

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DEL ECUADOR

ESCUELA DE BIOANALISIS

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA CLINICA Y APLICADA

“Prevalencia de *Streptococcus pneumoniae* por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en muestras nasofaríngeas de niños menores de 5 años de edad de la ciudad de Quito”

GABRIELA FERNANDA MIRANDA TAPIA

DIRECTORA: Dra. Lenis Ortiz

Quito 2011

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Gabriela Fernanda Miranda Tapia, C.I. 172004930-1 autor del trabajo de graduación intitulado: “Prevalencia de Streptococcus pneumoniae por medio de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (Nested PCR) en muestras nasofaríngeas de niños menores de 5 años de edad de la ciudad de Quito”, previa a la obtención del grado académico de Licenciada en Microbiología Clínica y Aplicada en la Facultad de Bioanálisis.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 22 de junio del 2011

Gabriela Fernanda Miranda Tapia

C.I. 1720049301

DEDICATORIA

A mi familia; mi madre **Lucy**, mi padrastro **Julio** y mis abuelos **Luis** y **Delia** por haberme formado con valores éticos y principios morales fuertes.

A mis hermanos **Daniel**, **Horacio** y **Josué** quienes han sido mi fuerza en tiempos difíciles.

A mi esposo **Fernando** por brindarme todo ese apoyo afectuoso y moral durante toda mi carrera.

A todos ellos por haber contribuido de una u otra forma para encontrarme hoy en éstas instancias de mi vida estudiantil, va dedicado éste trabajo de fin de carrera.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiar mi camino.

A mi directora de Tesis **Dra. Lenis Ortiz**, por toda su dedicación y apoyo profesional para el desarrollo de éste trabajo.

A los docentes, personal administrativo y trabajadores varios de mi facultad quienes con dedicación supieron guiarme y brindarme la asistencia necesaria cuando la solicité.

A mi gran familia por hacerme sentir dichosa de formar parte de ella.

A Ceci, por el apoyo brindado para la realización de mi trabajo de tesis.

A todas las personas: familiares, amigos y compañeros que directa o indirectamente fueron parte importante en mi formación universitaria.

INDICE DE CONTENIDOS

Dedicatoria	I
Agradecimientos	II
Índice de contenidos	III
Listado de figuras	VI
Listado de tablas	VII
Resumen	I
Abstract	IX
CAPITULO 1: INTRODUCCION	1
1.1 Tema	1
1.2 Justificación	1
1.3 Planeamiento del problema	2
1.4 Objetivos	2
1.4.1 Objetivo general	2
1.4.2 Objetivos específicos	2
1.5 Marco teórico	3
1.5.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	3
1.5.1.1 Antecedentes	3
1.5.1.2 Generalidades	3
1.5.1.3 Características de la bacteria	4
1.5.1.4 Factores de virulencia	5
1.5.1.5 Patología	8
1.5.1.6 Métodos de diagnóstico	9
1.6 Diseño experimental de la investigación	16
CAPITULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	17
2.1 Participantes	17
2.1.1 Instituciones	17
2.1.2 Personas cooperantes	17
2.2 Zona de estudio	17
2.2.1 Trabajo de campo	17
2.2.2 Trabajo de laboratorio	18
2.3 Tipo de estudio	18
2.3.1 Procedimientos	18
2.3.1.1 Selección de pacientes	18

2.3.1.2	Ética	19
2.3.1.3	Limitaciones del estudio	19
2.3.1.4	Toma de muestras nasofaríngeas, transporte y conservación	20
2.3.1.5	Aislamiento de ADN	21
2.3.1.5.1	Extracción de ADN	21
2.3.1.5.2	Reacción en Cadena de la Polimerasa Gen β -Globina	21
2.3.1.5.3	Visualización de Resultados mediante electroforesis en gel de agarosa	23
2.3.1.6	Amplificación de <i>Streptococcus pneumoniae</i> por Reacción en cadena de la Polimerasa	24
2.3.1.7	Visualización de resultados mediante electroforesis en gel de agarosa	26
CAPITULO III: RESULTADOS		28
3.1	Pacientes	28
3.2	Diagnóstico molecular por Reacción en Cadena de la Polimerasa (Nested PCR)	28
3.3	Parámetros demográficos	30
3.3.1	Edad	31
3.3.2	Sexo	37
3.4	Sensibilidad	42
3.5	Especificidad	43
3.6	Valor predictivo positivo	44
3.7	Valor predictivo negativo	44
3.8	Cuadro de resultados	45
CAPÍTULO IV DISCUSIÓN		46
CAPÍTULO V CONCLUSIONES		48
CAPITULO VI RECOMENDACIONES		49
CAPÍTULO VI BIBLIOGRAFÍA		50
ANEXOS		53

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Aspecto de <i>Streptococcus pneumoniae</i> en coloración Gram	4
Figura 1.2. Evolución de la baja susceptibilidad de <i>S. pneumoniae</i> a la penicilina por año y país	5
Figura 1.3. Esquema de la técnica de PCR	12
Figura 1.4. Esquema de Nested PCR	14
Figura 2.1. Visualización del gen β -Globina como control de extracción de ADN	24
Figura 2.2. Visualización de resultados de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	27
Figura 3.1 Prevalencia de <i>S. pneumoniae</i> en el hospital Baca Ortiz	28
Figura 3.2 Prevalencia de <i>S. pneumoniae</i> en la comunidad	29
Figura 3.3 Prevalencia de <i>S. pneumoniae</i> en muestras nasofaríngeas de niños menores de 5 años de la ciudad de Quito	30
Figura 3.4 Porcentaje de niños de hospital Baca Ortiz por rango de edades	31
Figura 3.5 Porcentaje de resultados positivos de hospital Baca Ortiz por grupo de edades	32
Figura 3.6 Porcentaje de niños de la comunidad por rango de edades	33
Figura 3.7 Porcentaje de muestras positivas de los niños de la comunidad por rango de edades	34
Figura 3.8 Porcentaje de los niños de la comunidad y del hospital Baca Ortiz por rango de edades	35
Figura 3.9 Porcentaje de muestras positivas de los niños de la comunidad y del hospital Baca Ortiz por rango de edades	36
Figura 3.10 Porcentaje según el sexo de los participantes del hospital Baca Ortiz	37
Figura 3.11 Porcentaje de muestras positivas según el sexo del hospital Baca Ortiz	38
Figura 3.12 Porcentaje según el sexo de los participantes de la comunidad	39
Figura 3.13 Porcentaje de muestras positivas según el sexo de los niños de la comunidad	40
Figura 3.14 Porcentaje del total de los participantes según el sexo	41
Figura 3.15 Porcentaje de muestras positivas del total de los participantes según el sexo	42

