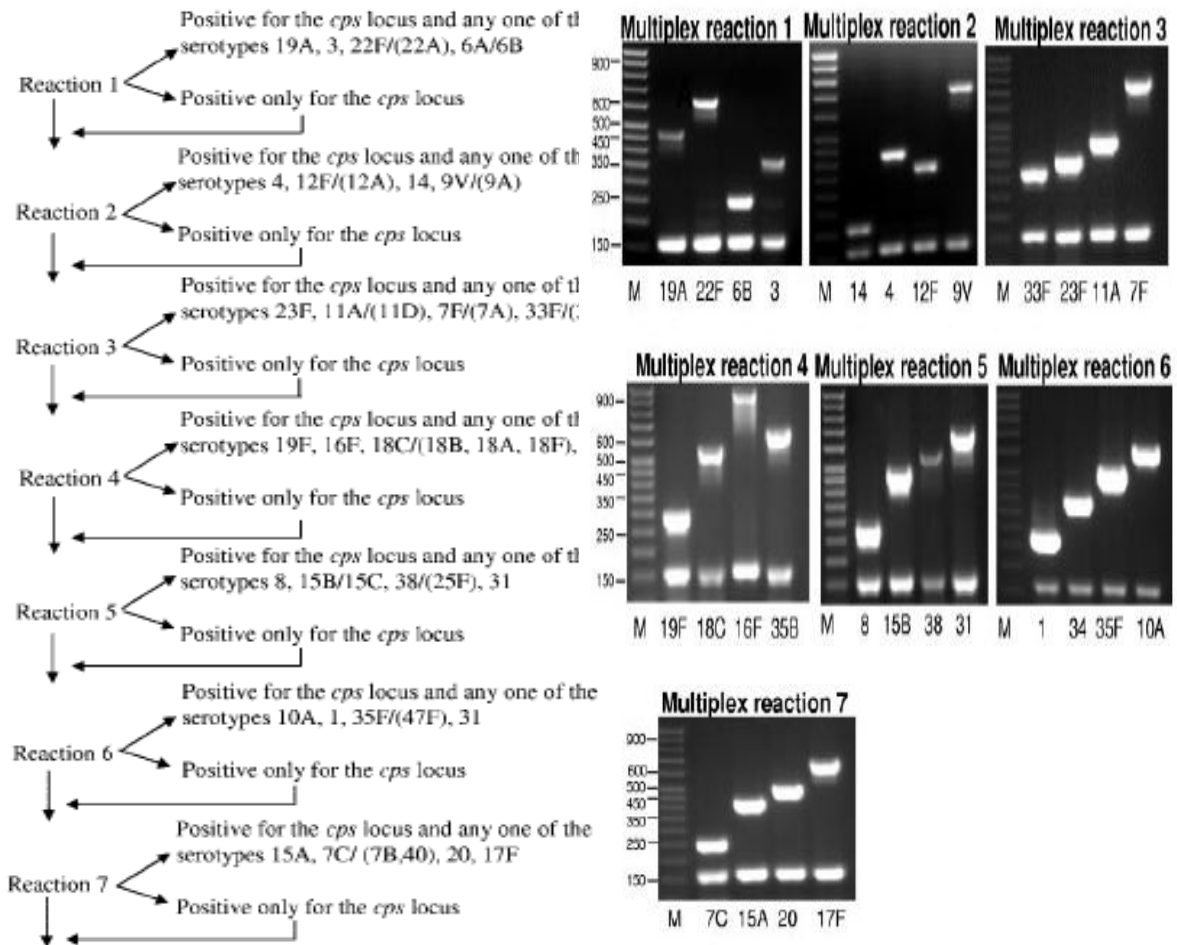


Figura 7. Esquema de trabajo propuesto por Pai y colaboradores en el año 2006, para la serotipificación de aislados de *S. pneumoniae* (a la Izquierda) y su PCR múltiple estandarizada (a la derecha). Cada reacción comprende 4 pares de cebadores destinados a identificar 4 serotipos distintos. La primera reacción detecta los serotipos 19A, 22F, 6B y 3. La segunda detecta los serotipos 14, 4, 12F y 9V. La tercera detecta los serotipos 33F, 23F, 11A y 7F. La cuarta detecta a 19F, 18C, 16F y 35B. La quinta detecta los serotipos 8, 15B, 38 y 31. La sexta los serotipos 1, 34, 35F y 10A. Por último, la séptima reacción detecta los serotipos 7C, 15A, 20 y 17F. Tomado y adaptado de Pai y col., 2006.

Si siguiendo como modelo el trabajo de Pai y colaboradores, importantes estudios fueron realizados con el fin de validar esta metodología.

En el año 2011 Jourdain y colaboradores, realizaron un ensayo de PCR múltiple para la detección específica de 30 serogrupos /serotipos de *S. pneumoniae*. Este ensayo múltiple se compone de 7 reacciones de PCR consecutivas y fue validado durante un estudio prospectivo realizado en Bélgica en el momento de adopción de la vacuna

antineumocócica conjugada 7 valente. El ensayo de PCR múltiple permitió a los investigadores la tipificación del 94% de los aislamientos de *S. pneumoniae* provenientes de niños asistentes de preescolar (n=332). El 75% de los aislamientos se tipificaron después de las 3 primeras reacciones de la PCR y los resultados fueron concordantes con la posterior identificación por la Reacción de Quellung (Jourdain y col., 2011).

En el año 2012 Coskún, y colaboradores estandarizaron una PCR múltiple para la detección de los 13 serogrupos/serotipos de *S. pneumoniae* cubiertos en la vacuna antineumocócica conjugada 13 valente (PCV-13). De los 182 aislados obtenidos, 150 fueron identificados como serotipos vacunales de la PCV-13. Los 32 aislados restantes, arrojaron resultados negativos, debido a que correspondían a *Streptococcus* β -hemolíticos. Si bien hubo una excelente correlación de los resultados obtenidos por este método a nivel de serogrupo, hubo cierta reactividad cruzada a nivel de serotipo. Los cebadores dirigidos a los serotipos 6A/B, 7F, 9V y 18C no eran completamente serotipo específico y reconocieron adicionalmente a los serotipos 1 y 3. Sin embargo, los investigadores señalan que el ensayo de PCR múltiple, de un solo paso, exhibió 100% de sensibilidad y especificidad, lo que sugiere que su utilización puede reducir significativamente el uso de antisueros por el método tradicional que requiere de reactivos costosos (Coskún y col., 2012). El producto de amplificación obtenido en este estudio se presenta en la figura 8.

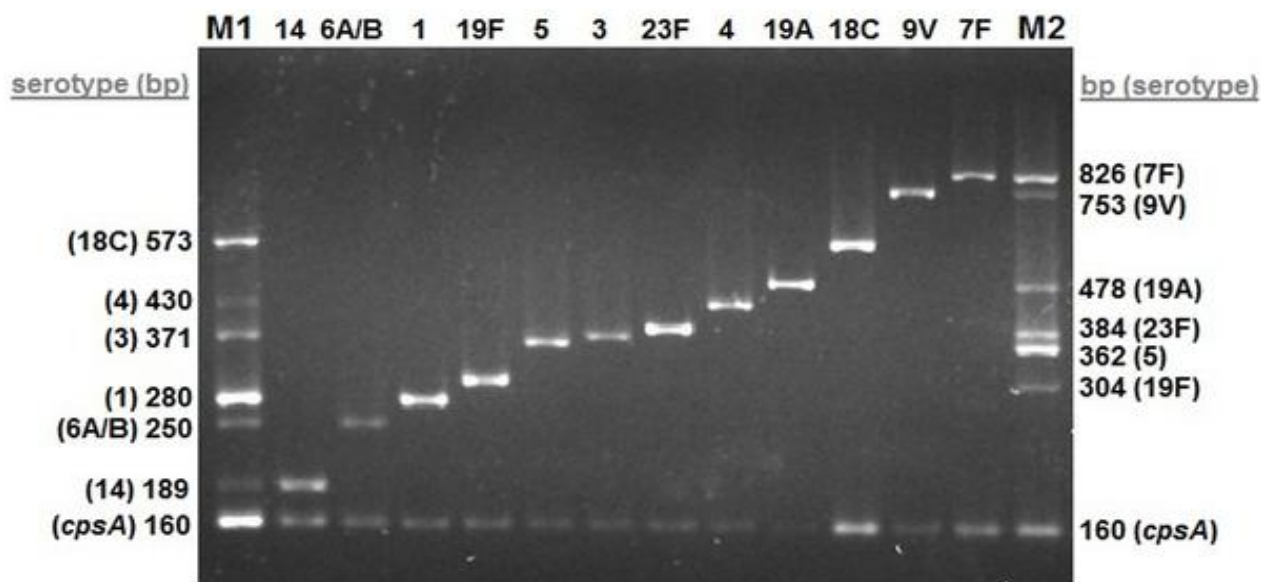


Figura 8. PCR múltiple, de un solo paso, estandarizada por Coskún y colaboradores. Se detallan los productos de amplificación de los serogrupos/ serotipos vacunales de la PCV-13 (14, 6A/B, 1, 19F, 5, 3, 23F, 4, 19A, 18C, 9V y 7F). M1&M2: corresponden a los marcadores de peso molecular y el *cpsA* al control interno positivo (producto de amplificación 160pb). Tomado de Coskún y col., 2012

García y Levine, indicaron que la distribución de los principales serotipos en las Américas ha sido estable a lo largo del tiempo, siendo el serotipo 14 el que más se aísla en la mayoría de los países que participan en el Sistema de Redes de Vigilancia de los Agentes Bacterianos Responsables de Neumonías y Meningitis (SIREVA) (García y col., 2006).

Rivera y colaboradores, en el año 2010 con su trabajo: “Estado de Portador Nasofaríngeo de *Streptococcus pneumoniae* en madres e hijos de la población indígena Panare del Estado Bolívar, Venezuela”, reportan que la tasa de colonización disminuye con el incremento de la edad, las tasas más elevadas se presentan en los niños menores de 2 años y las más bajas en adultos. Sus datos arrojan una elevada tasa de colonización, por *S. pneumoniae* lo cual conduce a desarrollar enfermedad neumocócica invasiva en el pueblo Panare (Rivera y col., 2010).

Este mismo grupo de investigadores en el año 2011 realizaron un estudio para conocer cuáles son los serogrupos/serotipos de *S. pneumoniae* circulantes en niños urbanos de Caracas-Venezuela. Los serotipos más predominantes entre los portadores fueron 6B (29%), 19A (13,8%), 23F (10%), 14 (8,3%), 6A (8,3%) y 15B / C (3,3%) y entre cepas invasoras 6B (25%), 14 (15%), y 19A, 6A, 7F, y 18C (7,5%). Es de hacer notar que los serogrupos/serotipos 1, 5, 7F y 18C, que cubren conjuntamente 30% de las cepas invasivas, representan menos del 0,7% de las cepas portadoras (Rivera y col., 2011). Sin embargo, los investigadores infieren que la introducción de vacunas antineumocócicas conjugadas en nuestra población pediátrica tendría un impacto positivo en la prevención de la enfermedad.

Todos estos reportes nacionales e internacionales, proponen que un programa de vacunación antineumocócica tiene beneficios que van más allá de la protección ofrecida a niños vacunados. Si se reduce la circulación de *S. pneumoniae* es posible disminuir la transmisión hacia y entre personas no vacunadas, y de esta forma brindar una protección indirecta. Esta inmunidad colectiva se hace evidente al observarse una reducción en la circulación de serotipos incluidos en la vacuna antineumocócica aplicada a la población.

En la población vacunada norteamericana se ha comprobado un descenso del 80% en la tasa de incidencia de enfermedad neumocócica invasiva en niños menores de 5 años, luego de la introducción de la vacuna antineumocócica conjugada 7-valente (PCV-7) (Active Bacterial Core Surveillance Report, 2008). Se observó un descenso en los serotipos vacunales del 99%, mientras que, por el contrario, se reportó un aumento en la tasa de

incidencia de enfermedad neumocócica invasiva debida al serotipo 19A (Díaz-Conradi, 2008).

En 19 países Europeos la PCV-7 se encuentra dentro del esquema de vacunación recomendado. Aunque existe una variación en la incidencia de enfermedad invasiva según el método de vigilancia, se considera que la PCV-7 en Europa ha reducido los niveles de enfermedad neumocócica a causa de los serogrupos/serotipos vacunales (Vestrheim y col., 2008). En países como Alemania e Italia se ha observado un descenso en las hospitalizaciones por neumonía y meningitis a causa de *S. pneumoniae*.

Con respecto a la PCV-13, Moraga (2009) asegura que en España la cobertura de la vacuna fue del 79% en niños menores a los 2 años, 89% en niños mayores a los 2 años y 71% en adultos, teniendo un beneficio aun mayor para la población y reduciendo drásticamente los serogrupos/serotipos invasivos en las comunidades europeas que adoptaron la vacuna. Situación similar se presentó en Costa Rica, tras la introducción de la PCV-13, donde se reportó que la cobertura alcanzada fue del 81%. Sin embargo se observó emergencia de nuevos serotipos (7C, 15B y 22F), que representaron el 19,1% del total de aislados en el año 2012 (Arguedas y col., 2012).

Con estos datos es evidente que, tanto en América, como en Europa la PCV-7 y la PCV-13 han contribuido a disminuir la enfermedad neumocócica invasiva global, así como, al desplazamiento de los serotipos causantes de enfermedad neumocócica, incluidos en estas vacunas.

Actualmente en el Laboratorio de Tuberculosis, del Instituto de Biomedicina se está llevando a cabo un estudio encabezado por el Dr. Jacobus H. de Waard, para determinar los serotipos circulantes de *S. pneumoniae* en la etnia Warao localizada en el estado Delta Amacuro, Venezuela. A las muestras obtenidas de hisopados nasofaríngeos se le aplicaron técnicas bacteriológicas convencionales, incluyendo la prueba de susceptibilidad a la optoquina (Anexo 2).

Tradicionalmente, la identificación de *S. pneumoniae* es realizada con base en la susceptibilidad a la optoquina. Sin embargo, la emergencia de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a la optoquina (atípicas) dificulta su identificación. Kacou y colaboradores, en el año 2010, en su estudio sobre la resistencia a optoquina por *S. pneumoniae*, reporta que la misma se debe a mutaciones, los autores informan que existen mutaciones puntuales en los genes que codifican subunidades de la ATPasa, los cuales confieren resistencia a la optoquina sobre *S. pneumoniae* (Kacou y col., 2010). También puede haber una asociación entre el uso de los fármacos antipalúdicos y la evolución de la resistencia optoquina; por lo tanto la vigilancia de cepas resistentes a optoquina debe continuar y así discutir los métodos empleados para certificar el diagnóstico para este agente etiológico (Cortes y col., 2008).

La presente investigación tiene como principal objetivo realizar un estudio sobre la tasa de colonización nasofaríngea por *Streptococcus pneumoniae* en comunidades indígenas Warao del Estado Delta Amacuro y determinar los serotipos presentes en la población en el marco de un estudio de pre-vacunación, por ser ésta una población geográficamente aislada que presenta dificultad al acceso de atención médica y que demuestra alta incidencia de infecciones respiratorias agudas causadas por *S. pneumoniae*.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- ✓ Determinar los serotipos circulantes de *Streptococcus pneumoniae* aislados de niños de 0 a 12 años y sus madres, pertenecientes a comunidades indígenas Warao del estado Delta Amacuro, Venezuela.

Objetivos Específicos:

- ✓ Determinar la prevalencia de colonización nasofaríngea por *Streptococcus pneumoniae* en comunidades indígenas Warao del Estado Delta Amacuro.
- ✓ Determinar la distribución de los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* presentes en las comunidades indígenas Warao.
- ✓ Determinar la cobertura teórica de la vacuna neumocócica conjugada 13-valente en la población Warao.

MATERIALES Y MÉTODOS

✓ *Población y Muestra*

Para este estudio, se consideraron las normas establecidas por la Organización Mundial de la Salud para trabajos de investigación en seres humanos. Cada visita contó con la participación del personal médico y personal del Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina. Se solicitó consentimiento escrito y verbal de los padres, para la toma de muestra de los niños. (Anexo 3). Se tomaron 984 muestras de hisopados nasofaríngeos, provenientes de 308 madres y 676 niños, en visitas organizadas a 9 comunidades indígenas de la etnia Warao, localizadas en el estado Delta Amacuro, Venezuela, en el marco de un estudio de vacunación, en la fase de pre-vacunación con la PCV-13 (figura 9). Las muestras fueron tomadas por personal médico y fueron procesadas para bacteriología por el personal del Laboratorio de Tuberculosis. Es importante resaltar que el criterio de inclusión de los participantes en el estudio fue de niños con y sin sintomatología, al igual que sus madres.

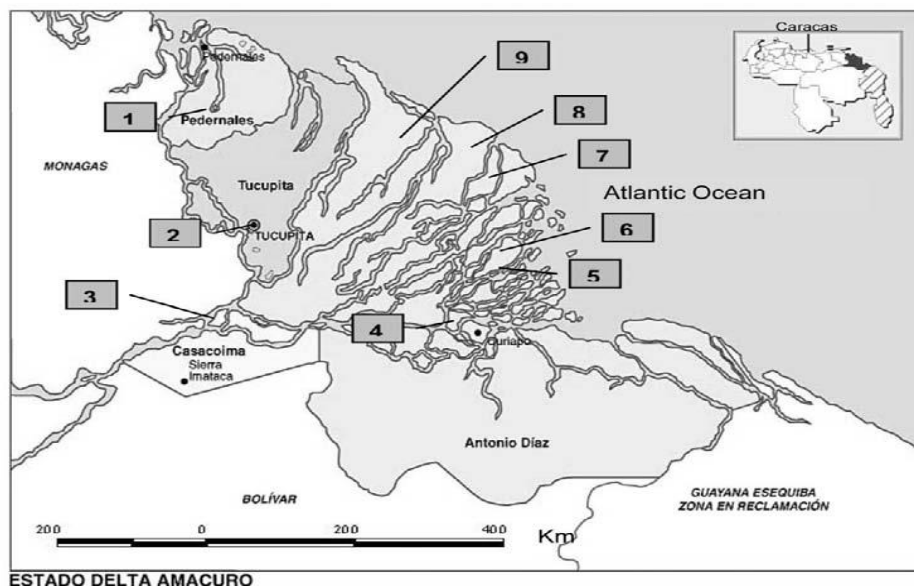


Figura 9. Estado Delta Amacuro. Visualización de las distintas comunidades pertenecientes a la etnia Warao para el estudio de vacunación. Las comunidades que participaron en el estudio: **1** Araguaibisi; **2**

Ibaruma; **3** Guayaboroína; **4** Isla de Bonoina; **5** Araguaimujo; **6** Jobure de Curiapo; **7** Arature; **8** Winikina y **9** Merejina. Tomado y Adaptado de <http://pubget.com/profile/author/Ismar%20A%20IA%20Rivera-Olivero> (Consulta 05 de Abril 2013).

✓ *Recolección de Muestras*

De cada individuo se obtuvo una muestra de secreción nasofaríngea. Para ello se introdujo un hisopo flexible en la nariz, marca Coplan®, el cual es inerte y no tóxico para las bacterias (Madigan, 2010).

Para la toma de muestra, la cabeza del paciente debe desplazarse hacia atrás y la cabeza debe estar inmovilizada, se introduce el hisopo hasta la nasofaringe, realizando ligeros movimientos de rotación para tomar una cantidad suficiente y representativa.

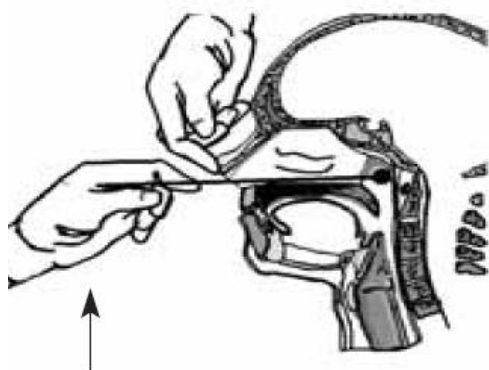


Figura 10. Toma de muestra de un hisopado nasofaríngeo. Se observa la anatomía de la nasofaringe y la vía que necesita seguir el hisopo para alcanzar el punto en el cual se obtiene la muestra en la narina posterior.

Tomado de:
<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/ArgentinaLevelI/Manualprocedimientos.pdf>
(Consulta 07 de abril de 2013)

✓ *Transporte de las Muestras*

Una vez obtenida la muestra, los hisopados nasofaríngeos fueron depositados en tubos eppendorf y transportados en STGG (leche descremada 2%, tripticasa de soya 3%, glucosa 0,5% y glicerol 10%), un medio de almacenamiento a largo plazo. Los hisopos

contenidos en STGG, se mantuvieron en refrigeración a 4°C, durante todo el proceso de traslado y posteriormente fueron almacenados a -20°C, así se aseguró la sobrevivencia de las especies bacterianas presentes (O'Brien y col., 2001; OMS, 2004).

✓ **Procesamiento Bacteriológico**

Una vez en el laboratorio las muestras contenidas en los hisopados nasofaríngeos, se extrajeron con una pinza estéril y se inocularon en placas de agar sangre y agar sangre más gentamicina, seguidamente fueron incubadas en un ambiente de microaerofilia por 24 y 48 horas a 37 °C. Se observó la morfología de las colonias, seleccionando las de interés (colonias α hemolíticas) para proceder a realizar un extendido y colorear con la tinción de Gram (Mindy-Perilla, 2004). El criterio de selección se realizó siguiendo los lineamientos del flujograma de procesamientos de hisopados nasofaríngeos, descrito en la sección de anexos, (Anexo 2). De este repique se tomó un inóculo para realizar pruebas bacteriológicas como sensibilidad a la optoquina y tinción de Gram, que confirman la identificación de *S. pneumoniae*, ambas descritas a continuación. También se resuspendió una asada del crecimiento bacteriano en 100 μ l de buffer TE 1X (Tris-HCl pH: 8, 10mM y EDTA pH: 8, 1Mm), para realizar la posterior extracción del genoma bacteriano.

Prueba de Susceptibilidad a la Optoquina

La prueba de susceptibilidad a la optoquina (etilhidrocupreína) se realizó con un disco de 6 mm, con 5 μ g de optoquina y tiene por objetivo diferenciar e identificar las cepas de *S. pneumoniae* (CCPF, 2000; Mindy y col., 2004). Las cepas susceptibles a optoquina correspondían a *S. pneumoniae*, con un halo mayor o igual a 14 mm de longitud. El protocolo de esta técnica, se describe a continuación:

Se tocó la colonia sospechosa α -hemolítica con un asa bacteriológica estéril y en una placa de agar sangre se estrió para el aislamiento. Se colocó un disco de optoquina con un diámetro de 6 mm (que contenía 5 μ g de ethilhidrocupreína) sobre la estría del inóculo. Se incubaron las placas en una incubadora de CO₂ a 35°C durante 18–24 horas y posteriormente se interpretaron los resultados.

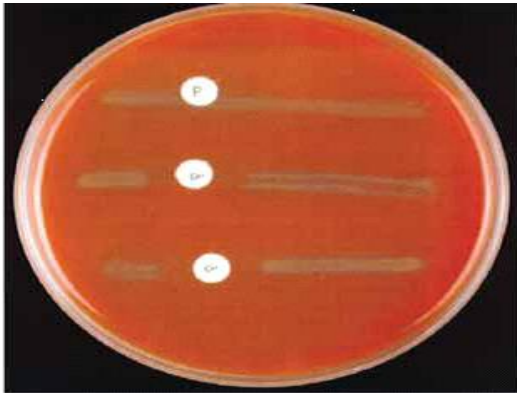


Figura 11. La prueba de susceptibilidad a la optoquina para la identificación de *S. pneumoniae*. La cepa de la estría superior, es resistente a la optoquina y por lo tanto no es neumococo. Las cepas estriadas en el centro y en la parte posterior son susceptibles a la optoquina y son identificadas como *S. pneumoniae*.

Tomado de:

http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/Argentina-LevelII/Manual_procedimientos.pdf
(Consulta 07 de abril de 2013)

Tinción de Gram

La tinción de Gram es uno de los métodos de tinción más importantes en el laboratorio microbiológico (Madigan y col., 2010). Descrita en forma breve, la secuencia de la tinción es la siguiente:

Se realizó un extendido delgado de la colonia sobre un portaobjetos. Luego de estar seco, se procedió a fijar el material a estudiar, pasando la lámina 2 o 3 veces por la llama de un mechero. Se colocó la lámina sobre un soporte y se cubrió con cristal violeta (1%) durante un minuto, se lavó con agua corriente. Luego se cubrió la placa con lugol de Gram durante un minuto, se lavó de nuevo con agua corriente. Se procedió a decolorar con una

mezcla de alcohol-acetona (2:1) durante 30 segundos. Se cubrió la placa con safranina (0,5%), durante un minuto, se lavó con agua y se dejó secar al aire libre. Finalmente se observó al microscopio con aceite de inmersión, objetivo 100X, condensador abierto totalmente para que la luz pase y se obtenga buena iluminación.

Es importante resaltar, que si bien se colaboró con la culminación de esta metodología, la mayor parte del procesamiento bacteriológico lo llevó a cabo el personal del laboratorio de enfermedades respiratorias de la Escuela José María Vargas de la UCV y personal del Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina. De aquí en adelante se presenta la metodología que ayudó a alcanzar los objetivos propuestos en este proyecto de tesis.

✓ *Extracción de ADN*

El ADN de las muestras bacterianas se extrajo de manera sencilla, mediante la aplicación de un “boiling” (Molmes y col., 1981). Una asada de microorganismos se resuspendió en 100 μ l de buffer TE (Tris-EDTA, 10mM), para ser calentado en un baño de María a 100°C, por diez minutos.

Esta metodología se aplicó para aislados con micromorfología de cocos gram positivos y colonias α hemolíticas, con susceptibilidad y resistencia a la optoquina, debido a que se ha observado un porcentaje de cepas de *S. pneumoniae* resistentes al antibiótico (Kacou y col., 2010; Cortés y col., 2008).

Una vez realizada la extracción, para obtener el ADN, se centrifugó este lisado por 3 minutos a 13.000xg y se tomaron 5µl del sobrenadante para la realización de la PCR múltiple.

✓ **PCR Múltiple para la serotipificación de *S. pneumoniae***

En el laboratorio se empleó una PCR múltiple basada en la detección directa de 38 serogrupos/serotipos, la cual se estandarizó a través del trabajo de Pai en el 2006.

La PCR consiste en ocho reacciones organizadas de tal forma que los serotipos y serogrupos de mayor prevalencia en el país son detectados en un orden de importancia, de acuerdo a lo suministrado por trabajos científicos en otras etnias, aportes del Sistema Regional de Vacunas, de la Organización Panamericana de la Salud y estudios llevados anteriormente en Venezuela para determinar los serotipos circulantes en la población venezolana.

El uso de controles internos positivos es necesario para el reconocimiento de resultados falsos negativos (Sisco, 2010; Coskún y col., 2012). En el caso de *S. pneumoniae* se utilizaron secuencias conservadas en el gen *cpsA* del Locus *cps* común a todos los serotipos.

A continuación se describen los cebadores empleados, señalando sus secuencias y el tamaño del producto de amplificación que generaron.

Tabla 1. Cebador para el gen *CpsA*, control positivo interno (Pai y col. 2006).

Cebador	Secuencia 5´- 3´	Banda Esperada (pb)
cpsA- for	GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC	160
cpsA- rev	GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC	

Tabla 2. Cebadores empleados en la PCR múltiple para la detección de los serogrupos/ serotipos de *S. pneumoniae* (Pai y col., 2006; Rivera-Olivero y col., 2007; CDC, 2008).

Reacción 1			Reacción 2			Reacción 3		
Cebador	Banda Esperada (pb)	Gen	Cebador	Banda Esperada (pb)	Gen	Cebador	Banda Esperada (pb)	Gen
23A-for	712	Wzy	16F-for	717	wzy	10A-for	628	wcr
23A-rev			16F-rev			10A-rev		G
19E-for	607	Wzy	38-for	574	wzy	35F-for	517	wzy
19E-rev			38-rev			35F-rev		
19A-for	566	Wzy	15B/C-for	496	wzy	4-for	430	wzy
19A-rev			15B/C-rev			4-rev		
19A-for	478	mnaA	34-for	408	wzy	3-for	371	galU
19A-rev			34-rev			3-rev		
19F-for	304	Wzy	33F-for	338	wzy	1-for	280	wzy
19F-rev			33F-rev			1-rev		
6-for	250	wciP	14-for	208	wzy			
6-rev			14-rev					
	Reacción 4			Reacción 5			Reacción 6	
22F-for	643	wcrG	17F-for	693	wciP	24A-for	686	wzy
22F-rev			17F-rev			24A-rev		
9N/L-for	516	Wzy	7F/A-for	599	wzy	20-for	514	wciL
9N/L-rev			7F/A-rev			20-rev		
11A-for	463	Wzy	15A-for	436	wzy	12F-for	376	wzy
11A-rev			15A-rev			12F-rev		
5-for	362	galU	2-for	290	wzy	29-for	259	wzy
5-rev			2-rev			29-rev		
45-for	238	Wzy	23B-for	200	wzy			
45-rev			23B-rev					
	Reacción 7			Reacción Triple				
31-for	701	Wzy	9V/A-for	816	wzy			
31-rev			9V/A-rev					
35B-for	677	wcrH	18-for	573	wzy			
35B-rev			18-rev					
7C-for	260	wcwL	23F-for	388	wzy			
7C-rev			23F-rev					
8-for	201	Wzy						
8-rev								

La secuencia de los cebadores empleados se describe en la tabla 5, ubicada en la sección de anexos. Las PCR se realizaron imitando al procedimiento de una marcha analítica, es decir, una vez identificado un serotipo por reacción 1, el mismo no concursa para ser pasado por las siguientes reacciones. Las reacciones fueron realizadas en volúmenes de 20µL, cada reacción contenía: Búffer 2,5µL (1X) [Buffer: Tris HCl (pH:8) 20mM, Cloruro de Potasio, 100mM; EDTA 0,1mM, Dithiothreitol 1M, Tween 20 (0,5%) y Noridet (0,5%)], MgCl₂ 2,5 µl (2,5mM), dNTPs 2,5 µL (1mM), Taq polimerasa 0,5 µL (1U) FUNDAIM, control positivo interno [Cebador CpsA- for 0,25 µL (0,2µM) y Cebador

CpsA- rev 0,25 μL (2 μM), Agua des-ionizada estéril 4 μL , Enhancer o facilitador (Sacarosa) 5 μL (1M). Luego se adicionaron 2,5 μL de una mezcla de cebadores previamente preparada en partes iguales y cuya concentración final en la mezcla de PCR era de 0,5 μM .

Después de haber alicuotado 20 μL de cóctel de PCR en cada eppendorf, se añadieron los 5 μL de ADN molde. El programa en el termociclador para todas las reacciones comprendía una desnaturalización a 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos: 94°C por 45 segundos (Amplificación), 54°C por 45 (Alineamiento) y 65°C por 2 minutos y 30 segundos (Polimerización).

Por último, una vez amplificado el ADN, los fragmentos resultantes fueron separados en función de su tamaño por medio de un proceso de electroforesis en geles de agarosa.

✓ *Electroforesis para la Visualización de los Fragmentos de ADN, en Geles de Agarosa*

Se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 3% (p/v); preparados con buffer Tris-Borato (0.5X). (TBE: 45mM Tris-Borato y 1mM EDTA a pH: 8.0). Se utilizó bromuro de etidio para la coloración (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se empleó buffer de carga 1X [(0,25% p/v) azul de bromofenol, (30% p/v) glicerol y (0,25% p/v) de xilencianol].

La corrida de los geles se llevó a cabo en una cámara Maxicell, modelo EC360M (EC Apparatus), en buffer TBE 0,5X a 70-80 voltios (Welhs, 1999). Los geles teñidos con bromuro de etidio se revelaron en un Trans-iluminador UV y el registro fotográfico se realizó con el sistema Bio-Rad®.

Para distinguir el tamaño de las bandas obtenidas y ayudar a la identificación de los serotipos, se hizo uso de marcadores de peso molecular de 50 y 100pb (Promega®); comparando las bandas obtenidas con las esperadas para cada cebador específico (Sambrook y col., 1889).

✓ *Análisis Estadístico*

Una vez contabilizados los serogrupos/serotipos de *S. pneumoniae* encontrados en las 9 comunidades indígenas muestreadas, se procedió a realizar un análisis estadístico para conocer si las diferencias encontradas en la cobertura de la vacuna antineumocócica conjugada 13 valente (PCV-13), eran estadísticamente significativas.

El programa utilizado fue Minitab® 16 de Minitab Inc. (State College, Pensilvania, EE.UU.), siguiendo los lineamientos del estadístico Altman (Altman, 1991), para la realización de la Chi-Cuadrado (Chi-Squared Test).

Se agruparon los serogrupos/serotipos circulantes en la población Warao, en 2 categorías, para facilitar el análisis (Altman, 1991). Las 2 categorías fueron **VT** donde se incluyó a los serotipos cubiertos por la PCV-13 y **NTV** agrupando los serotipos no vacunales. El resultado obtenido mediante el programa se presenta en la sección de anexos, en la tabla 6.

RESULTADOS

El estudio abarcó 9 comunidades indígenas, donde se muestrearon 308 familias, incluyendo 676 niños y 308 madres. El promedio de niños por familia fue 2,19. El estado de portador en los integrantes de la etnia Warao fue de 46,04% (n=453), con 414 niños colonizados (61,2%) con edades comprendidas entre los 0 y 12 años; y 39 madres (12,7%), mayores de 15 años. Los porcentajes de colonización nasofaríngea se resumen en los siguientes gráficos.