LISTADO DE TABLAS

2.1 Primers utilizados para la amplificación del gen β -globina	22
2.2 Programa para la amplificación del gen β -globina	22
2.3 Primers utilizados para la amplificación de <i>S. pneumoniae</i>	25
2.4 Programa para la amplificación de <i>S. pneumoniae</i>	25
3.1 Resultados de Hospital Baca Ortiz	28
3.2 Resultados de la comunidad	29
3.3 Resultados del hospital Baca Ortiz y la Comunidad	30
3.4 Distribución de niños del hospital Baca Ortiz por grupo de edades	31
3.5 Resultados positivos del hospital Baca Ortiz por grupo de edades	32
3.6 Distribución de niños de la comunidad por grupo de edades	33
3.7 Resultados positivos de los niños de la comunidad por grupo de edades	34
3.8 Distribución de niños de la comunidad y del hospital Baca Ortiz por grupo de edades	35
3.9 Resultados positivos de los niños de la comunidad y del hospital Baca Ortiz por grupo de edades	36
3.10 Clasificación de los niños del hospital Baca Ortiz según el sexo	37
3.11 Resultados positivos de niños del hospital Baca Ortiz según el sexo	38
3.12 Clasificación de los niños de la comunidad según el sexo	38
3.13 Resultados positivos de los niños de la comunidad según el sexo	39
3.14 Clasificación según el sexo del total de los participantes	40
3.15 Resultados positivos del total de los participantes según el sexo	41
3.16 Tabla estadística	42
3.17 Reemplazo de datos en la tabla estadística	43
3.18 Tabla de resultados	45

RESUMEN

Streptococcus pneumoniae es un importante colonizador de la nasofaringe, capaz de causar varias enfermedades. Principalmente afecta a niños menores de 5 años y a personas mayores de 60 años.

Objetivos: Determinar la prevalencia de *Streptococcus pneumoniae* por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en muestras nasofaríngeas de niños menores de 5 años de edad de la ciudad de Quito. Establecer la diferencia de la prevalencia al comparar las técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) frente al cultivo microbiológico convencional considerado como la prueba de referencia. Determinar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, y valor predictivo negativo de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional frente al cultivo microbiológico.

Resultados: En el estudio se incluyeron 400 niños de los cuales en 352 se encontró la presencia de *Streptococcus pneumoniae*, dando como resultado una prevalencia del microorganismo de 88 %

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is a major colonizer of the nasopharynx, which may cause various diseases. Mainly affects children under 5 and people over 60 years.

To determine the prevalence of *Streptococcus pneumoniae* by using the technique of Chain Reaction (PCR) in nasopharyngeal samples of children under 5 years of age in the city of Quito. Establish the difference in prevalence when comparing techniques Chain Reaction (PCR) compared to conventional microbiological culture is considered as the gold standard. To determine the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of technical Chain Reaction (PCR) compared to conventional microbiological culture.

Materials and methods: This study was cross-sectional and observational, for which sampling the nasopharynx of children under 5 years in both community (nurseries) and Baca Ortiz Children's Hospital to determine the prevalence of this organism by Technique chain reaction (PCR).

Results: The study included 400 children in 352 which was the presence of *Streptococcus pneumoniae*, resulting in a prevalence of 88% microorganism

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Tema

“Prevalencia de *Streptococcus pneumoniae* por medio de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (Nested PCR) en muestras nasofaríngeas de niños menores de 5 años de edad de la ciudad de Quito”

1.2 Justificación

Las infecciones producidas por *Streptococcus pneumoniae* representan una de las principales causas de enfermedad bacteriana grave en niños en todo el mundo, produciendo en los países en vías de desarrollo más de 2.7 millones de muertes infantiles por neumonía, constituyendo así una causa importante de morbilidad y mortalidad infantil. Además es un agente causal importante de hospitalización y muerte en la tercera edad (Hortal et al. 2000).

La confirmación de este agente mediante el cultivo, es considerada la prueba de oro para el diagnóstico de *Streptococcus pneumoniae*, pero esta se vuelve difícil por la carencia de procedimientos con sensibilidad suficiente para permitir una visión exacta de la realidad, por lo que se hace necesaria la búsqueda de formas diagnósticas alternativas a las convencionales, incorporando así los avances científicos y tecnológicos para mejorar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico (Hortal et al.,2000).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica molecular que sirve para amplificar de forma exponencial un fragmento de ADN, tras esta amplificación es más fácil identificar con una muy alta probabilidad virus o bacterias causantes de una enfermedad, mejorando así el diagnóstico, ya que lo hace de una forma rápida, específica y sensible, brindando mayor seguridad, por lo que he visto necesario incorporar esta técnica molecular como objeto de estudio para determinar la prevalencia de *Streptococcus pneumoniae*.

1.3 Planeamiento del Problema

Ya que las infecciones producidas por *Streptococcus pneumoniae* representan una de las principales causas de enfermedad respiratoria bacteriana grave en la infancia en todo el mundo, es importante conocer:

¿Cuál es la prevalencia de *Streptococcus pneumoniae* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (Nested PCR), en niños menores de 5 años en la ciudad de Quito?

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

- ✓ Determinar la prevalencia de *Streptococcus pneumoniae* por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en muestras nasofaríngeas de niños menores de 5 años de edad de la ciudad de Quito.

1.4.2 Objetivos Específicos

- ✓ Establecer la diferencia de la prevalencia al comparar las técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) frente al cultivo microbiológico convencional considerado como la prueba de referencia (García, Patricia, 1999)
- ✓ Determinar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, y valor predictivo negativo de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) nested PCR frente al cultivo microbiológico (reportado en el estudio de Pavón 2010).