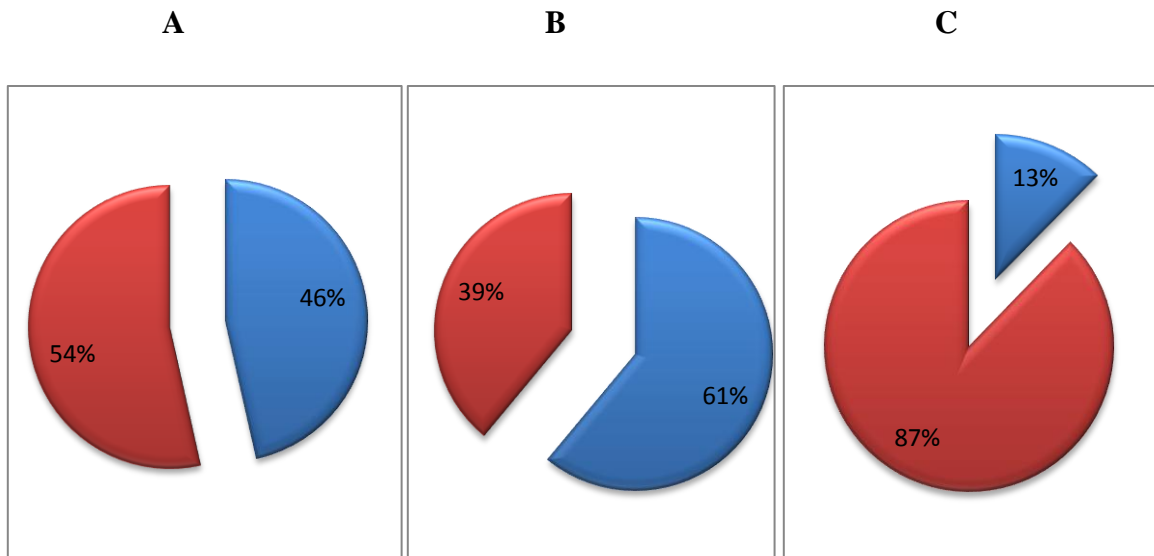


Figura 12. Estado de portación nasofaríngea por *S. pneumoniae* en la etnia Warao ■ Pacientes colonizados por *S. pneumoniae*, ■ Pacientes no colonizados por *S. pneumoniae*. **A.** Estado de portación nasofaríngea por *S. pneumoniae* en la población Warao en general (madres e hijos). **B.** Colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* en niños. **C.** Colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* en Madres.

La figura 13 resume la frecuencia de los diferentes serogrupos/serotipos de *S. pneumoniae* en la población Warao, en el año 2012

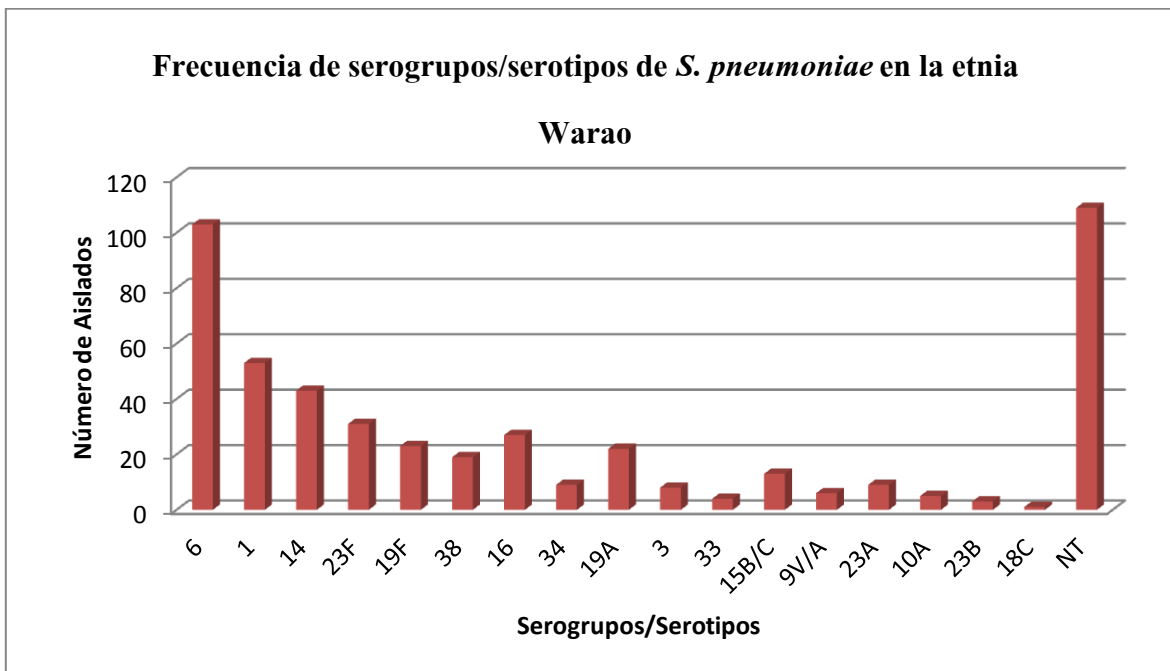


Figura 13. Frecuencia de serogrupos/serotipos de *S. pneumoniae* en la población Warao. NT cepas no serotificables por la PCR múltiple.

Se obtuvieron 488 aislados de *S. pneumoniae*; fue posible asignar un serotipo por el método de PCR múltiple a 379 cepas (77,6%), con respecto a los 109 aislados restantes (22,3%) no se logró conocer el serotipo por estar fuera del grupo de los serogrupos/serotipos identificados por la técnica.

Al evaluar la frecuencia de los serogrupos/serotipos circulantes en la población indígena Warao del Estado Delta Amacuro, se puede notar que el principal colonizador de la nasofaringe por *S. pneumoniae* es el serogrupo 6 con un 21,1% (n=103) de cepas identificadas con este biotipo. Otros serotipos frecuentes en esta población para el período 2012 fueron: serotipo 1 con 53 aislados (11%), serotipo 14 con 42 aislados (8,6%), serotipo

23F con 31 aislados (6,4%), serotipo 16 con 27 aislados (5,5%), el serotipo 19F con 23 aislados (4,7%) y el serotipo 19A con 22 aislados (4,5%).

El producto de amplificación obtenido por una PCR Múltiple, reacción 1, se presenta a continuación.

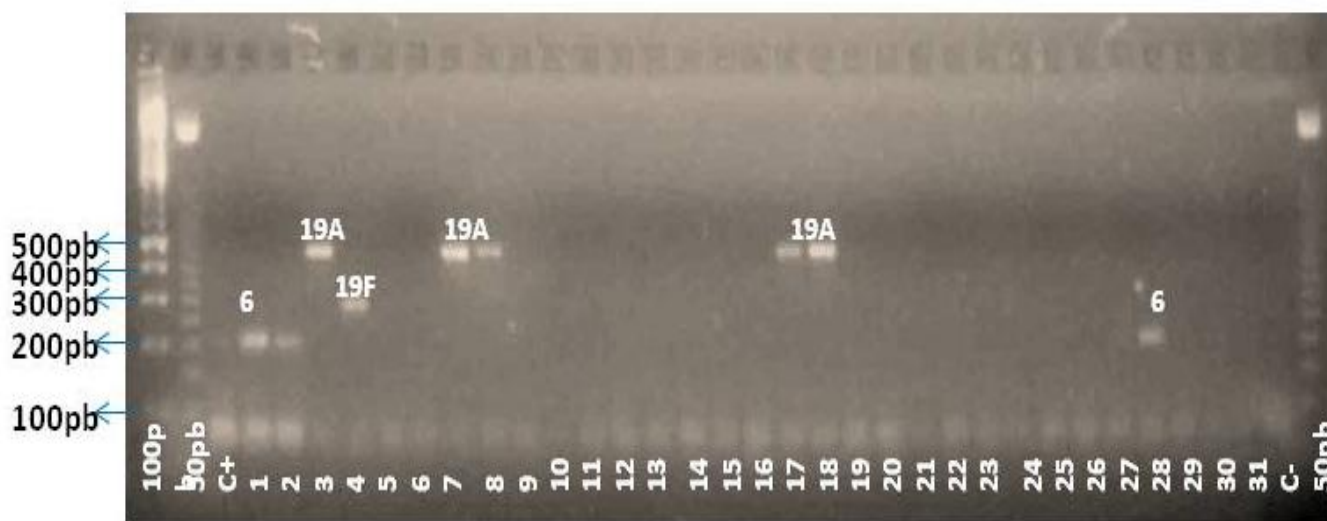


Figura 14. PCR múltiple, Reacción 1. Se detallan los productos de amplificación obtenidos mediante los hisopados nasofaríngeos de niños y madres Warao (muestras 1 al 31). **100pb** y **50pb**: corresponden a los marcadores de peso molecular (Promega®). **C+**: es un control positivo correspondiente al serogrupo 6 y el **C-** corresponde a un control negativo (Mezcla de PCR, sin ADN de *S. pneumoniae*). Nótese que las muestras 1, 2, y 28 corresponden a un serogrupo 6 (producto de amplificación 220pb). Las muestras 3, 7, 8, 17, y 18 corresponden a un serotipo 19A (producto de amplificación 478pb). La muestra 4 corresponde a un serotipo 19F (producto de amplificación 304pb).

Los datos obtenidos de la colonización nasofaríngea por grupo etario, se resumen en la figura 15, determinándose que el grupo etario comprendido entre los 0 a 6 meses, alcanzó el mayor estado de portador con un 74,2% (23/31), seguido por el grupo etario de los 7 meses a los 2 años con un 67,2% (129/192) y el grupo etario de los 3 a 5 años con un 62,3% (172/276). En este sentido la colonización nasofaríngea en niños de 6 a 8 años estuvo alrededor del 51,8% (71/137), mientras que en el grupo etario comprendido entre

los 9 a 12 años fue de 47,5% (19/40); demostrando nuestros resultados que la colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* disminuye paulatinamente con el incremento de la edad.

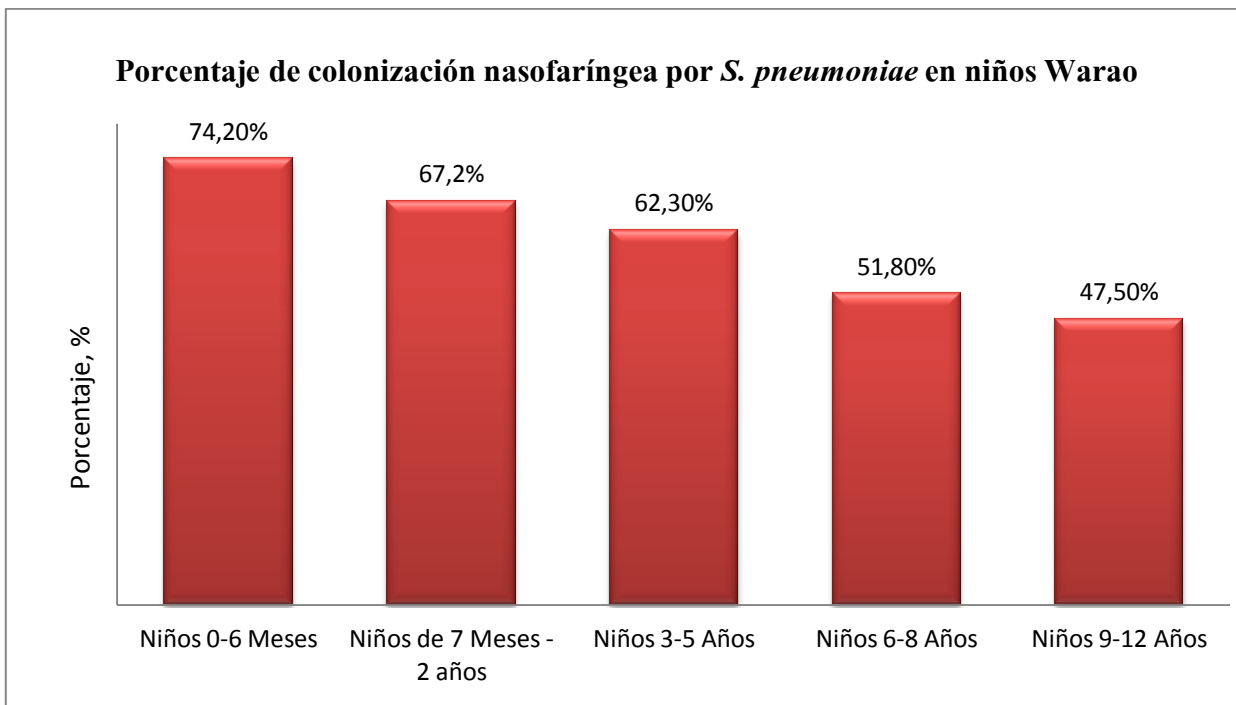


Figura 15. Porcentaje de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* en niños Warao, por grupo etario.

La frecuencia de los principales serogrupos/serotipos predominantes en niños Warao, separados por grupo etario, se resumen en la figura 16, presentada a continuación.

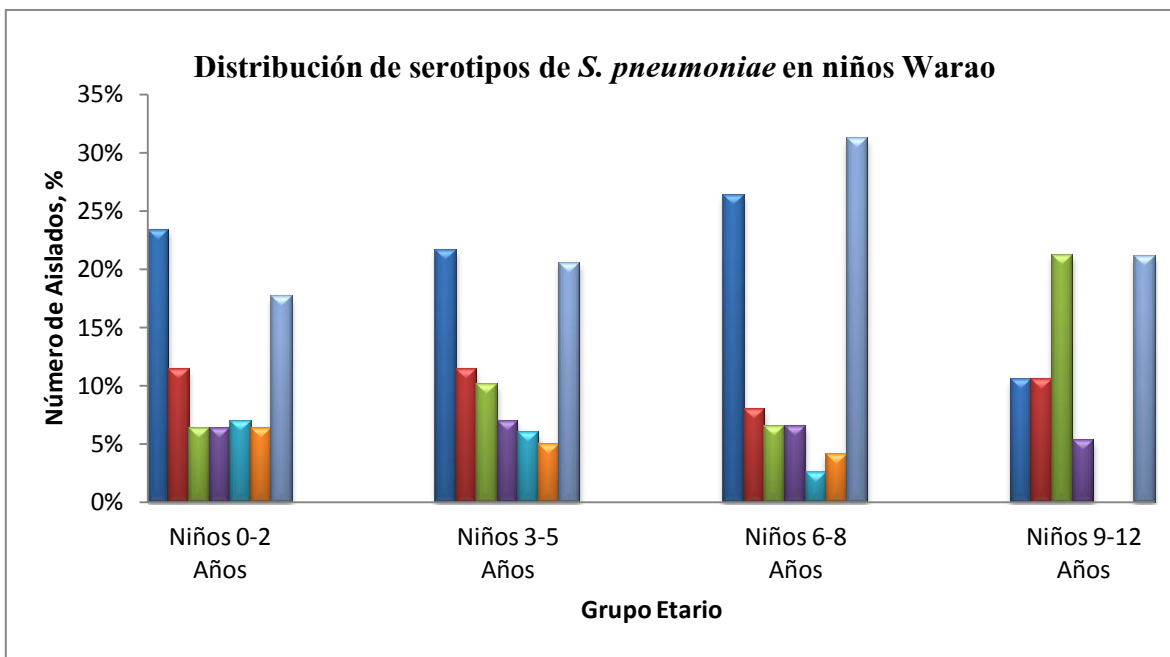


Figura 16. Distribución de los principales serogrupos/serotipos de *S. pneumoniae* en niños pertenecientes a comunidades indígenas Warao, por grupo etario. ■ Serogrupo 6, ■ Serotipo 1, ■ Serotipo 14, ■ Serotipo 23F, ■ Serotipo 16, ■ Serotipo 19F, ■ Aislados no serotipados por la PCR múltiple.

El serogrupo 6 es el que se mantiene como principal colonizador de la nasofaringe en niños de los grupos etarios de 0 a 2 años (23,4%), de 3 a 5 años (21,6%) y de 6 a 8 años (26,3%). Sin embargo, el principal colonizador en el grupo etario de 9 a 12 años es el serotipo 14 (21,1%).

Es de hacer notar que el serotipo 1 es un importante colonizador en todos los grupos etarios, alcanzando en todos ellos alrededor del 10% en el número de aislados. Los serotipos 23F y 19F colonizan a los tres primeros grupos (de 0 a 8 años), al igual que el serotipo 16. En este último, la colonización declina con el incremento de la edad.

La distribución de los serogrupos/serotipos de *S. pneumoniae* en las madres Warao, se ve reflejada en la figura 17.

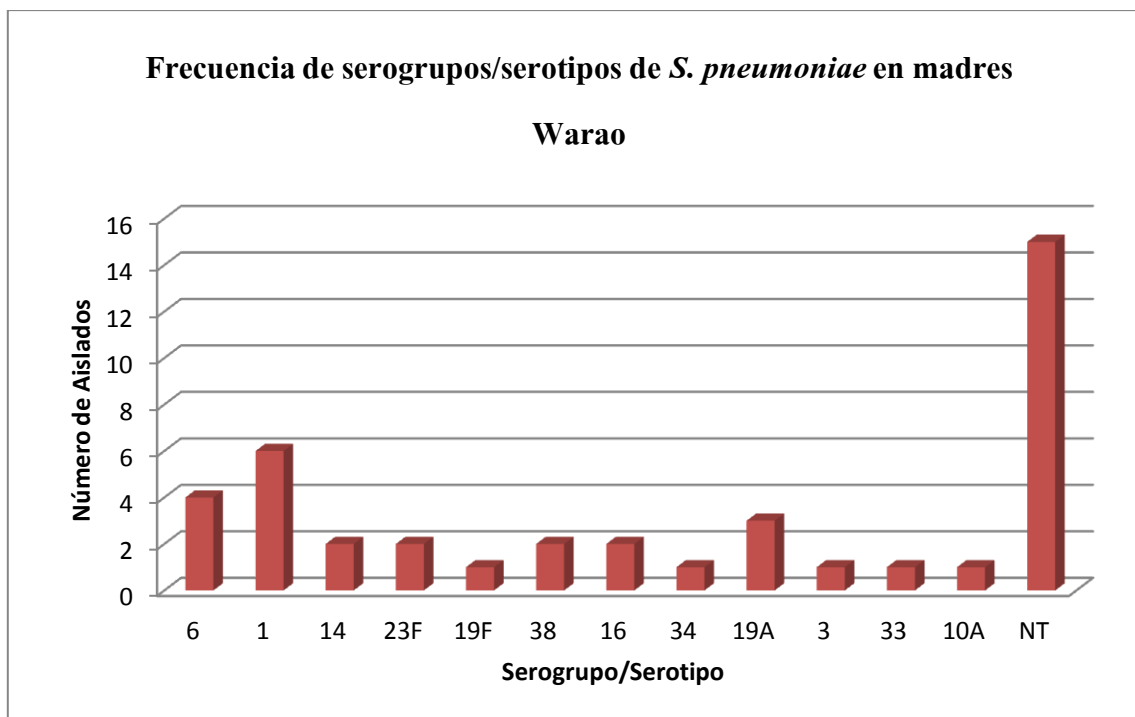


Figura 17. Distribución de serogrupos/serotipos en madres pertenecientes a la etnia Warao. NT Aislados no serotipificados por la PCR múltiple.