1.5 Marco Teórico

1.5.1 *Streptococcus pneumoniae*

1.5.1.1 Antecedentes

Inicialmente *Streptococcus pneumoniae* fue denominado por Pasteur en Francia como “microbio septicémico de la saliva” y como *Micrococcus pasteurii* por Sternberg en Estados Unidos en 1881, año en el cual ambos investigadores lo aislaron por primera vez. En 1886, este microorganismo fue denominado como neumococo por Fraenkel debido a que causaba enfermedad pulmonar. Posteriormente, según sugerencia de Weichselbaum (1886), en 1920, fue denominado *Diplococcus pneumoniae* debido a su morfología microscópica. En 1974, en la octava edición del Manual de Bacteriología de Bergey, el neumococo fue denominado *Streptococcus pneumoniae* (Chester 1901), denominación aún vigente. (Organización Panamericana de la salud. 2004)

1.5.1.2 Generalidades

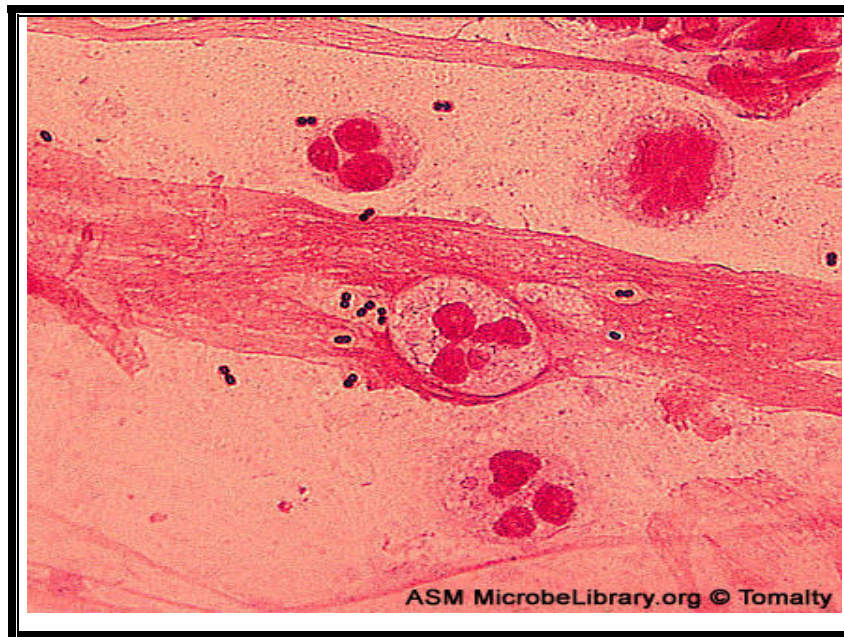
Streptococcus pneumoniae habita la faringe y nasofaringe de sujetos sanos. En un estudio realizado en niños de barrios suburbanos de Quito se encontró que la prevalencia por determinación de antígeno urinario de *S. pneumoniae* es de 66 % (Hamer D. et al. 2002).

Streptococcus pneumoniae es un microorganismo patógeno capaz de causar diversas infecciones y procesos invasivos severos tales como neumonía, otitis, sinusitis, peritonitis, endocarditis, septicemias, etc. Esta bacteria se presenta principalmente en niños, ancianos y personas inmunodeprimidas, ya que el hábitat natural del neumococo es la faringe (Silva M. et al. 2007).

1.5.1.3 Características de la bacteria

Streptococcus pneumoniae se presenta como diplococos Gram positivos, lanceolados, capsulados únicamente cuando están causando enfermedad en el huésped, inmóviles, aunque en cultivos viejos y expuestos a antibióticos se vuelven Gram negativos. Son microorganismos fastidiosos de cultivar, necesitan de medios enriquecidos y atmósfera de 5 a 10 % de CO₂, el crecimiento se presenta generalmente dentro de 20 a 24 horas siendo esta una forma rápida seguida de una autólisis, una vez formadas las colonias comienzan a lisarse en el centro y a desaparecer dando la apariencia de un cráter o de sombrero mexicano. Las colonias miden entre 0.5 a 2 mm y están rodeadas por hemólisis alfa, se distingue del resto del género por ser sensible frente al disco diferencial de 5 ug de optoquina (Egas J. - 2007).

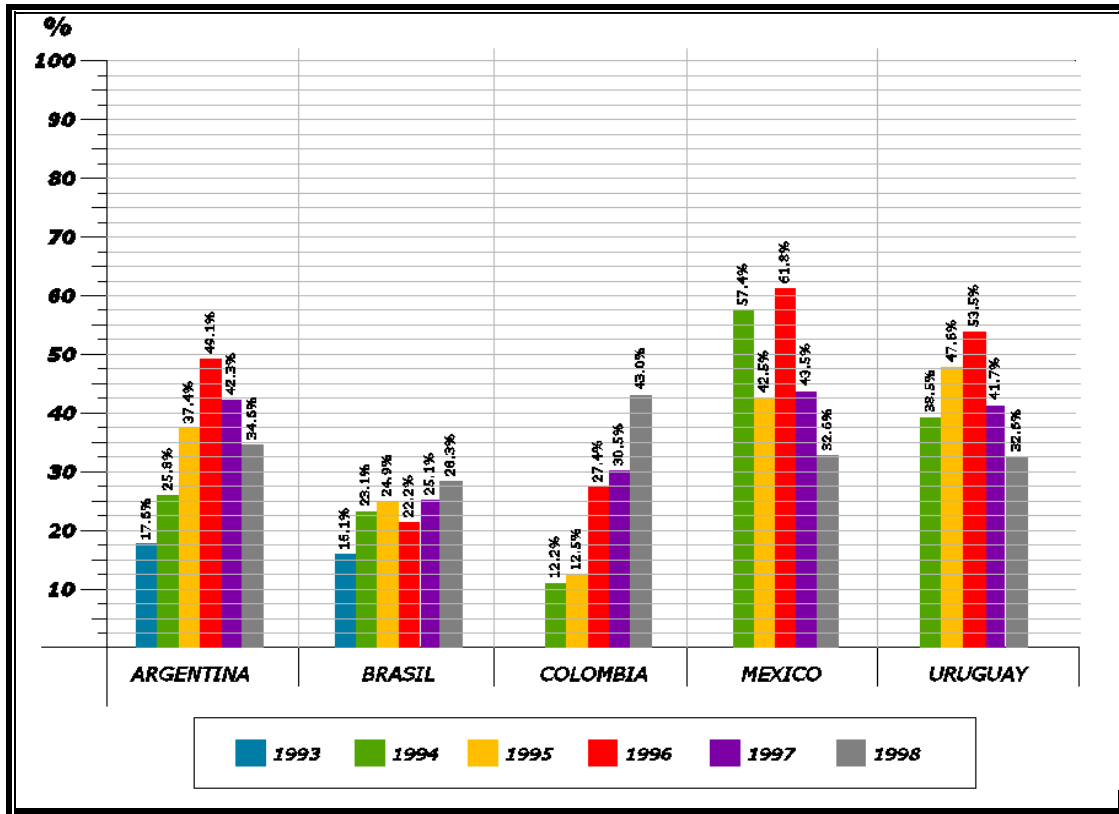
Figura 1.1. Aspecto de *Streptococcus pneumoniae* en coloración Gram



Fuente: ASM Microbelibrary

Generalmente los *Streptococcus pneumoniae* son muy sensibles a la penicilina pero ya se han encontrado resistencias a este antibiótico, considerando un estudio realizado los niveles de resistencia han ido en aumento como se muestra en la siguiente figura:

Figura 1.2. Evolución de la baja susceptibilidad de *S. pneumoniae* a la penicilina por año y país.



Fuente: Hortal María, et al. 2000

1.5.1.4 Factores de virulencia:

Entre los factores de virulencia que presenta *Streptococcus pneumoniae* se encuentran:

a) Adherencia

La capacidad que presenta la bacteria para adherirse en forma eficiente a células blanco es un elemento crucial en la etapa inicial de la infección, *Streptococcus pneumoniae* establece una íntima interacción con el mucus del tracto respiratorio, se adhiere a la superficie de las células epiteliales y posteriormente es capaz de invadir las. Como resultado de esta interacción se produce un daño en la actividad de los cilios del epitelio respiratorio. (Prado J. - 2001)

b) Cápsula polisacárida

Es la capa más superficial que envuelve al microorganismo, está compuesta por ácido hialurónico, encontrándose solamente cuando están causando enfermedad en el huésped este es el factor de virulencia más importante, ya que las cepas capsuladas son capaces de eludir la acción fagocitaria en ausencia de anticuerpos específicos. Además inhibe la activación del complemento por la vía alterna y degrada el fragmento C3b unido a la superficie bacteriana. Es por esta razón que las cepas no capsuladas de *Streptococcus* no producen infección en el ser humano, ni en animales de experimentación. Debido a la variabilidad antigénica que existe entre cepas se ha permitido identificar 46 serogrupos y 90 serotipos. (Prado J. - 2001)

c) Neuraminidasa

Se conocen 2 tipos de neuraminidasa; la neuraminidasa A (NanA) y B, siendo NanA la más estudiada se conoce que es una enzima capaz de hidrolizar las glucoproteínas y los glucolípidos celulares y por lo tanto tendría un papel importante para ayudar a la diseminación y multiplicación de *S. pneumoniae* en los tejidos infectados principalmente a los pulmones. Ya que esta actúa disminuyendo la viscosidad del mucus que reviste el epitelio respiratorio y altera la estructura de los oligosacáridos, exponiendo los receptores y facilitando la colonización a las células de la nasofaringe. En algunos casos se ha demostrado la reducción de la virulencia en presencia de anticuerpos anti neuraminidasa. (Prado J. - 2001)

d) Amidasa o autolisina

N-acetilmuramil-L-alaninaamidasa es una autolisina que degrada diferentes enlaces en el peptidoglicano de la pared celular de *Streptococcus pneumoniae* por lo que puede causar lisis y por consiguiente la muerte del microorganismo, esta hidrólisis es dependiente de la presencia de residuos de colina presentes en el ácido teicoico de la pared bacteriana ya que

hoy en día se conoce que *Streptococcus pneumoniae* es uno de los raros microorganismos que contienen colina en la pared celular

La lisis de este microorganismo con desoxicolato de sodio ocurre por hidrólisis de esta enzima es utilizado como prueba de identificación, además se ha comprobado que contribuye al daño tisular lisando al neumococo y liberando sustancias dañinas (peptidoglicano y ácido teicoico). (Prado J. - 2001)

e) Pneumolisina

Se la puede considerar como una toxina, ya que destruye la membrana de los glóbulos rojos por lo tanto es la responsable de la α hemólisis que se observa cuando se cultiva la bacteria en medios con sangre y en ambiente de anaerobiosis, o atmósfera de CO₂, la pneumolisina inhibe la función ciliar incrementando la permeabilidad vascular dañando así en endotelio pudiendo ser responsable de la hemorragia alveolar durante la infección neumocócica (Prado J. - 2001)

f) Proteínas de superficie PspA, PsaA y PspC.

Estas proteínas podrían participar en la adherencia inicial a la célula blanco. Existen 3 tipos; las PspA, PspC y una adhesina de la superficie neumocócica la PsaA (Prado J. - 2001)

g) Proteasa para IgA

Las cepas de *S. pneumoniae* producen una proteasa que hidroliza e inactiva la inmunoglobulina A presente en las mucosas, lo que facilitaría su adherencia y colonización inicial. (Prado J. - 2001)