Se obtuvieron 42 aislados de *S. pneumoniae* en madres Warao, donde se pudo asignar un serotipo por el método de PCR múltiple a 26 aislados. Con respecto a los 16 aislados restantes no se le logró conocer el serotipo por estar aparentemente fuera del grupo de los serogrupos/serotipos identificados por la técnica.

El serotipo 1 es el principal colonizador con 6 aislados, lo que representó el 14,2% del total de aislados obtenidos. Otros biotipos de *S. pneumoniae* presentes en madres son el serogrupo 6 con 9,8% y el serotipo 19A con un 7,3%.

En este estudio evaluamos los serogrupos/serotipos presentes en madres e hijos y comparamos la similitud entre ambos grupos. La distribución de *S. pneumoniae* en las 39 madres colonizadas y los niños se resumen en la figura 18.

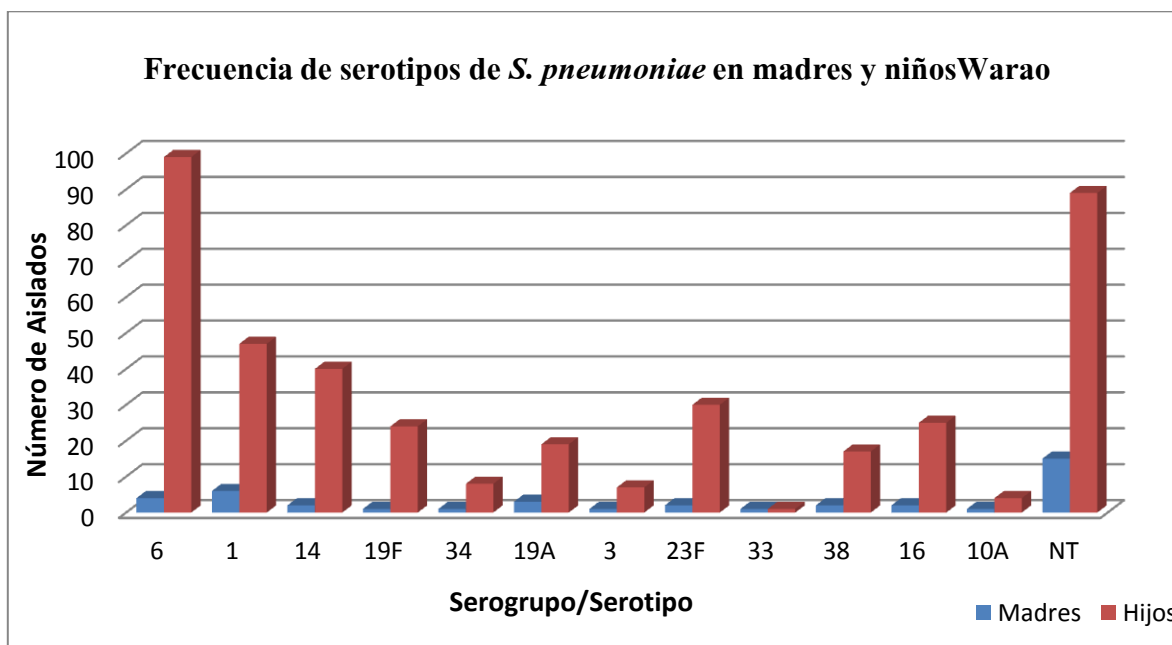


Figura 18. Frecuencia de serogrupos/serotipos de *S. pneumoniae* en madres y niños Warao.

En las madres Warao la frecuencia de serogrupos/serotipos circulantes en la población se comporta de manera similar a la obtenida en niños; al comparar la presencia de serotipos en madres e hijos habitantes de estas comunidades, se observó que la distribución en madres se asemeja a la encontrada en niños de 0 a 8 años de edad, con el serogrupo 6 y el serotipo 1 como principales colonizadores de la nasofaringe. En el presente estudio se determinó que sólo 39 madres presentan colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae*; de estas 39, sólo 6 madres comparten el mismo serogrupo/serotipo con sus hijos. Los niños que compartieron serotipo con sus madres estuvieron en el grupo etario de

0 a los 5 años. Los serogrupos/ serotipos encontrados en ambos grupos fueron: 6, 23F, 10A, 38 y 1. Este último estuvo presente en dos grupos de madre e hijo. Se recomiendan estudios a fondo, acerca de la transmisión horizontal para asegurar lo antes expuesto.

Las comunidades pertenecientes al pueblo Warao muestreadas se encuentran en la figura 8 y el porcentaje de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* de estas comunidades se visualiza en la figura 19, presentada a continuación.

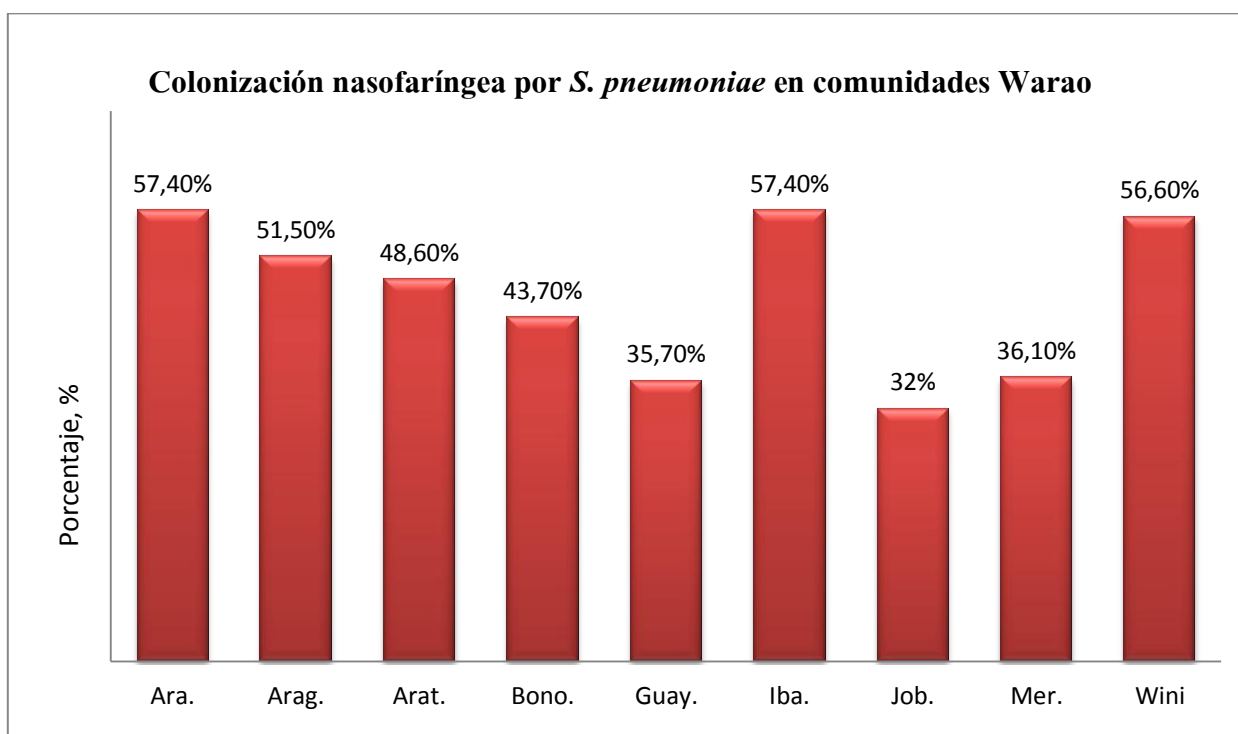


Figura 19. Colonización de la nasofaringe por *S. pneumoniae* en comunidades pertenecientes a la etnia Warao. Las comunidades que participaron en el estudio: **Ara.** Araguaibisi; **Arag.** Araguaimujo; **Arat.** Arature; **Bono.** Isla de Bonoína **Guay.** Guayaboroína; **Iba.** Ibaruma; **Job.** Jobure de Curiapo; **Mer.** Merejina y **Wini.** Winikina.

Las 9 comunidades indígenas Warao presentan altas tasa de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae*. Las comunidades Araguaibisi (31/54) e Ibaruma (74/129)

se posicionan con el mayor índice de miembros colonizados por el microorganismo, con un 57,4%, seguida de la comunidad Winikina con un 56,6% (47/83) y Araguaimujo con un 51,5% (84/163).

Se observó que las comunidades con menor porcentaje de colonización nasofaríngea fueron Jobure de Curiapo con 32% (60/187), Guayaboroina con 35,7% (20/56) y Merejina con 36,1% (30/83).

En la tabla 3, presentada a continuación, se puede apreciar la distribución y frecuencia de los diversos serogrupos/serotipos de *S. pneumoniae* en estas comunidades.

Tabla 3. Frecuencia de serogrupos/serotipos de *S. pneumoniae* en los integrantes de 9 comunidades Indígenas Warao del estado Delta Amacuro-Venezuela.

	Comunidad								
	Ara	Arag	Arat	Bono	Guay	Iba	Job	Mer	Wini
Número de Aislados	35	88	81	39	24	80	60	32	49
1	2 5,7%	4 4,5%	12 14,8%	9 23%	1 4,2%	9 11,3%		4 12,5%	12 24,5%
3		2 2,3%	2 2,5%	2 5,1%		1 1,2%			1 2%
6	9 25,7%	10 11,4%	11 13,6%	11 28,2%	8 33,3%	13 16,3%	14 23,3%	15 46,9%	12 24,5%
9V/A		1 1,1%	3 3,7%		2 8,3%				
14	8 22,8%	1 1,1%	12 14,8%	2 5,1%		11 13,8%	3 5%	2 6,3%	4 8,2%
18C							1 1,7%		
19A	4 11,4%	6 6,9%	6 7,4%	2 5,1%	1 4,2%			1 3,1%	2 4,1%
19F		10 11,4%	1 1,2%		4 16,7%	3 3,8%	2 3,3%	2 6,3%	1 2%
23F		12 13,6%		1 2,6%	1 4,2%	4 5%	13 21,7%		
16	3 8,6%	3 3,4%	8 9,9%	1 2,6%	2 8,3%	6 7,5%	3 5%	1 3,1%	
38	3 8,6%	4 4,5%	2 2,5%			1 1,2%	3 5%		6 12,2%
15B/C			2 2,5%	4 10,3%			5 8,3%	1 3,1%	1 2%
34	2 5,7%		2 2,5%	2 5,1%		1 1,2%			2 4,1%
23A	1 2,9%	1 1,1%	5 6,2%			2 2,5%			
33		1 1,1%			1 4,2%		1 1,7%		1 2%
10A		2 2,3%							3 6,1%
23B						3 3,8%			
NT	3 8,6%	31 35,2%	15 18,5%	5 12,8%	4 16,7%	26 32,5%	15 25%	6 18,8%	4 8,2%
Cobertura de la PCV-13	65,7%	52,3%	58%	69,2%	70,8%	51,3%	55%	75%	65,3%

En la tabla se muestran las comunidades que participaron en el estudio: **Ara.** Araguaibisi; **Arag.** Araguaimujo; **Arat.** Arature; **Bono.** Isla de Boina **Guay.** Guayaboroina; **Iba.** Ibaruma; **Job.** Jobure de Curiapo; **Mer.** Merejina y **Wini.** Winikina. Los serogrupos/serotipos marcados en **AZUL** son los cubiertos por la PCV-13 (serotipos vacunales) y los marcados en **ROJO** son los no cubiertos por la PCV-13. **NT** cepas

no serotificables por la PCR múltiple. En la última fila de la tabla 3, se encuentra la **cobertura de la PCV-13** en las comunidades muestreadas.

El serogrupo 6 es el principal colonizador de la nasofaringe en los habitantes pertenecientes a comunidades indígenas Warao. Sin embargo, en los integrantes de la comunidad Araguimujo el serotipo 23F fue el que predominó como principal colonizador de la nasofaringe. Otros serogrupos/serotipos presentes con mayor frecuencia en las comunidades de esta etnia son: el 19F, 16, 19A, 1 y 14.

Según nuestros datos, hay serotipos encontrados solamente en una única comunidad, como es el caso del serotipo 23B encontrado en Ibaruma y el serotipo 18C encontrado en Jobure de Curiapo.

Se encontraron diferencias en las 9 comunidades en cuanto a la cobertura teórica de la vacuna antineumocócica conjugada 13-valente (PCV-13); la comunidad Guayaboroina fue la que alcanzó la mayor cobertura por la vacuna con el 70,8%, comunidad que presentó un bajo porcentaje de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae*. La comunidad Ibaruma, una de las comunidades que presentó alta tasa de colonización nasofaríngea, obtuvo la menor cobertura por la PCV-13, con un 51,3%. Sin embargo, en el análisis estadístico realizado mediante la prueba Chi-Cuadrado (Chi-Squared Test), se demostró que no hay diferencias estadísticamente significativas en la cobertura teórica de la PCV-13 en las 9 comunidades muestreadas ($p=0,152$), por lo tanto, podemos suponer que aparentemente la distribución de este patógeno es homogénea, en el pueblo Warao del Estado Delta Amacuro.

El análisis de los datos obtenidos, tomando en cuenta la distribución de los distintos serogrupos/serotipos en madres y niños Warao, en el año 2012, permite hacer un cálculo teórico sobre la cobertura de la vacuna antineumocócica conjugada 13-valente (PCV-13), que cubre los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A/B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 19A y 23F; teniendo una cobertura del 59,4% en la población indígena Warao en general (madres e hijos). La cobertura teórica de la PCV-13 es del 45,2% para el grupo de las madres y alcanza el 61,2% en infantes. Los gráficos de la cobertura contra la vacuna antineumocócica conjugada 13-valente, se presentan a continuación.

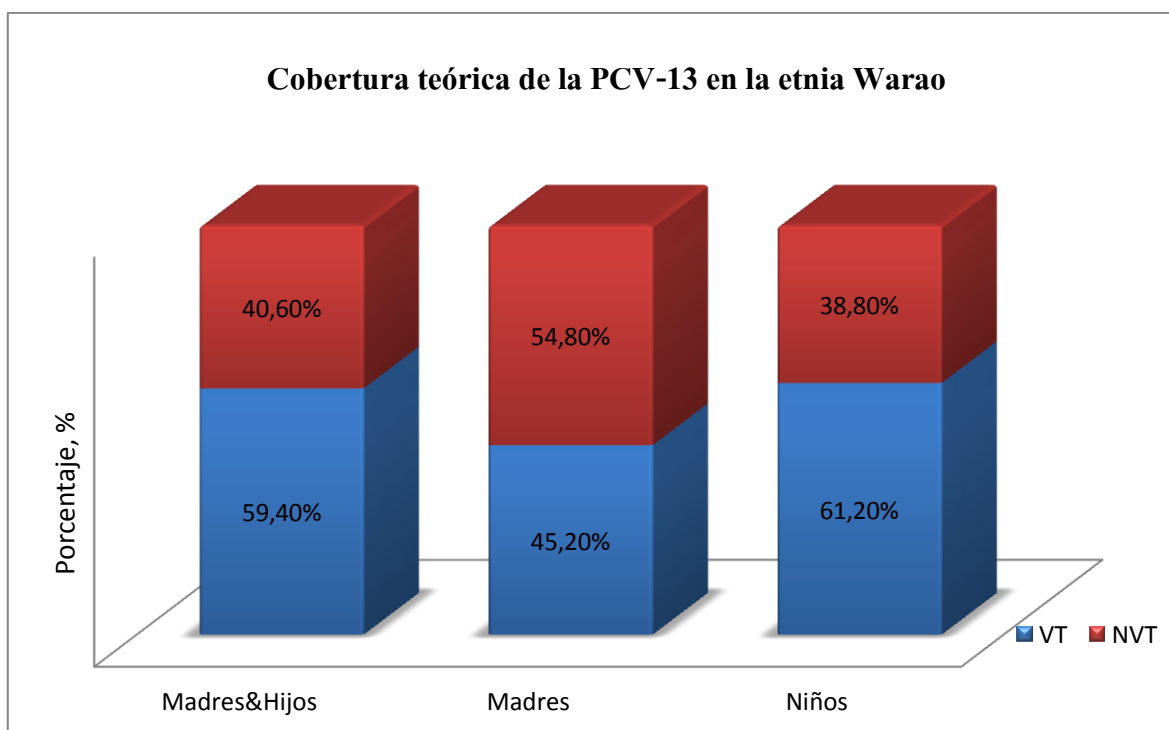


Figura 20. Cobertura teórica de la PCV-13 contra *S. pneumoniae* en la etnia Warao, para el año 2012. Se representan los serotipos cubiertos por la vacuna (VT) y los serotipos no cubiertos en ella (NVT), en la etnia Warao.

Del porcentaje de colonizados en la etnia Warao se determinó que un 7,1% (n=32) presentaba co-colonización por *S. pneumoniae*, siendo 30 niños los que presentaban más de un serogrupo/serotipo. Estos datos se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Co-colonización de la nasofaringe (asociación entre serogrupos/serotipos)

Serotipo/Serogrupo (2 cepas)	N° de Muestra	Serotipo/Serogrupo (3 cepas)	N° de Muestra
14/16	7	1/14/38	1
1/3	4	23A/16/15B/C	1
19F/6	4	19A/6/19F	1
14/15B/C	2		
19A/6	2		
38/16	1		
14/34	1		
16/34	1		
19A/19F	1		
23F/19F	1		
23F/23B	1		
23F/9V/A	1		
23A/6	1		
23A/19F	1		
14/6	1		

A continuación se describe un gel, donde se visualiza la asociación entre los diferentes serogrupos/serotipos, detectados por la reacción 2.

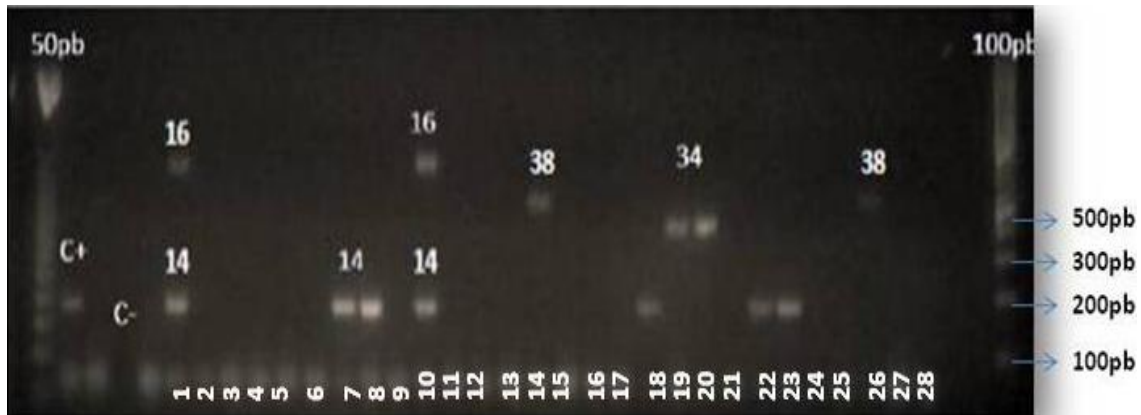


Figura 21. PCR múltiple, Reacción 2. Se detallan los productos de amplificación obtenidos mediante los hisopados nasofaríngeos de niños y madres Warao (muestras 1 al 28). **100pb** y **50pb**: corresponden a los marcadores de peso molecular (Promega®). **C+**: es un control positivo correspondiente al serotipo 14 y el **C-** corresponde a un control negativo (Mezcla de PCR, sin ADN de *S. pneumoniae*). Nótese que las muestras 1 y 10 presentan co-colonización con el serotipo 14 (producto de amplificación 208pb) y serotipo 16 (producto de amplificación 717pb). Las muestras 7, 8, 18, 22, y 23 corresponden a un serotipo 14. Las muestras 19 y 20 corresponden a un serotipo 34 (producto de amplificación 408pb). Las muestras 14 y 26 corresponden a un serotipo 38 (producto de amplificación 574pb).

La asociación entre los diferentes serogrupos/serotipos es muy dinámica y a su vez compleja. Nuestros resultados muestran que aparentemente los serogrupos/serotipos 14 y 16 son los principales que suelen estar juntos a la hora de colonizar la nasofarige, seguida de la asociación entre los serotipos 1/3 y 19F/6.

DISCUSIÓN

La neumonía es la novena causa de fallecimientos en Venezuela y ocupa la quinta posición en menores de un año y la cuarta en infantes de entre uno y cuatro años de edad. La morbilidad por neumonía para mayores de cinco años fue de 833 por cada 100.000 habitantes para el año 2009 con letalidad de 1,1 % (Rísquez- Echezuría, 2009). En el año 2003, se reportó en el Estado Delta Amacuro, cerca de 1.298 muertes en niños menores de cinco años a causa de esta afección; representando uno de los principales problemas de salud que afecta a las comunidades indígenas Warao (Rivera-Olivero y col., 2007). Es importante resaltar que la mortalidad a causa de *Streptococcus pneumoniae* es mayor a la originada por cualquier otra bacteria patógena, es por ello que la Organización Mundial de la Salud refiere a *S. pneumoniae* como el principal agente causal de enfermedades respiratorias en todo el mundo (Hsieh y col. 2008).

Colonización Nasofaríngea por *S. pneumoniae*

En este estudio se ha observado un alto índice de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae*. El porcentaje de colonización de madres e hijos en la etnia Warao alcanzó el 46,04% (n=453). Este dato concuerda con un estudio realizado en esta misma etnia para el año 2004 por Rivera y colaboradores donde el estado de portador nasofaríngeo en niños alcanzó el 49% (Rivera y col., 2007). Sin embargo la tasa de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* disminuyó en estas comunidades, pues en el año 2008 se reportó un 60,2% en estado de portador de madres e hijos (Sisco, 2010).

En poblaciones no indígenas, como las zonas urbanas de Caracas, se observa una frecuencia de portadores neumocócica global del 27% (Rivera y col., 2011). Esta tasa de colonización nasofaríngea es menor a la reportada en diversas comunidades indígenas de Venezuela: en la etnia Warao para los años 2004, 2008 y 2012, el estado de portador fue 49%, 60% y 46% respectivamente. En el grupo indígena de los Panare, la tasa de colonización nasofaríngea de la población en general fue de 47% y en la etnia Eñepa el estado de portador reportado en el 2013 fue de 62%, demostrando estos resultados que la colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* es más prevalente en pueblos indígenas de América.

Numerosos estudios de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* se han realizado a nivel internacional. En Cuba se ha demostrado una baja incidencia de colonización nasofaríngea. En esta población caucásica se encontró un 11,6% de estado de portador, de 318 muestras analizadas provenientes de niños sanos (Fuentes y col., 2009). En México de 573 niños sanos que participaron en el estudio, se aisló *S. pneumoniae* de 122, lo que representó un 21,4% de colonización nasofaríngea para el año 2005 (Santos y col., 2005). Esta tasa de colonización fue igual a la obtenida en un estudio llevado a cabo en Perú, donde los investigadores de la Universidad Peruana Cayetano Hereida, se propusieron determinar la frecuencia y distribución de los serotipos de *S. pneumoniae* en adultos e infantes sanos desde el año 2007 al 2009 (Mercado y col., 2012). En Sevilla, España se reportó para el año 2011 una tasa de colonización de *S. pneumoniae* del 33%, de un total de 848 hisopados nasofaríngeos analizados, provenientes de niños sanos atendidos en 4 centros de salud (Obando y col., 2011).

En contraste, diversos estudios han señalado altas tasas de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* en tribus aborígenes de todo el mundo. En Australia un total de 1.792 casos de enfermedad neumocócica invasiva se produjeron durante el período 1997-2007, la tasa de incidencia de enfermedad neumocócica invasiva fue de 47 casos por cada 100.000 habitantes por año entre la población aborígen y 7 casos por cada 100.000 habitantes por año en la población no aborígen, lo que sugiere una alta tasa de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* en esta población indígena (Lehmann y col., 2010). En los White Mountain Apaches y Navajos de Estados Unidos también se llevó a cabo un estudio para determinar la tasa de colonización nasofaríngea por parte de este microorganismo, se encontró un 65,3% de colonización nasofaríngea (Millar y col., 2009). La red internacional circumpolar de vigilancia sobre la enfermedad neumocócica invasiva del norte de Canadá reportó que en el período comprendido entre 1999 a 2010, se suscitaron 433 casos de enfermedad neumocócica invasiva en la población aborígen de este país. La incidencia fue mayor entre los lactantes menores a los 2 años y entre los adultos mayores de 65 años, con una incidencia anual media de 133 y 67 casos por 100.000 habitantes respectivamente. Una tasa 2 veces mayor a la encontrada en la población no aborígen de ese país (Helferty y col., 2013). En los indígenas venezolanos se han realizado diversos estudios para el monitoreo de este agente etiológico. En la etnia Eñepa la tasa de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* reportada para el año 2013, fue de 38% y 75% en madres e infantes respectivamente (Vergahen y col., 2013). Situación similar se presentó en la etnia Panare donde el 11% de las madres y el 69% de los niños eran portadores de *S. pneumoniae* (Rivera y col., 2010).

Es evidente que los altos niveles de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* encontrada en tribus indígenas de todo el mundo, trae como consecuencia el desarrollo de infecciones respiratorias agudas y enfermedad neumocócica invasiva. Muchos autores atribuyen que el desarrollo de estas patologías en los indígenas venezolanos (Panare y Eñepa) está relacionada con la malnutrición y el tabaquismo (por sus costumbres socioculturales) (Vergahen y col., 2013; Rivera y col., 2010). Las condiciones de hacinamiento y la infección viral concomitante, aumenta la posibilidad de portar *S. pneumoniae* en los integrantes de la población indígena Warao. Otros estudios señalan que la problemática de todas las etnias indígenas venezolanas y del resto de Suramérica se ve incrementada a causa del limitado acceso a los sistemas de salud; en la mayoría de los casos son los indígenas quienes no se benefician de los avances científicos y tecnológicos que protegen a casi todo el resto de la humanidad (Hurtado, 2001).

Frecuencia de serogrupos/serotipos de *S. pneumoniae* en niños pertenecientes a comunidades indígenas Warao.

En el presente estudio se determinó que la tasa de colonización en niños fue de 61,2% (n= 414), más alta que la reportada para esa misma población en el 2004 en un estudio realizado por Rivera-Olivero, donde se reportó que la tasa de colonización por *S. pneumoniae* era del 49% (Rivera-Olivero y col., 2007). Sin embargo en un estudio realizado por Sisco en el 2008, la tasa de colonización en infantes pertenecientes a la etnia Warao fue del 71,13%. Los serotipos circulantes en estos tres períodos de tiempos se resumen en la figura 22.

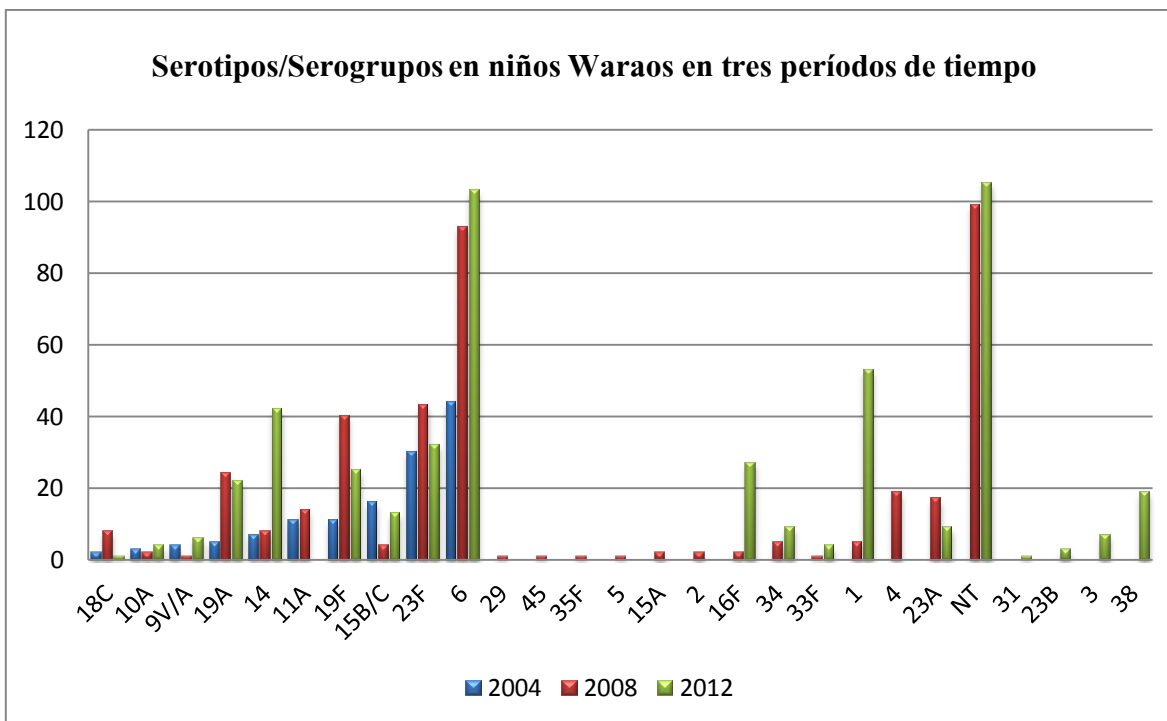


Figura 22. Distribución de serogrupos/serotipos de *S. pneumoniae* en niños, durante los años 2004, 2008 y 2012.

En el año 2004 se observó que la tasa de colonización por *S. pneumoniae* alcanzó el 49%, siendo los serogrupos/serotipos más predominantes el 6 (28,9%), 23F (19,6%), 15B (10,5%) y 19A (3,3%).

En el año 2008, aumenta notablemente la colonización nasofaríngea en niños llegando al 71,13%. Los principales serogrupos/serotipos circulantes fueron 6 (24,31%), 23F (10%), 19F (9,42%) y 19A (5,5%).

En este estudio se determinó que el estado de portador en infantes fue del 61,2%, con el serogrupo 6 como principal colonizador (22,2%), seguido por los serotipos 1 (11%), 14 (8,7%), 23F (7,6%), 16 (5,6%), 19F (5,2%) y 38 (4%).

Estos resultados demuestran que el serogrupo 6 se ha mantenido como principal colonizador de la nasofaringe en la etnia Warao, en los períodos 2004-2012, seguida de los

serotipos 23F y 19F (Rivero y col., 2013). También se evidencia que los serotipos 14 y 1 se han incrementado notablemente como colonizadores para el período 2012.

Es importante resaltar que existen serotipos que se denominan epidémicos que son capaces de diseminarse de forma aleatoria en la población cada cierto período de tiempo gracias a su gran capacidad de colonización nasofaríngea (Díaz-Conradi, 2008), como ocurre con los serogrupos/serotipos: 5, 15A, 23B, 29, 31, 35F, 38, y 45 en la etnia Warao del Estado Delta Amacuro.

Estos datos concuerdan con estudios llevados a cabo en la población criolla de Caracas, donde se encontró que los serogrupos/serotipos más frecuentes para el año 2011 fueron: el 6 (29%), 19A (13,8%), 23F (10%) y 14 (8,3%) (Rivera y col., 2011). En un estudio llevado a cabo por el Departamento de Medicina Interna de Chile, durante el 2007, donde tan sólo 2 serotipos correspondieron casi a la mitad de los biotipos prevalentes en la población: 14 y 6 (Altuzarra y col., 2007) y en Tailandia donde siete serotipos (19F, 23F, 6A/B, 14, 15B/C) representaron el 67% de los aislamientos obtenidos (Turner y col., 2012).

Los resultados de este estudio también concuerdan con los obtenidos en la etnia Panare del Estado Bolívar, en donde se observa que los principales serotipos de *S. pneumoniae* en la población, para el año 2008, fueron los serogrupos/serotipos 6 (55%), 33F (21,5%), 19A (3,1%) y 23F (1,5%) (Rivera y col., 2007). En los aborígenes Navajos y Apaches los serogrupos/serotipos circulantes en la población para el año 2009 fueron: 6A/B, 23F, 14, 19F, 19A y 9V (Millar y col., 2009).

Prevalencia de serogrupos/serotipos distribuidos en infantes por grupos etarios y su relación con la tasa de colonización de las madres

La colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* disminuye paulatinamente con el incremento de la edad. El grupo etario con mayor estado de portador fue el grupo comprendido entre los 0 a 6 meses con un 74,2%, seguido por el grupo etario de los 6 meses a los 2 años con un 67,2% y el grupo de 3 a 5 años con un 62,3%. En el grupo etario de 6 a 8 años la colonización nasofaríngea encontrada fue de 51,8%, mientras que en el grupo comprendido entre los 9 a 12 años fue de 47,5%. La tasa de colonización de las madres (> 15 años) alcanzó el 12,7%.

Los grupos de edad entre los 0 a 5 años suelen tener altas tasas de colonización nasofaríngea por su vulnerabilidad y su baja capacidad de respuesta inmunológica, lo que constituye la población diana de las diferentes vacunas conjugadas disponibles o por desarrollar. Existen además diversos factores de riesgo a la que está expuesta esta etnia, en particular los niños, lo que facilita la colonización nasofaríngea por este patógeno; por ejemplo la exposición continua al humo, inflama la mucosa nasofaríngea y se ha demostrado que hay un incremento en la biosíntesis del receptor PAF. Este último facilita la colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae*, lo cual puede conducir a desarrollar enfermedad neumocócica invasiva (Golda y col., 2011)

En el presente estudio, se establece que los serogrupos/serotipos 6, 1 y 14 son los más frecuentemente aislados en todos los grupos de edad (figura 15), especialmente en infantes, donde su frecuencia fue tres veces mayor que la observada en las madres. Algunos

autores han informado que los serotipos 1 y 14 son los más frecuentes en los niños debido al menor grado de madurez de su sistema inmunitario y a la menor inmunogenicidad de estos serotipos (Henriques-Normark, 2010).

El estrecho contacto en que viven las madres y los niños Warao puede facilitar la colonización de las mismas, por lo que es posible que jueguen un rol importante en la transmisión horizontal de *S. pneumoniae*. La distribución de *S. pneumoniae* en las 39 madres colonizadas y sus hijos se resume en la figura 18, donde se observa la distribución y frecuencia de serotipos compartidos en ambos grupos (madres e hijos). Sin embargo en el presente estudio se determinó que de 308 madres que participaron en el estudio, sólo 39 están colonizadas por *S. pneumoniae*. De estas 39, sólo 6 madres comparten el mismo serogrupo/serotipo con sus hijos. Situación similar se presenta en la población indígena Panare del Estado Bolívar, donde el mismo serotipo se identificó en 3 de los grupos madre-hijos colonizados (Rivera y col., 2010).