1.5.1.5 Patología

Existen varias enfermedades causadas por *Streptococcus pneumoniae*, entre las que tenemos infecciones comunes del tracto respiratorio alto como: sinusitis y otitis media, también están en asociación con bacteremias. (Egas J. - 2008)

a) Neumonía neumocócica

La neumonía neumocócica es la más frecuentemente adquirida en la comunidad siendo los niños menores de 5 años y las personas mayores de 60 años las más afectadas, existen factores que predisponen al paciente a adquirir esta enfermedad, tales como infecciones respiratorias virales, alcoholismo, diabetes mellitus, enfermedad crónica renal, cáncer. La enfermedad comienza con la aspiración de secreciones respiratorias que contienen la bacteria, y al estar los mecanismos de defensa alterados por otras enfermedades este no puede responder adecuadamente para desechar a la bacteria, en personas no inmunes los neumococos se multiplican en los alvéolos del pulmón acompañados de la producción de fluido seroso que favorece el crecimiento de la bacteria, hacia el segundo o tercer día de la enfermedad el segmento de pulmón afectado incrementa su peso en 3 a 4 veces por la acumulación de este fluido que además tiene polimorfonucleares y eritrocitos, por el cuarto a quinto día los neutrófilos predominan en los alvéolos afectados que generalmente aparecen en un solo lóbulo del pulmón, la bacteria se sigue multiplicando y la bacteremia es común, empieza a formarse anticuerpos anticapsulares pero tienen que neutralizarse con los polisacáridos libres y solubles en el exudado y en el torrente circulatorio, aquí si la producción de anticuerpos es suficiente para superar esta neutralización el neumococo es fagocitado y destruido los síntomas de la neumonía comienzan con escalofríos fiebre alta, tos con presencia de esputo y contiene sangre, dolor de pecho (Egas J. - 2008).

b) Meningitis neumocócica

Esta puede ocurrir después de una infección neumocócica en otro sitio del cuerpo como por ejemplo directamente de la nasofaringe o por diseminación hematológica o también sin ningún antecedente, además puede desarrollarse después de un trauma en la cabeza, es más común en ancianos donde la mortalidad y secuelas son más altas comparadas con otras meningitis bacterianas (Egas J. – 2008).

c) Otitis media

Streptococcus pneumoniae es el microorganismo más común causante de otitis media en niños menores de 5 años pudiendo presentarse repeticiones de la misma o desarrollar otitis media crónica de tipo seroso.

1.5.1.6 Métodos de diagnóstico

El diagnóstico de *Streptococcus pneumoniae* se lo puede realizar por medio de técnicas microbiológicas, inmunológicas y moleculares.

A) Métodos directos

a. Métodos microbiológicos

i. Tinción de Gram

Aunque esta técnica únicamente nos permite diferenciar la morfología de la bacteria y es de gran ayuda para el diagnóstico y para el inicio de la terapia adecuada no es una prueba diagnóstica en definitiva, pero continúa siendo uno de los exámenes rápidos de mayor utilidad y bajo costo. (García P. - 1999)

i. Cultivo bacteriano

Permite la recuperación de bacterias presentes en la muestra. Para la recuperación de *S. pneumoniae* es muy importante que las muestras sean transportadas al laboratorio antes de 2 horas. Los medios básicos para la siembra primaria son el agar con 5% de sangre de cordero, agar chocolate que se incuba en atmósfera con CO₂. Las muestras deben ser sembradas por el método de siembra en agotamiento para poder obtener colonias aisladas, se incuba a 35° C por 24 horas.(García P. - 1999)

ii. Prueba de Optoquina

La optoquina, que es el clorhidrato de etilhidrocupreína, se utiliza en una dilución acuosa de 1 / 4000 para impregnar los discos, quedando en éstos 5 µg de la droga. Se usa el disco de Optoquina para diferenciar entre *S. pneumoniae*, entre otras especies de *Streptococcus* hemolíticos, siendo *S. pneumoniae* sensible, esta sensibilidad se debe a una medida de la fragilidad de la membrana celular bacteriana (Egas J. - 2007)

La prueba se la realiza inoculando cultivo puro de la colonia sospechosa en una placa de agar con 5% de sangre de cordero, sobre la estría se coloca el disco de optoquina, se incuba con atmósfera de 5 % de CO₂ durante 24 horas a 35° C, considerándose como sensible cuando hay inhibición alrededor del disco tomando en cuenta que en discos de 10mm el punto de corte es 16 mm, mientras que en discos de 6 mm el punto de corte es 14 mm y se considera resistente, cuando el crecimiento no es inhibido alrededor del disco puede existir la posibilidad de halos intermedios, si este fuera el caso se debe acumular pruebas a favor o en contra.

iii. Prueba de la solubilidad en bilis

Se utiliza esta prueba para diferenciar entre *S. pneumoniae*, soluble en bilis de otras especies de *Streptococcus* hemolíticos, “insolubles” en bilis. Esta prueba controla la capacidad de las células bacterianas de producir lisis en presencia de sales biliares, en un

tiempo y a una temperatura específica, las sales biliares utilizadas son el desoxicolato de sodio o el taurocolato de sodio, estas sales hacen descender la tensión superficial en la interface medio-membrana, provocan una descomposición de la membrana celular y aceleran el proceso autolítico natural del neumococo activando las enzimas por combinación de las sales biliares con el neumococo.

La prueba se realiza preparando 1 ml de una suspensión densa en solución fisiológica de un cultivo puro. Se divide en dos partes iguales en tubos separados. A uno de ellos se le agregan 0,5 ml de una solución de desoxicolato de sodio al 10 % y al otro 0,5 ml de solución fisiológica. Se incuba hasta 3 horas y se observa cada 15 minutos. Se considera como positiva cuando se observa un aclaramiento del tubo con desoxicolato respecto al de solución fisiológica. Negativo, cuando no hay diferencia de turbidez entre ambos tubos (Egas J. - 2007).