En una investigación llevada a cabo en Tailandia, en donde los investigadores se propusieron estudiar 234 madres con sus respectivos hijos para conocer la homología de serotipos compartidos en ambos grupos, encontraron que los serotipos comunes tanto en madres e hijos fueron el 14 y 19F. Sin embargo las madres adquirieron *S. pneumoniae* con menor frecuencia, y los llevaron por períodos de tiempo más cortos; el porcentaje de colonización de la nasofaringe en madres fue del 30,6%; y 29,6% de los aislados obtenidos en ellas fueron no tipificables. En el estudio se determinó que la edad media de la primera adquisición de *S. pneumoniae* en niños fue de 45,5 días y el estado de portador de la

nasofaringe por esta bacteria fue de 75,7% y 97% en niños de 0 a 3 meses y de 3 a 6 meses respectivamente (Turner y col., 2012).

Introducción de la vacunación contra *Streptococcus pneumoniae* en la población Warao.

La alta tasa de colonización encontrada junto con la alta mortalidad debida a infecciones respiratorias registradas en comunidades indígenas sugieren que los niños Warao están en riesgo de padecer enfermedad neumocócica, por lo tanto, al igual que la población en general, pueden beneficiarse con la vacunación.

La vacunación neumocócica ha sido introducida en otras poblaciones indígenas con gran éxito, como los Navajos, Apaches y en los aborígenes Australianos y Canadienses; reduciendo significativamente la incidencia en enfermedad neumocócica en niños y adultos. La Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) y el Fondo de Naciones Unidas para la Niñez (UNICEF), determinaron que la vacuna puede aplicarse en poblaciones de riesgo con altas tasas de colonización nasofaríngea e incluso debe ser incluida dentro del esquema de vacunación.

En el presente estudio se evaluó la circulación de serogrupos/serotipos de *S. pneumoniae* en la nasofaringe de niños y madres Warao en el Estado Delta Amacuro, permitiendo inferir la cobertura teórica de la vacuna antineumocócica conjugada 13-valente en estas comunidades y poder compararla en tres períodos de tiempo diferentes. En la

figura 23 se resume la cobertura teórica de la PCV-13, representando los serotipos cubiertos por la vacuna (VT) y los serotipos no cubiertos en ella (NVT).

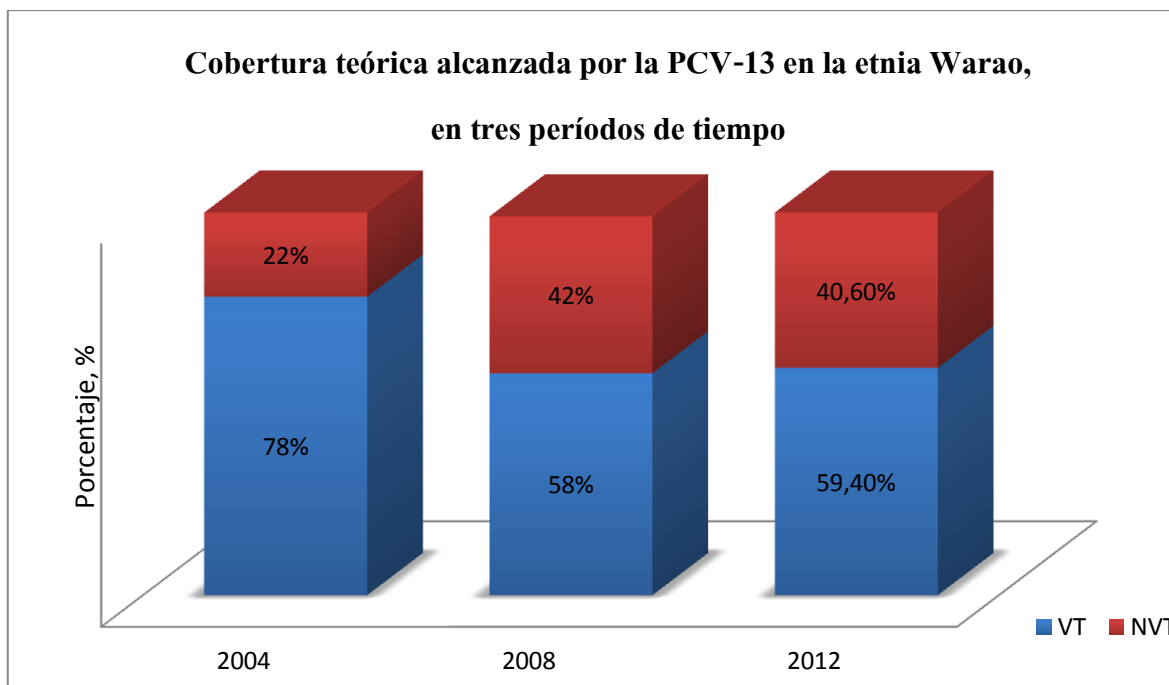


Figura 23. Cobertura teórica alcanzada por la PCV-13, en los años 2004, 2008 y 2012. Se representan los serotipos cubiertos por la vacuna (VT) y los serotipos no cubiertos en ella (NVT).

En el 2012, se observó que la cobertura teórica de la vacuna PCV-13 en comunidades pertenecientes a la etnia Warao alcanzó el 59,4%.

En el año 2004 la cobertura de la vacuna alcanzó el 78%, esta disminuye a un 58% en el 2008 (Sisco, 2010). Sin embargo en el estudio llevado por Rivera-Olivero en el 2004, no incluyeron en la investigación a las madres (Rivera-Olivero y col., 2007).

Durante el período 2000-2005 se estudió por métodos convencionales la distribución de 17.303 aislados de *S. pneumoniae* en Países de América Latina y el Caribe, con el fin de conocer la cobertura teórica global de las vacunas antineumocócicas

conjugadas. Las coberturas potenciales de las vacunas conjugadas antineumocócicas hepta y tridecavalentes fueron de 59,0% y 85,9%, respectivamente (Gabastou y col., 2008). Lo que sugiere que la variabilidad temporal y geográfica de los serogrupos/serotipos, la emergencia de serotipos y el reemplazo en la colonización nasofaríngea, justifican la necesidad de vacunas antineumocócicas que cubran un mayor número de serotipos.

Si bien la distribución de los serotipos de *S. pneumoniae* es estable en toda América Latina, no es homogénea entre los países. Estudios previos, tanto en esta subregión como en algunos países específicos como Argentina, Cuba, Colombia, Costa Rica, México, Perú y Venezuela, han demostrado una alta heterogeneidad en la distribución geográfica de los serotipos de este patógeno. Esta heterogeneidad entre países, confirmada por la Organización Panamericana de la Salud en el Informe Regional de SIREVA, dificulta la aplicación de esquemas comunes de vacunación. Las notables diferencias observadas entre los países latinoamericanos y norteamericanos tienen implicaciones importantes para la cobertura de las diferentes vacunas conjugadas antineumocócicas según los serotipos circulantes. Por ejemplo, aunque la vacuna heptavalente (serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) cubre entre 80% y 97,7% de los casos que se producen en niños menores de 6 años en los Estados Unidos, cubriría solamente 59% (de 41% a 77,4%) de los casos en ese grupo de edad en América Latina y el Caribe (Sierra-Fernández y col., 2006; Gabastou y col., 2008).

El Sistema de Redes de Vigilancia de los Agentes Responsables de Neumonías y Meningitis Bacterianas, decidió desde 1999 implementar un sistema de vigilancia epidemiológica sobre la enfermedad neumocócica invasiva en la población en general. Se

trata de un estudio multicéntrico realizado en 19 países de América Latina y 4 países del Caribe, en los que se incluyen: datos epidemiológicos, variables clínicas y variables microbiológicas de los casos en lo que se ha podido aislar *S. pneumoniae*. El objetivo de este sistema de vigilancia es monitorizar las tasas de enfermedad neumocócica invasiva según los diferentes serotipos y clones; monitorizar la resistencia antimicrobiana y analizar los factores asociados a la enfermedad producida por diferentes serotipos y clones.

Los resultados de éste y de otros sistemas de vigilancia nos ayudarán a conocer los serotipos productores de enfermedad neumocócica en cada grupo de edad así como las clonas que lo determinan; conocer la evolución de la enfermedad y poder no sólo implementar la vacuna más eficaz, sino analizar la patología clínica predominante de cada serotipo así como la resistencia a los antibióticos de aquellos serotipos causantes de enfermedad neumocócica invasiva.

CONCLUSIONES

- ✓ El estado de portador en los integrantes de la etnia Warao fue de 46,04%, con 414 niños, de 0 a 12 años colonizados (61,2%) y 39 madres, > 15 años (12,7%). Esta alta tasa de colonización por *Streptococcus pneumoniae*, convierte a la población en riesgo para el desarrollo de enfermedades neumocócicas.
- ✓ El grupo etario con mayor estado de portador fue el grupo comprendido entre los 0 a 2 meses alcanzando una tasa de colonización nasofaríngea del 74,2%, seguido por el grupo etario de los 7 meses a 2 años con un 67,2% y el grupo etario de 3 a 5 años con un 62,3%; en el grupo de los 6 a 8 años la colonización nasofaríngea fue del 51,8%, mientras que en el grupo comprendido entre los 9 a 12 años alcanzó el 47,5%; demostrando nuestros resultados que la colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* disminuye con el incremento de la edad.
- ✓ En este estudio se determinó que el estado de portador en infantes fue del 61,2%, con el serogrupo 6 como principal colonizador (22,2%), seguido por los serotipos 1 (11%), 14 (8,7%), 23F (7,6%), 16 (5,6%), 19F (5,2%) y 38 (4%).
- ✓ En madres el serotipo 1 es el principal colonizador con un 15% seguido por los serogrupos/serotipos 6 (8%) y 19A (8%).
- ✓ Al comparar los serogrupos/serotipos de *S. pneumoniae* en tres períodos de tiempo diferentes, se observa que el serogrupo 6 se ha mantenido como el principal colonizador de la nasofaringe, en comunidades pertenecientes a la etnia Warao.

También se evidencia que los serotipos 14 y 1 se han incrementado notablemente como colonizadores, para el año 2012.

- ✓ Los resultados demuestran una población de *S. pneumoniae* muy dinámica, con variación en el tiempo, pero que mantiene cifras altas de colonización nasofaríngea, por lo tanto, los serotipos encontrados implican teóricamente una cobertura del 59,4% de la vacuna antineumocócica conjugada 13-valente, lo que sugiere que la población Warao podría beneficiarse con un programa de vacunación.
- ✓ La variabilidad temporal y geográfica de los serogrupos/serotipos, la emergencia de serotipos y el reemplazo en la colonización nasofaríngea, justifican la necesidad de vacunas antineumocócicas que cubran un mayor número de serotipos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bibliográficas:

- Altman, D.G. 1991. Practical statistics for medical research. 624 pp. London: Chapman & Hall.
- Altuzarra, H., Valenzuela, B., Trucco, A., Inostroza, J., Granata, P., Fleiderman, J. 2007. Portación nasal de *Streptococcus pneumoniae* en adulto mayor y su respuesta frente a la vacunación antineumocócica. *Rev Méd Chile* **135**: 160-166
- Arguedas, A., Abdelnour, A., Soley, C., Jimenez, E., Jimenez, A., Ramcharran, D., Porat, N., Dagan, R., Gray, S., Gail, L. 2012. Vigilancia epidemiológica prospectiva de la enfermedad neumocócica invasora y de la neumonía en niños de San José, Costa Rica. *Acta méd. costarric* **54** (4) 123-125
- Attali, C., Durmort, C., Vernet, T.; Di Guilmi, A.M. 2008. The interaction of *Streptococcus pneumoniae* with plasmin mediates transmigration across endothelial and epithelial monolayers by intercellular junction cleavage. *Infect Immun* **76**: 5350–5356
- Barnard, J.P.; Stinson, M.W. 1996. The alpha-hemolysin of *Streptococcus gordonii* is hydrogen peroxide. *Infect Immun* **64**: 3853–3857.
- Bentley, S.D., Aanensen, D., Mavroidi, A., Saunders, D., Rabinowitsch, E., Collins, M. 2006. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet* **2**: e31.
- Bernheimer, H.P.; Wermundsen, I.E. 1972. Homology in capsular transformation reactions in *Pneumococcus*. *Mol Gen Genet* **116**: 68–83.
- Brzin, B. 1969. Reversion of α - into β -hemolysis of *Diplococcus pneumoniae* by low concentration of optochin. *Experientia* **25**: 985–986
- Burnaugh, A.M., Frantz, L.J.; King, S.J. 2008. Growth of *Streptococcus pneumoniae* on human glycoconjugates is dependent upon the sequential activity of bacterial exoglycosidases. *J Bacteriol* **190**: 221–230
- Canción, J.Y., Nahm, A., Moseley, M.A. 2013. Clinical implications of pneumococcal serotypes: invasive disease potential, clinical presentations, and antibiotic resistance. *J Korean Med Sci.* **28**(1):4-15.
- Carvalho, M., Pimenta, F., Delois, J., Roundtree, A., O'Brien, K., Whitney, C., Beall, B. 2010. Revisiting Pneumococcal Carriage by Use of Broth Enrichment and PCR Techniques for Enhanced Detection of Carriage and Serotypes. *J Clin Microbiol.* **48**(5): 1611–1618.
- Centers for disease control and prevention. Licensure of a 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine (PCV-13) and Recommendations for Use Among Children; Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). 2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report*.

- Chester, F.D. 1901. A manual of determinative bacteriology. The MacMillan Co., New York, E.U.A.
- Coonrod, J.D., Varble, R., Yoneda, K. 1991. Mechanism of killing of pneumococci by lysozyme. *J Infect Dis* **164**: 527–532.
- Cortes, P. R., Albarracín, A., Regueira, E., Echenique, J. 2008. Characterization of In Vitro-Generated and Clinical Optochin-Resistant Strains of *Streptococcus pneumoniae* Isolated from Argentina. *J Clin Microbiol* **12**:80-84.
- Dejana, E., Orsenigo, F., Lampugnani, M.G. (2008) The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* **121**: 2115–2122.
- Dias, C.A., Texeira, L.M., Carvalho, M.G., Beall, B. 2007. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotype of pneumococci recovered from Brazilian children. *J. Med. Microbiol.* **56**(9):1185-1188
- Díaz-Conradi, A. 2008. Colonización nasofaríngea y enfermedad invasiva por *Streptococcus pneumoniae* en niños menores de 5 años. Tesis de Doctorado, Universidad de Barcelona-España.
- Donkor, E.S. 2013. Understanding the pneumococcus: transmission and evolution. *Front Cell Infec. Microbiol.* **3**:7.
- Fang, Ho., Tzoun-Yien, L. 2005. Pneumococcal Vaccines. *Chang. Gung. Med. J.* **28**:765-772
- Feldman, C., Mitchell, T.J., Andrew, P.W., Boulnois, G.J., Read, R.C., Todd, H.C. 1990. The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium *in vivo*. *Microb Pathog* **9**: 275–284.
- Feldman, C., Anderson, R., Cockeran, R., Mitchell, T., Cole, P. y Wilson, R. 2002. The effects of pneumolysin and hydrogen peroxide, alone and in combination, on human ciliated epithelium *in vitro*. *Respir Med* **96**: 580–585.
- Fuentes Páez Y., Martínez Motas, I., Sierra González, G., Izquierdo, L., López, O., Valdés Hernández, MJ. 2009. Colonización faríngea por bacterias potencialmente patógenas en niños sanos de una escuela primaria. *Rev Cubana Med Trop* **61**(1): 1
- Gabastou, JM., Agudelo, C., Cunto, C., Castañeda, E., Silva, A., Di Fabio, L. 2008. Caracterización de aislamientos invasivos de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *N. meningitidis* en América Latina y el Caribe: SIREVA II, 2000–2005. *Rev Panam Salud Pública* **24**(1): 1-15
- García, S., Levine, O. 2006. Enfermedad neumocócica y vacunación antineumocócica en las Américas: Programa de acción para la introducción acelerada de vacunas. *Rev Panam Salud Pública*, **19**(5):340-348.
- Golda, A., Malek, N., Dudek, B., Wojarski, J., Ochman, M. 2011 Infection with human coronavirus NL63 enhances streptococcal adherence to epithelial cells. *J Gen Virol* **92**: 54-56

- González, B., Rivera-Olivero, I., de Waard, J. 2010. Estado de portador nasofaríngeo de *Streptococcus pneumoniae* en madres e hijos de la población indígena Panare del estado Bolívar, Venezuela. *Rev. Argent. Microbiol.* **42**: 30-34.
- Gram, C. 1884. Ueber die isolirte färbung der schizomycetes in schnitt- und trockenpräparaten. *Fortschr Med* **2**:185–189
- Hanquet, G., Kissling, E., Lepoutre, A. 2010 Pneumococcal serotypes in children in 4 European countries. *Emerg Infect Dis* **16**:1428-1439.
- Helferty, M., Rotondo, JL., Martin, I., y Desai, S. 2013 The epidemiology of invasive pneumococcal disease in the Canadian North from 1999 to 2010. *Int J Circumpolar Health.* **5**:72
- Henrichsen, J. 1995 Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* **33**:2759–2762
- Henriques, B., Kalin, M., Örtqvist, Å., Olsson Liljequist, B., Almela, M., Marrie, T.J. 2000. Molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in 5 countries. *J Infect Dis* **182**: 833–839.
- Henriques-Normark, B. y Normark, S. 2010. Commensal pathogens, with a focus on *Streptococcus pneumoniae*, and interactions with the human host. *Exp Cell Res* **316**: 1408–1414.
- Hernández, C. 2009. Pueblos Indígenas de Venezuela. Warao. Editorial Santillana; Caracas-Venezuela.
- Hsieh, Y., Lee, W., Shao, P., Chang, L., Huang, LM. 2008 The transforming *Streptococcus pneumoniae* in the 21st century. *Chang. Gung. Med. J.* **31**:117-124.
- Hurtado, A., Hill, K. 2001. La salud comprometida de los indígenas suramericanos: necesidad de su estudio bajo normas éticas. *Interciencia* 26 (4):166-169
- Jeong, J.K., Kwon, O., Lee, Y.M., Oh, D.-B., Lee, J.M., Kim, S. 2009. Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* BgaC protein as a novel surface β -galactosidase with specific hydrolysis activity for the Galb1-3GlcNAc moiety of oligosaccharides. *J Bacteriol* **191**: 3011–3023.
- Jourdain, S., Drèze, P., Vandeven, J., Verhaegen, J., Van Melderen, L., Smeesters, P. 2011. Sequential multiplex PCR assay for determining capsular serotypes of colonizing *S. pneumoniae*. *BMC Infectious Diseases* **11**:100
- Kacou-N'douba, A., Okpo-Ekaza E., Pakora-Koffi, S. 2010. Emergence of optochin resistance among *S. pneumoniae* strains colonizing healthy children in Abidjan. *Indian J Med Microbiol* **28**:80-81.