b. Técnicas de Biología Molecular

i. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

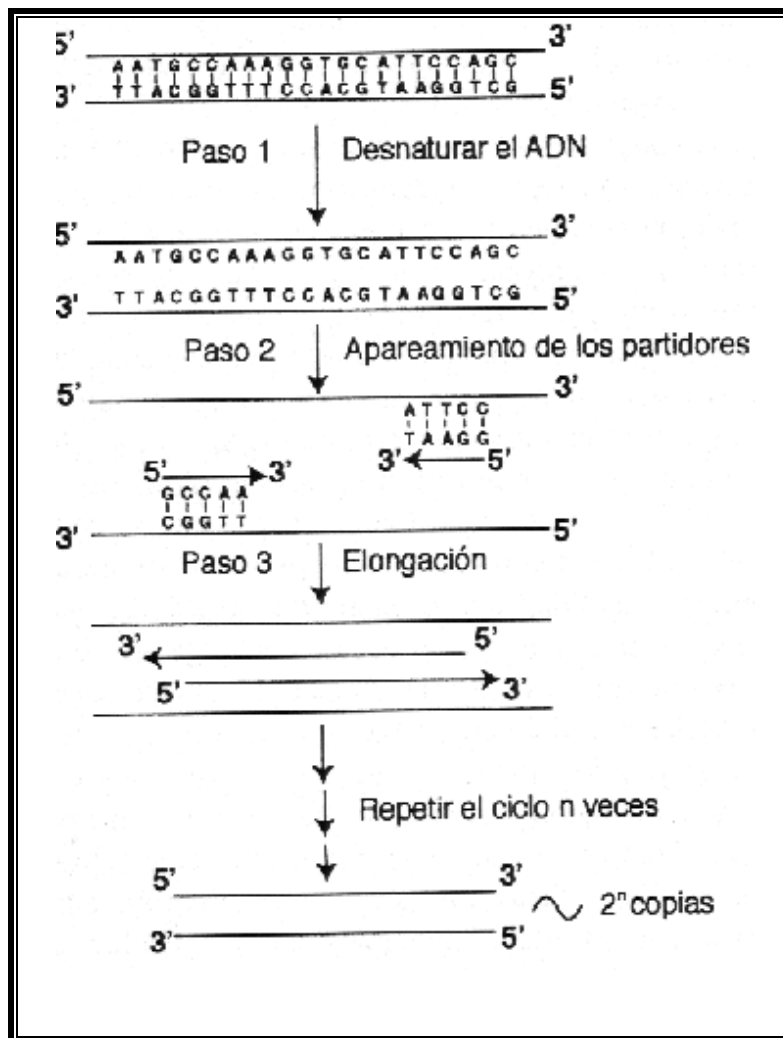
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método in vitro de síntesis de ADN, se trata de una sencilla reacción química que permite la síntesis de un fragmento de ADN particular partiendo de un mínimo, esto se hace a través de la acción de una polimerasa de ADN diana que bajo las condiciones adecuadas puede copiar una hebra de ADN, el objetivo es obtener un gran número de copias. En teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde. (Henry J. - 2007)

o Fundamento de la técnica

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN (secuencia target), para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas, así en el primer ciclo la temperatura aumenta para permitir que las hebras de ADN

se separen, este ciclo es llamado Denaturación, es seguido de una baja de temperatura para que los primers específicos se unan a la secuencia target, este es el ciclo de alineamiento o unión del cebador, el tercer paso es llamado Elongación o extensión donde los primers con ayuda de la taq polimerasa sintetizan las copias de los nucleótidos molde dando así lugar a la primera copia de ADN al final del primer ciclo, de tal modo que con cada repetición del ciclo las copias de ADN irán aumentando exponencialmente hasta obtener millones de copias (Henry J. - 2007)

Figura 1.3. Esquema de la técnica de PCR



Fuente: Zanlungo Silvana, Rigotti Attilio, Arrese Marco. 1999

○ **Tipos de PCR**

a) PCR Convencional

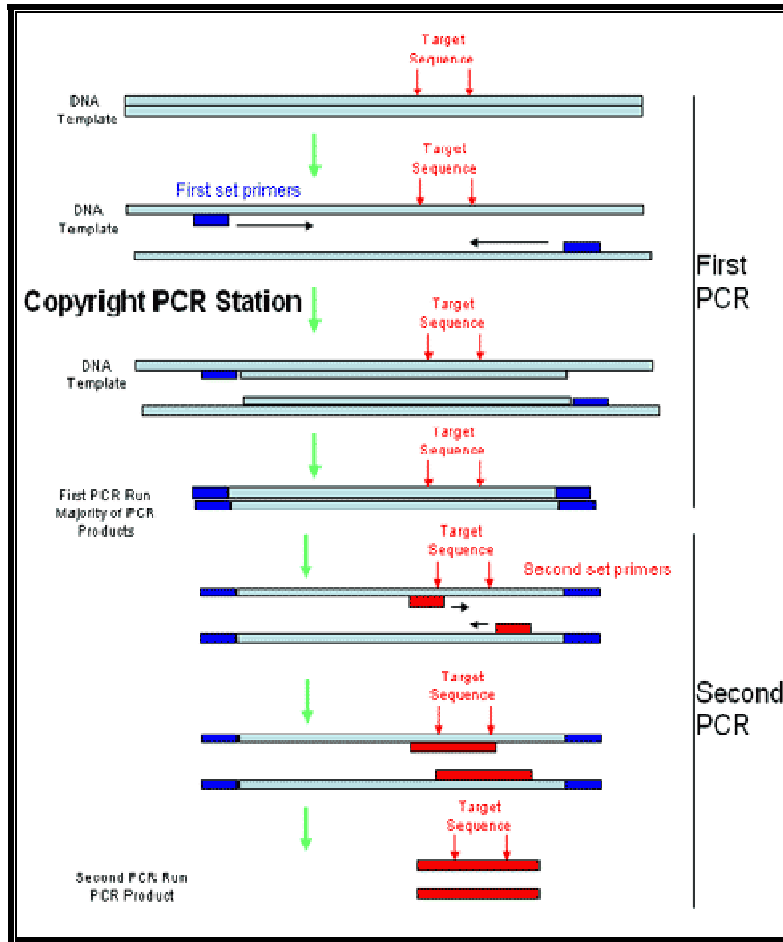
La PCR convencional en el contexto de la microbiología clínica consiste en la detección de un agente infeccioso por amplificación genética, se desarrolla habitualmente en tres etapas la primera consiste en la extracción de los ácidos nucleicos del microorganismo de la muestra biológica, seguida por la amplificación de un segmento seleccionado del genoma del microorganismo mediante PCR propiamente dicho, finalmente en la tercera etapa se lleva a cabo la detección de los fragmentos amplificados en la PCR (amplicones) por electroforesis en gel de agarosa y tinción con SYBR® Safe ADN gel stain (Invitrogen) como alternativa al bromuro de etidio ya que este último posee un poderoso efecto mutágeno y, posiblemente puede ser cancerígeno o teratógeno. O mediante hibridación con sondas específicas (Henry J. - 2007)

b) Nested PCR

Esta técnica se desarrolló para aumentar la sensibilidad y especificidad de la PCR, emplea dos pares de cebadores de amplificación y dos rondas de PCR. El aumento de la sensibilidad proviene del alto número total de ciclos y el aumento de la especificidad proviene del alineamiento de la segunda serie de cebadores a las secuencias que solo se hallan en los productos de la primera ronda. (Henry J. - 2007)

Esta técnica inicia con la reacción de los iniciadores externos para amplificar una región de ADN, la más extensa, que contiene el segmento diana. Después, con este producto de amplificación, se ejecuta una segunda PCR con los iniciadores internos para amplificar la región específica.

Figura 1.4. Esquema de PCR anidada o Nested PCR



Fuente: Hernández M, et al. 2008

c) *PCR in situ*

La *PCR in situ* consiste en una reacción de PCR en secciones histológicas o células, donde los productos generados pueden visualizarse en el sitio de amplificación. Es realizada sobre preparaciones fijas en un portaobjetos. En la técnica de *PCR in situ* se realiza una primera amplificación de ADN blanco y luego detección mediante hibridación *in situ* convencional con sondas de ADN/ARN. De esta manera pueden detectarse cantidades pequeñísimas de genoma. (Henry J. - 2007)

d) PCR multiplex

En la PCR multiplex están incluidas en la misma mezcla de reacción dos series o más, de cebadores diseñados para la amplificación de diferentes dianas, con esta técnica se puede co-amplificar en un solo tubo más de una secuencia diana en una muestra clínica. (Henry J. - 2007)

e) PCR Transcriptasa inversa (RT-PCR)

Esta técnica se desarrolló para amplificar las dianas de ARN en este proceso primero se produce el ADN complementario (ADNc) a partir de dianas de ARN, por transcripción inversa y más tarde se amplifica el ADNc por PCR. (Henry J. - 2007)

f) Tiempo real (q-PCR)

El PCR en tiempo real describe los métodos por los que la detección y la amplificación de la diana se produce simultáneamente en el mismo tubo, este método precisa de termocicladores especiales de precisión óptica que son capaces de monitorizar la emisión de fluorescencia de los pocillos de muestras, el software del ordenador que da soporte a los termocicladores monitoriza los datos durante toda la PCR de cada ciclo y genera un campo de amplificación en cada reacción. Esto quiere decir que el producto de la PCR es detectado al mismo tiempo que se produce, utilizando fluorescentes que se unen preferentemente al ADN de doble hebra. (Henry J. - 2007)

B) Métodos Indirectos

a. Detección de anticuerpos

Con estas pruebas no se recupera el agente etiológico, solamente detectan su presencia lo que es una desventaja ya que por esta razón la sensibilidad y especificidad del método es baja, las ventajas de estas pruebas es que se realizan en corto tiempo y no requieren equipos sofisticados en su procedimiento. (Alvarado L. 2008)

b. Detección de antígenos

La detección de antígenos urinarios del neumococo (habitualmente polisacáridos de la cápsula) utilizando un método basado en la inmunocromatografía de membrana, Binax NOW, para el diagnóstico rápido (15 min) de la neumonía por *S. pneumoniae* La sensibilidad en pacientes sin bacteriemia es del 50-80%, y del 75-85% cuando existe bacteriemia, mientras la especificidad es superior al 95 %. (Molinos. - 2006)

1.6 Diseño experimental de la investigación

En el diseño experimental de este estudio presenté 2 variables: el microorganismo a estudiar; *S. pneumoniae* y los sujetos de estudio que en este caso son los niños participantes como se indica en el anexo #1 (Ver anexo # 1). Además de establecer la escala y los indicadores de medición.

CAPITULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

2.1.1 Instituciones

Las instituciones que colaboraron en el presente estudio fueron:

- Hospital de niños Baca Ortiz
- Guardería Mamá Yoly conocida como “Cóndor Mirador”
- Guardería “Semillitas de Dios”
- Laboratorio de Biología Molecular y Citogenética DISerLAB-PUCE de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

2.1.2 Personas cooperantes

- Dra. Lenis Ortiz
- Dra. Josefina Egas
- Ing. Cecilia Cruz Betancourt
- Srta. Evelyn Pavón
- Grupo de enfermeras de las guarderías y del hospital

2.2 Zona de estudio

2.2.1 Trabajo de campo

Las muestras fueron recolectadas en:

- El hospital de niños Baca Ortiz ubicado Av. 6 de diciembre y Av. Cristóbal Colón al norte de la ciudad de Quito

- Guardería Mamá Yoly también conocido como “Cóndor Mirador” ubicada en el barrio Atucucho al nor-occidente de la ciudad de Quito, Pichincha.
- Guardería “Semillitas de Dios”, ubicada en el barrio Atucucho al nor-occidente de la ciudad de Quito.

2.2.2 Trabajo de laboratorio

Las muestras fueron analizadas en el laboratorio de Biología Molecular y Citogenética DISerLAB-PUCE de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador ubicado en la Av. 12 de Octubre y Roca de la ciudad de Quito, Pichincha-Ecuador.

2.3 Tipo de estudio

Se realizó un estudio de tipo transversal y observacional, para determinar la prevalencia de *S. pneumoniae* en muestras nasofaríngeas, de niños menores de 5 años tanto de la comunidad (Centros infantiles) como niños del Hospital Baca Ortiz, mediante Reacción en cadena de la polimerasa, Nested PCR

2.3.1 Procedimientos

2.3.1.1 Selección de pacientes

Se estudiaron 200 niños menores de 5 años que ingresaron al Hospital Baca Ortiz durante los meses de mayo, junio, julio de año 2010 y 200 niños menores de 5 años de los centros infantiles Mamá Yoly y semillitas de Dios. Se aceptaron los niños que cumplían con los siguientes criterios:

- **En el Hospital Baca Ortiz:**

Criterios de inclusión:

- Niños de edad comprendida entre 2 meses y 5 años
- Niños con dificultad respiratoria leve

Criterios de exclusión:

- Niños con patologías severas
- Niños que presentaron algún grado de deshidratación.
- Niños que presentaron algún tipo de malformación congénita.

○ **En la comunidad:**

Criterios de inclusión:

- Niños de edad comprendida entre 2 meses y 5 años

Criterios de exclusión:

- Niños presentaron algún tipo de síndromes cromosómicos.
- Niños que presentaron alguna malformación congénita.