- Kadioglu, A. 2008. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol.* **6**(4):288-301.
- Kim, J.O., Romero-Steiner, S., Sørensen, U.B.S., Blom, J., Carvalho, M., Barnard. 1999. Relationship between cell surface carbohydrates and intrastrain variation on opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **67**: 2327–2333.
- King, S.J. 2010 Pneumococcal modification of host sugars: a major contributor to colonization of the human airway? *Mol Oral Microbiol* **25**: 15–24.
- King, S.J., Hippe, K.R. y Weiser, J.N. 2006. Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **59**: 961–974.
- Klein, E. 1884. Micro-organisms and disease. *Practitioner.* **XXXII**: 321–352.
- Lawrence, E.R. y Días, T. 2003 Evaluation of semiautomated multiplex PCR assay for determination of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and serogroups. *J Clin Microbiol.* **41**(2):601-607.
- Lehmann, D., Willis, J., Moore, HC., Giele, C., Murphy, D., Keil, AD., Harrison, C., Bayley, K., Watson, M., y Richmond, P. 2010 The changing epidemiology of invasive pneumococcal disease in aboriginal and non-aboriginal western Australians from 1997 through 2007 and emergence of nonvaccine serotypes. *Clin Infect Dis.* **50**(11):1477-1486.
- Lund, E. 1970. On the nomenclature of the pneumococcal types. *Int. J. Syst. Bacteriol* **20**: 321–323.
- Madigan, T.M., Martinkon, J., Parker, J. 2010 Brock: Biología de los microorganismos. Decima Edición, Editorial Pearson, Santa Fe de Bogotá, Colombia.
- Mavroidi, A., Aanensen, DC., Godoy, D., y Spratt B. 2007. Genetic relatedness of the *S. pneumoniae* capsular biosynthetic loci. *J. Bacteriol.* **189**(21) 7841-7855).
- Mercado, E., Egovail, M., Horna, N., Torres, N. 2012. Serotipos de neumococo en niños portadores antes de la vacunación antineumocócica en el Perú. *Rev Peru Med Exp* **29**(1):53-60.
- Millar, E., O'Brien, L., Zell, ER., Bronsdom, M., Reid, R., y Santosham M., 2009. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Navajo and White Mountain Apache children before introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* **28**(8)711-716
- Mindy- Perilla, J. 2004. Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. Manual elaborado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Cuarta Edición, Atlanta, Georgia, E.U.A.

- Mitchell, A., Mitchell T. 2010. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence Factors and Variation. *Clin. Microbiol. Infec.* **16**(5): 411-418
- Molmes, D.S., Quigley, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem.* **114**(1):193-197.
- Moraga, F. 2009. Enfermedad neumocócica en la era vacunal y emergencia de serotipos. ¿Tendencias temporales y reemplazo de serotipos? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **27**(1):1-4.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M. 2009. Inmunobiología de JANEWAY. Mc Graw Hill, Séptima Edición. Buenos Aires, Argentina.
- Nelson, A.L., Roche, A.M., Gould, J.M., Chim, K., Ratner, A.J., Weiser, J.N. 2007. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect Immun.* **75**(1):83-90.
- Obando, I., Sánchez-Tatayb, T., Molinos-Quintana, A., Delgado-Pecellina, A., Morillo-Gutiérrez, B., Fenolld. A., y Lirola, M. 2011. Epidemiología de la colonización nasofaríngea por *Streptococcus pneumoniae* en niños menores de 6 años de la ciudad de Sevilla. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **29**(8):581-586
- O'Brien, KL., Bronsdon, MA., Dagan, R., Yagupsky, P., Janco, J., Elliott J., Schwartz, B., Carlone, GM. 2001. Evaluation of a medium (STGG) for transport and optimal recovery of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal secretions collected during field studies. *J Clin Microbiol.* **39**(3):1021-1024.
- Pai, R., Gertz, R.E., Beall, B. 2006 Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol.* **44**(1): 124- 131.
- Park, IH., Pritchard, DG, Cartee, R., Brandao, A., Brandileone, M. 2007. Discovery of a new capsular serotype 6C within serogroup 6 of *S. pneumoniae*. *J. Clin Microbiol.* **45**(4) 1225-1230
- Pancholi, V., Fontan, P. y Jin, H. (2003) Plasminogen-mediated group A streptococcal adherence to and pericellular invasion of human pharyngeal cells. *Microb Pathog* **35**: 293-303.
- Picazo J., Ruiz-Contreras, J., Casado-Flores, J., Giangaspro, E., Del Castillo, F., Hernández-Sampelayo, T. 2011 Relationship between serotypes, age, and clinical presentation of invasive pneumococcal disease in Madrid, Spain, after introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine into the vaccination calendar. *Clin Vaccine Immunol.* **18**:89-94.
- Pimenta, F., Gertz, E. Jr., Roundtree, A. 2009. Rarely Occurring 19A-Like Locus from a Serotype 19F Pneumococcal Isolate Indicates Continued Need of Serology-Based Quality Control for PCR-Based Serotype Determinations. *J Clin Microbiol.* **47**(7): 2353-2354.
- Rísquez, A., Echezuría, L. 2006. Morbi-mortalidad por influenza y neumonía de los adultos en Venezuela. *Rev. Fac. Med.* **32**(1):59-66

- Rivera-Olivero I., Bello, T., Pocaterra, L., Spadola, E., de Waard, J., Hermans, M. 2010. Estado de portador nasofaríngeo de *Streptococcus pneumoniae* en madres e hijos de la población indígena Panare del estado Bolívar, Venezuela. menores de 5 años en Venezuela (1999-2007). *Rev Inst Nac Hig "Rafael Rangel"*, **40**(2):36-43.
- Rivera-Olivero, I., Bogaert, D., Bello, T., de Waard, J.H. 2007. Pneumococcal Carriage among Indigenous Warao Children in Venezuela: Serotypes, Susceptibility Patterns, and Molecular Epidemiology. *Clin Infect Dis* **45**(11):1427-1434.
- Rivera-Olivero I., del Nogal, B., Sisco, MC., Bogaert, D., Hermans, M., de Waard, J. 2011. Transporte y aislamientos invasores de *Streptococcus pneumoniae* en Caracas, Venezuela: la invasividad relativa de serotipos y la cobertura de vacunación. *European J Clin Microbiol* **30**(12):1489-1495
- Rivero, RA., Sisco, MA., Rivera-Olivero, I., Gómez, K., Ramírez, R., del Nogal, B., Verhagen, L., de Waard, J. 2013. Estabilidad temporal de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en la nasofaringe de niños y madres Warao en el Estado Delta Amacuro, Venezuela. *Rev. Soc Ven Microbiol* **33**(1)
- SA-Leão, R., Brito-Avô, A., Frazão, N., Simões, A. S. 2009. Changes in pneumococcal serotypes and antibiotypes carried by vaccinated and unvaccinated day-care centre attendees in Portugal, a country with widespread use of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Microbiol Infect* **15**:100-1007.
- Sambrook, J., Fritsch F., Maniatis, T. 1989 Molecular cloning: a laboratory manual, Volumen 1. Segunda Edición, Editorial, Cold Spring Harbor Laboratory, Michigan, E.U.A.
- Santos, F., Ortiz-Ocampo, L., Miranda-Novales, M., Echániz-Avilés, G., Soto-Noguerón, A., Guiscafré-Gallardo, H. 2005. Serotipos prevalentes de *Streptococcus pneumoniae* colonizadores de nasofaringe, en niños del Distrito Federal. *Salud Pub. Méx* **47**(4)
- Sierra-Fernández, H., Schultz-Faingezicht, M., Soley-Gutiérrez, C., Guevara- Jiménez, S., Arguedas- Mohs, A. 2006. Estado actual de la vacuna conjugada contra *Streptococcus pneumoniae*. *Acta. Méd. Costarric* **48**(2): 4-8
- Shimada, J., Moon, S.K., Lee, H.-Y., Takeshita, T., Pan, H., Woo, J.-I. *et al.* (2008) Lysozyme M deficiency leads to an increased susceptibility to *Streptococcus pneumoniae*-induced otitis media. *BMC Infect Dis* **8**:134.
- Sisco, Ma.C., 2010. Dinámica de la colonización nasofaríngea por *Streptococcus pneumoniae* en comunidades indígenas Warao del estado Delta Amacuro. Tesis de Maestría, Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela.
- Skerman, V.B.D., McGowan, V. y Sneath, P.H.A. 1980. Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol* **30**: 225–420

- Sternberg, G.M. 1881. A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human saliva. An experimental research. *Natl Board Health Bull* **2**: 781–783.
- Tong, H.H., James, M., Grants, I., Liu, X., Shi, G. y DeMaria, T.F. 2001. Comparison of structural changes of cell surface carbohydrates in the eustachian tube epithelium of chinchillas infected with a *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase-deficient mutant or its isogenic parent strain. *Microb Pathog* **31**: 309–317
- Verhagen, LM., Gómez-Castellano, K., Snelders E., Rivera-Olivero, I., Pocater, L., Melchers W., de Waard, J., Hermans P. 2013. Respiratory infections in Eñepa Amerindians are related to malnutrition and *Streptococcus pneumoniae* carriage. *J Infect.* **67**(4):273-281
- Vera, C. 2010. Estado de portador de neumococo en niños y su relación con la enfermedad invasiva: ¿Qué ha cambiado tras la introducción de la vacuna conjugada? *J Infect.* **20**(4):22-24
- Vestheim, D., Lovoll, O., Aaberge, I. 2008. Effectiveness of a 2+1 dose schedule pneumococcal conjugate vaccination programme on invasive pneumococcal disease among children in Norway. *Vaccine.* **26**(26):3277-3281
- von Gottberg, A., Cohen, C., de Gouveia, L., Meiring, S., Quan, V., Whitelaw, A., Crowther-Gibson, P., Madhi, S.A., Whitney, C.G., Klugman, K.P. 2013. Epidemiology of invasive pneumococcal disease in the pre-conjugate vaccine era: South Africa, 2003-2008. *Vaccine* **1**(13):4.
- Watt, JP., O'Brien, KL., Benin, AL., McCoy, SI., Donaldson, CM., Reid, R., Schuchat, A., Zell, ER., Hochman, M., Santosham, M. 2007. Risk factors for invasive pneumococcal disease among Navajo adults. *Am J Epidemiol.* **166**(9):1080-1087.
- Weichselbaum, A. 1886 Ueber die aetiologie der acuten lungen- und rippenfellentzündungen. *Med Jahrb* **82**:483–554.
- Whitney, C.G., Farley, M.M., Hadler, J., Lynfield, R., Pilishvili, T., Schuchat, A. 2003. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med.* 2003 **1**(18):1737-1746.

Electrónicas:

- Active Bacterial Core Surveillance Report, 2008 <http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/surv-reports.html> (Consulta 10 de enero 2014)
- Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CCPF). 2000. Prevención de la enfermedad neumocócica en lactantes y niños pequeños: recomendaciones del Comité Asesor sobre Prácticas de Inmunización (ACIP). *Morb Mortal Wkly Rep* **49**: 1-35 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles>. (consulta 06 de junio 2013).
- Coskun-Ari, F., Guldemir, D., Durmaz, R. 2012. One-step multiplex PCR assay for detecting *Streptococcus pneumoniae* serogroups/types covered by 13-valent pneumococcal conjugate

vaccine (PCV13). *PLoS One*. 7(12). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3514308/> (Consulta 06 de junio 2013).

- García. M.V. 2008. La cápsula de neumococo: la clave para la Genética y herramienta para vacunas. <http://www.madrimasd.org/blogs/microbiologia/2008/06/23/95314> (Consulta 05 de junio 2013)
- Grady, K.F., Carlin, J.B., Torzillo, P.J. 2001 Eficacia de la vacuna antineumocócica conjugada heptavalente contra la neumonía diagnosticada radiológicamente en lactantes indígenas en Australia. Boletín de la Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/bulletin/volumes/88/2/09-068239-ab/es/> (visita 1 de Mayo de 2013)
- Noda, A., Lázano, A., Tallet, J. 2002. *Streptococcus pneumoniae*, mechanisms of antimicrobial resistance. Sociedad Iberoamericana de Información Científica, SIIC [www.sociedadiberoamericana.com/Streptococcus pneumoniae.com](http://www.sociedadiberoamericana.com/Streptococcus_pneumoniae.com) (visita 11 de enero de 2013).
- Turner, P., Turner, C., Jankhot, A., Helen, N., Lee, SJ. 2012. Un estudio longitudinal de *Streptococcus pneumoniae* del carro en una cohorte de niños y de sus madres en la frontera entre Tailandia y Myanmar *PLoS One*. 7(5) <http://www.plosone.org/article/citationList.action;jsessionid=B1E90D817DA84518BC32521A7A9F2622?articleURI=info:doi/10.1371/journal.pone.0038271> (Consulta 23 de enero de 2014)

ANEXOS



INFORME DE UTILIDAD TERAPÉUTICA VACUNA ANTINEUMOCÓCICA CONJUGADA DE 13 SEROTIPOS, PREVENAR 13

Este informe está destinado al personal sanitario

Fecha de elaboración del informe: 11 de abril de 2013

Versión 3

Resumen

La vacuna Prevenar 13, de la compañía Pfizer Inc, anteriormente Wyeth Lederle Vaccines S.A. fue aprobada por procedimiento centralizado en diciembre de 2009^{1,2}.

Prevenar 13 es una vacuna conjugada frente a los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, constituida por dichos serotipos conjugados covalentemente cada uno de ellos a 2,2 microgramos de la proteína transportadora CRM₁₉₇ de *Corynebacterium diphtheriae*, excepto el serotipo 6B con 4,4 microgramos, y adsorbidos en fosfato de aluminio. Se presenta como suspensión inyectable.

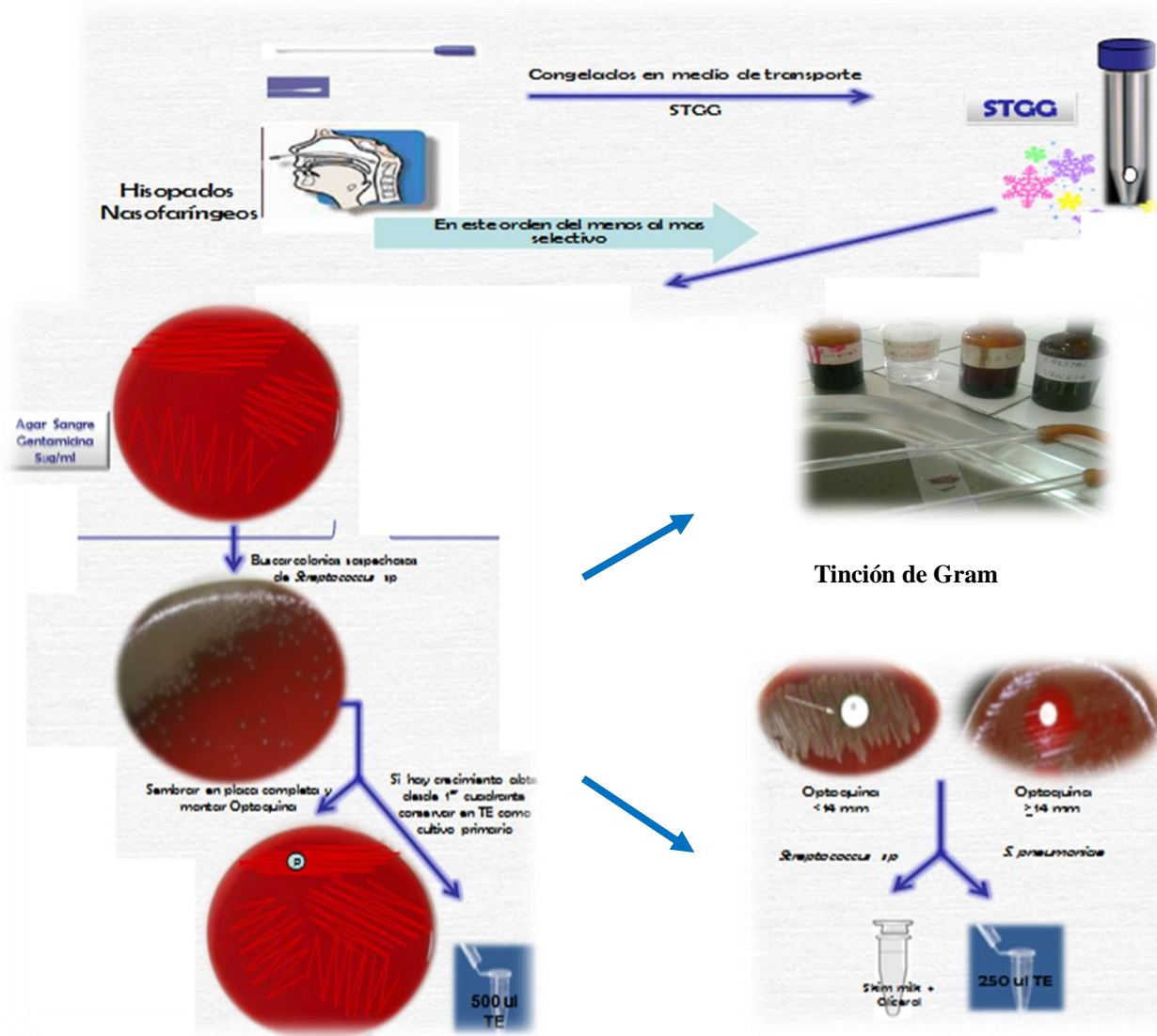
Indicaciones

Prevenar 13 está indicado en la inmunización activa para la prevención de enfermedad invasora, neumonía y otitis media aguda causadas por los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* incluidos en la vacuna en lactantes y niños desde las 6 semanas hasta los 17 años de edad.

Inmunización activa para la prevención de la enfermedad invasiva causada por *S. pneumoniae* en adultos de 50 años de edad y mayores.

Anexo 1. Características de la Vacuna Antineumocócica Conjugada 13-Valente.

Flujograma de Procesamientos de Hisopados Nasofaríngeos



Anexo 2. Criterio de selección de diferentes cepas siguiendo los lineamientos del **flujograma de procesamientos de hisopados nasofaríngeos**. Obteniendo colonias de *Streptococcus pneumoniae*, para aplicarle métodos moleculares, (PCR múltiple)

**CONSENTIMIENTO INFORMADO
INMUNIZACIÓN CON LA VACUNA ANTI-NEUMOCÓCCICA EN LA POBLACION WARAO.**

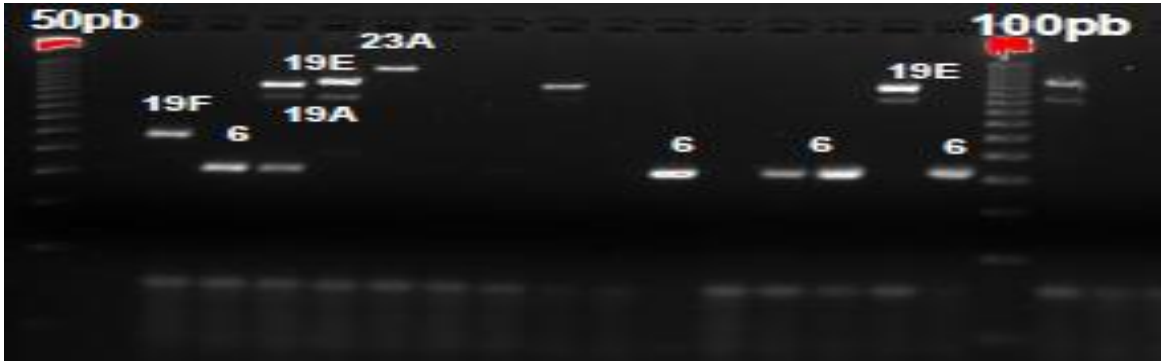
Yo, Representante Legal de David Lugo, siendo mayor de 18 años, en uso pleno de mis facultades mentales y sin que medie coacción ni violencia alguna, en completo conocimiento naturaleza, forma, duración, propósito, inconvenientes y riesgos relacionados con el estudio que mas abajo indico, declaro mediante la presente:

- 1.- Haber sido informado de manera objetiva, clara y sencilla, de todos los aspectos relacionados al proyecto de investigación titulado 'Inmunización con la vacuna anti-neumocócica en la población Warao.'
- 2.- Tener conocimiento claro de que los objetivos del trabajo antes señalado son evaluar la eficacia de la vacuna PCV13 en la población Warao
- 3.- Conocer bien el protocolo experimental expuesto por el investigador; en el cual se establece que la participación de mi Representado en el trabajo consiste en la toma de muestras de sangre, orina y exudado nasofaríngeo.
- 4.- Que las muestras que acepto sea donada por mi Representado así como la información suministre al equipo de Investigadores coordinados por el jefe del Proyecto de J.H. de Waard, será utilizada unica y exclusivamente para determinar la eficacia de la vacuna PCV13
- 6.- Que el equipo de investigadores me ha garantizado confidencialidad relacionada tanto a mi identidad como de cualquier información relativa Representado a la que tengan acceso por concepto de su participación en el proyecto antes mencionado.
- 7.- Que bajo ningún concepto podré restringir el uso, para fines académicos, de los resultados obtenidos presente estudio y que autorizo al equipo responsable del estudio a la difusión parcial o total de los resultados obtenidos en el mismo.
- 8.- Que la participación de mi Representado en dicho estudio no implica riesgo ni inconveniente alguno para su salud.
- 9.- Que cualquier pregunta que yo tenga en relación con este estudio, me será respondida oportunamente parte del equipo de investigadores antes mencionado.
- 10.- Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido ni pretendo recibir ningún beneficio de tipo económico producto de los hallazgos que puedan producirse en el referido proyecto de investigación. Que los resultados de las pruebas realizadas a mi representado me serán entregados oportunamente.

Yo, Ebarista como representante legal del niño David de 1 años de edad, de la COMUNIDAD: Baruma estoy de acuerdo con la participación de mi representado en este proyecto, y permito la evaluación clínica, así como la obtención de muestras de sangre, heces orina y exudado nasofaríngeo de mi representado, para su análisis por parte de los responsables de la ejecución de este proyecto. He sido informado que recibiré copias de todas las evaluaciones clínicas y exámenes de laboratorio de rutina que sean practicados a mi representado. Cabe destacar que el niño ha recibido información y se le solicitará su cooperación para realizar las evaluaciones necesarias.
CUALQUIER INFORMACION ADICIONAL COMUNICARSE CON J.H. de Waard o L.M. Verhagen.

<u>Ebarista Flori</u> Nombre del representante legalmente autorizado	 firma/huella	<u>7-7-12</u> fecha
Nombre del paciente	firma/huella	fecha
<u>J. Burghouts</u> Nombre del testigo	 firma/huella	<u>7-7-12</u> fecha
<u>Lilly Verhagen</u> Nombre del Investigador	 firma/huella	<u>7-7-12</u> fecha

Anexo 3. Consentimiento informado. Documento que firman los voluntarios pertenecientes a la etnia Warao del estado Delta Amacuro, que aceptan ser parte del estudio.



Anexo 4. Resultado de una PCR Múltiple por reacción 1. Se observa la corrida de un gel de agarosa al 3%, con distintos aislados de *S. pneumoniae* logrando identificar varios serotipos, como se aprecia en la fotografía. A los extremos están los marcadores de peso molecular de 50 y 100pb (Promega®).



Anexo 5. Resultado de una PCR Múltiple por reacción 2. Se observa la corrida de un gel de agarosa al 3%, con distintos aislados de *S. pneumoniae* logrando identificar varios serotipos, como se aprecia en la fotografía. C+ (control positivo, serotipo 14), C- (control negativo, mezcla de PCR y agua). 50pb y 100pb (Marcadores de Peso Molecular).



Anexo 6. Resultado de una PCR Múltiple por Reacción Triple. Se observa la corrida de un gel de agarosa al 3%, con distintos aislados de *S. pneumoniae* logrando identificar varios serotipos, como se aprecia en la fotografía. C+ (control positivo, serotipo 23F y 9V/A), C- (control negativo, mezcla de PCR y agua). 100pb (Marcador de Peso Molecular).

Tabla 5. Secuencia de cebadores empleados en la PCR múltiple para la serotipificación de *S. pneumoniae*

	Cebador	Secuencia 5'-3'	Referencia
Rx. 1	23A-for	TAT TCT AGC AAG TGA CGA AGA TGC G	Dias y col., 2007
	23A-rev	CCA ACA TGC TTA AAA ACG CTG CTT TAC	
	19E-for	TGA CAA TTC TGG TTG ACT TGT TG	CDC, 2008
	19E-rev	AGT ACG GGT ACC AAG GAT TCA C	
	19A-for	GAG AGA TTC ATA ATC TTG CAC TTA GCC A	Pimenta, 2009
	19A-rev	CAT AAT AGC TAC AAA TGA CTC ATC GCC	
Rx. 2	19F-for	GTT AAG ATT GCT GAT CGA TTA ATT GAT ATC C	Pai y col., 2006
	19F-rev	GTA ATA TGT CTT TAG GGC GTT TAT GGC GAT AG	
	6-for	AAT TTG TAT TTT ATT CAT GCC TAT ATC TGG	Pai y col., 2006
	6-rev	TTA GCG GAG ATA ATT TAA AAT GAT GAC TA	
	16F-for	GAA TTT TTC AGG CGT GGG TGT TAA AAG	Carvalho, 2010
	16F-rev	CAG CAT ATA GCA CCG CTA AGC AAA TA	
Rx. 3	38-for	CGT TCT TTT ATC TCA CTG TAT AGT ATC TTT ATG	CDC, 2008
	38-rev	ATG TTT GAA TTA AAG CTA ACG TAA CAA TCC	
	15B/C-for	TTG GAA TTT TTT AAT TAG TGG CTT ACC TA	Pai y col., 2006
	15B/C-rev	CAT CCG CTT ATT AAT TGA AGT AAT CTG AAC C	
	34-for	GCT TTT GTA AGA GGA GAT TAT TTT CAC CCA AC	CDC, 2008
	34-rev	CAA TCC GAC TAA GTC TTC AGT AAA AAA CTT TAC	
Rx. 4	33F-for	GAA GGC AAT CAA TGT GAT TGT GTC GCG	Pai y col., 2006
	33F-rev	CTT CAA AAT GAA GAT TAT AGT ACC CTT CTA C	
	14-for	GAA ATG TTA CTT GGC GCA GGT GTC AGA ATT	Dias y col., 2007
	14-rev	GCC AAT ACT TCT TAG TCT CTC AGA TGA AT	
	10A-for	GGT GTA GAT TTA CCA TTA GTG TCG GCA GAC	Pail y col., 2006
	10A-rev	GAA TTT CTT CTT TAA GAT TCG GAT ATT TCT C	
Rx. 5	35F-for	GAA CAT AGT CGC TAT TGT ATT TTA TTT AAA GCA A	CDC, 2008
	35F-rev	GAC TAG GAG CAT TAT TCC TAG AGC GAG TAA ACC	
	4-for	CTG TTA CTT GTT CTG GAC TCT CGA TAA TTG G	Pai y col., 2006
	4-rev	GCC CAC TCC TGT TAA AAT CCT ACC CGC ATT G	
	3-for	ATG GTG TGA TTT CTC CTA GAT TGG AAA GTA G	CDC, 2008
	3-rev	CTT CTC CAA TTG CTT ACC AAG TGC AAT AAC G	
Rx. 6	1-for	CTC TAT AGA ATG GAG TAT ATA AAC TAT GGT TA	CDC, 2008
	1-rev	CCA AAG AAA ATA CTA ACA TTA TCA CAA TAT TGG C	
	22F-for	GAG TAT AGC CAG ATT ATG GCA GTT TTA TTG TC	CDC, 2008
	22F-rev	CTC CAG CAC TTG CGC TGG AAA CAA CAG ACA AC	
	9N/L-for	GAA CTG AAT AAG TCA GAT TTA ATC AGC	Dias y col., 2007
	9N/L-rev	ACC AAG ATC TGA CGG GCT AAT CAA T	
Rx. 7	11A-for	GGA CAT GTT CAG GTG ATT TCC CAA TAT AGT G	Pai y col., 2006
	11A-rev	GAT TAT GAG TGT AAT TTA TTC CAA CTT CTC CC	
	5-for	ATA CCT ACA CAA CTT CTG ATT ATG CCT TTG TG	Pai y col., 2006
	5-rev	GCT CGA TAA ACA TAA TCA ATA TTT GAA AAA GTA TG	
45-for	GTTTAATGGCTGATGAAGTTATTATTGTTG	CDC, 2008	
45-rev	TTTACCATCAGTGAAATTTATCTTTGTTT		

Tabla 5 (Continuación)

	Cebador	Secuencia 5'-3'	Referencia
Rx. 5	17F-for 17F-rev	TTC GTG ATG ATA ATT CCA ATG ATC AAA CAA GAG GAT GTA ACA AAT TTG TAG CGA CTA AGG TCT GC	Pai y col., 2006
	7F/A-for 7F/A-rev	TCC AAA CTA TTA CAG TGG GAA TTA CGG ATA GGA ATT GAG ATT GCC AAA GCG AC	Pai y col., 2006
	15A-for 15A-rev	ATT AGT ACA GCT GCT GGA ATA TCT CTT C GAT CTA GTG AAC GTA CTA TTC CAA AC	Pai y col., 2006
	2-for 2-rev	TAT CCC AGT TCA ATA TTT CTC CAC TAC ACC ACA CAA AAT ATA GGC AGA GAG AGA CTA CT	Carvalho, 2010
	23B-for 23B-rev	CCA CAA TTA G CG CTA TAT TCA TTC AAT CG GTC CAC GCT GAA TAA AAT GAA GCT CCG	Carvalho, 2010
Rx. 6	24A-for 24A-rev	TCTCAACCAAGATACAGATTTTGATTTTACTC TATAAACCTTTAGTAAACACTCTGCTTGATCG	CDC, 2008
	20-for 20-rev	GAG CAA GAG TTT TTC ACC TGA CAG CGA GAA G CTA AAT TCC TGT AAT TTA GCT AAA ACT CTT ATC	Pai y col., 2006
	12F-for 12F-rev	GCA ACA AAC GGC GTG AAA GTA GTT G CAA GAT GAA TAT CAC TAC CAA TAA CAA AAC	Pai y col., 2006
	29-for 29-rev	ATTATCTCGGATCAAACAATTCTTTTGTAAC AACGCTAACATTAATAACTAGAACGAGTAAACC	CDC, 2008
	31-for 31-rev	GGA AGT TTT CAA GGA TAT GAT AGT GGT GGT GC CCG AAT AAT ATA TTC AAT ATA TTC CTA CTC	Pai y col., 2006
Rx. 7	35B-for 35B-rev	GAT AAG TCT GTT GTG GAG ACT TAA AAA GAA TG CTT TCC AGA TAA TTA CAG GTA TTC CTG AAG CAA G	Pai y col., 2006
	7C-for 7C-rev	CTA TCT CAG TCA TCT ATT GTT AAA GTT TAC GAC GGG A GAA CAT AGA TGT TGA GAC ATC TTT TGT AAT TTC	Pai y col., 2006
	8-for 8-rev	GAA GAA ACG AAA CTG TCA GAG CAT TTA CAT CTA TAG ATA CTA GTA GAG CTG TTC TAG TCT	Carvalho, 2010
Rx. Triple	9V/A-for 9V/A-rev	GGG TTC AAA G TC AGA CAG TG A ATC TTA A CCA TGA ATG A AA TCA ACA TT G TCA GTA GC	Carvalho, 2010
	18-for 18-rev	CTT AAT AGC TCT CAT TAT TCT TTT TTT AAG CC TTA TCT GTA AAC CAT ATC AGC ATC TGA AAC	Pai y col., 2006
	23F-for 23F-rev	GTA ACA GTT GCT GTA GAG GGA ATT GGC TTT TC CAC AAC ACC TAA CAC TCG ATG GCT ATA TGA TTC	Pai y col., 2006

Tabla 6. Resultados arrojados por el programa Minitab® 16 de Minitab Inc; una vez realizada la prueba de Chi-Cuadrado.

Chi-Square Test: Ara. Arag. Arat. Bono. Guay. Iba. Job. Mer. Wini

Expected counts are printed below observed counts
 Chi-Square contributions are printed below expected counts

	Ara	Arag	Arat	Bono	Guay	Iba	Job	Mer	Wini
Total:									
VT	23	46	47	27	17	41	33	24	32
290	20,80 0,233	52,30 0,758	48,14 0,027	23,18 0,631	14,26 0,526	47,54 0,900	35,66 0,198	19,02 1,306	29,12 0,285
NVT	12	42	34	12	7	39	27	8	17
198	14,20 0,341	35,70 1,110	32,86 0,039	15,82 0,924	9,74 0,770	32,46 1,318	24,34 0,290	12,98 1,913	19,88 0,418
488	35	88	81	39	24	80	60	32	49

Chi-Sq = 11,985. DF = 8. P-Value = **0,152**

Se agruparon los 17 serogrupos/serotipos circulantes en la población Warao, en 2 categorías, para facilitar el análisis (Altman, 1991). Las 2 categorías fueron **VT** donde se incluyó a los serotipos cubiertos por la PCV-13 y **NTV** agrupando los serotipos no vacunales.

El valor de $p=0,152$; demuestra que no hay diferencias estadísticamente significativas en la cobertura de la PCV-13 en los serogrupos/serotipos de *S. pneumoniae* en la etnia Warao. Aparentemente la distribución de este microorganismo es homogénea en esta etnia.