2.3.1.2 Ética (consentimiento informado)

En vista de que el trabajo fue realizado con un grupo vulnerable de la población, para realizar la investigación se solicitó un consentimiento informado a los padres de familia de los niños que formaron parte del estudio. Ver anexo # 2. Los padres fueron informados sobre los objetivos, alcances, riesgos y beneficios de la investigación.

2.3.1.3 Limitación del estudio

Una de las limitaciones del estudio fue el tamaño de la muestra debido a los altos costos de materiales y reactivos utilizados para la técnica molecular.

Otra de las limitaciones encontradas fue el muestreo, ya que se tomaron muestras en sitios estratégicos de la ciudad en donde existen equipamientos urbanos infantiles:

- Hospital de niños Baca Ortiz ubicado en el centro norte de la ciudad
- Guarderías: Mamá Yoli y Semillitas de Dios ubicadas en el barrio Atucucho al noroccidente de la ciudad

Debido a que en otras instituciones de la ciudad los padres no aprobaron los consentimientos informados, el muestreo fue delimitado en estos puntos de la ciudad

2.3.1.4 Toma de muestras nasofaríngeas transporte y conservación

Obtenidos ya los consentimientos informados por parte de los padres de los niños se procedió a la toma de muestras nasofaríngeas de cada paciente, donde empezamos por rotular con los datos del paciente los medios de transporte donde se depositaron las muestras, con la ayuda de la enfermera o en algunos casos la madre del niño colocamos la cabeza del paciente en un ángulo de 70 ° aproximadamente para poder obtener una buena visión además de la postura correcta para la toma de la muestra, acto seguido se introdujo el hisopo pediátrico de alginato de calcio en la fosa nasal, deslizándolo por la mucosa del piso de la fosa nasal hasta tocar la pared posterior de la faringe, a continuación se frotó la faringe haciendo girar el hisopo, obtenida así la muestra en los hisopos se introdujo en el medio de transporte M4 REMEL obteniendo 2 hisopos por cada paciente, nos aseguramos de cerrar los frascos de los medios de transporte y los colocamos en un cooler con refrigerantes para transportar las muestras al el laboratorio de Biología Molecular y Citogenética DISerLAB-PUCE de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Una vez en el laboratorio, se congelaron las muestras a -20 °C hasta el momento del análisis.

2.3.1.5 Aislamiento de ADN

2.3.1.5.1 Extracción de ADN de las muestras nasofaríngeas.

La extracción de ADN de las muestras nasofaríngeas se realizó con el kit de extracción High pure PCR template preparation kit de Roche siguiendo las instrucciones del fabricante. En un tubo estéril de 1.5 ml se colocó 200 ul de muestra, a la que se adicionó 200 ul del buffer Binding y 40 ul de proteinasa K, con la ayuda de un vortex se mezcló inmediatamente y se procedió a la incubación 10 minutos a 70°C.

A esta mezcla se añadió 100 ul de Isopropanol y se mezcló otra vez usando el vórtex, a continuación se transfirió esta mezcla a un tubo de filtración insertando el tubo en un tubo de colección, se centrifugó por 1 minuto a 8000 gravedades, después de la centrifugación se descartó el sobrenadante pasando el tubo de filtración a un nuevo tubo de colección para así poder adicionar 500 ul del inhibidor removal buffer, se centrifugó nuevamente por 1min a 8000 gravedades, se descartó el sobrenadante pasando el tubo de filtración a un nuevo tubo de colección, a continuación se adicionó 500 ul de buffer de lavado, se centrifugar por 1 min a 8000 gravedades y se descartó el sobrenadante pasando el tubo de filtración a un nuevo tubo de colección, para repetir el lavado de la forma ya indicada adicionando 10 segundos de centrifugación a máxima velocidad para que la mayoría de residuos salga en el sobrenadante que se descarta pasando la columna a un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml, se adicionó 200 ul de buffer de elución y se centrifugó por 1 min a 8000 gravedades, se desecha la columna obteniendo en el tubo eppendorf el material genético extraído, el que se almacena a -20°C hasta el momento de la amplificación. (High pure PCR template preparation kit, Roche. Cat. No. 11858874001, versión 12/2008)

2.3.1.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para β -Globina

Se realizó la PCR para β - Globina como control de la extracción de ADN. Para esta reacción de amplificación se utilizaron los siguientes primers:

Tabla 2.1 Primers utilizados para la amplificación de β -Globina

Primers	Secuencia (5' a 3')	Tamaño de producto en pb (pares de bases)
PCO4	CAACTTCATCCACGTTTCACC	268 pb
GH20	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	

Fuente: Mirshahabi et al. 2006, adaptado por Miranda G.

Para la reacción de PCR se utilizó GoTaq® Green Master Mix con un volumen final de reacción de 25 μ l siguiendo las especificaciones del fabricante se preparó la mezcla con 12.5 μ l de GoTaq® Green Master Mix (Promega) la que contiene buffer de reacción a un pH de 8.5, 3MgCl₂, 400 μ MdGTP, 400 μ MdTTP, 400 μ MdCTP, y Taq polimerasa. Se añadió 1 μ l de cada primer con una concentración final de 400 nM, 7.5 unidades de agua grado PCR libre de nucleasas y 3 μ l del ADN de las muestras nasofaríngeas.

Una vez lista la mezcla de reacción se procedió a realizar la amplificación en el termociclador marca Tecne el que se encuentra ubicado en el laboratorio de post-PCR del Laboratorio de Biología Molecular y Citogenética DISerLAB-PUCE de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, programado con las siguientes especificaciones:

Tabla 2.2 Programa para amplificación de β -Globina

Ciclo	Temperatura	Tiempo
Denaturación inicial	94 °C	5 minutos
Denaturación	94 °C	30 segundos
Alineamiento	55 °C	45 segundos
Extensión	72 °C	45 segundos

Fuente: Mirshahabi et al. 2006, adaptado por Miranda G.

Para visualizar los productos de la amplificación se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1,6%.

2.3.1.5.3 Visualización de resultados, mediante electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa.

Una vez obtenido el producto final de la amplificación del gen β - Globina procedí a la visualización en gel de agarosa (Ultra-Pure™, invitrogen) a una concentración de 1.6 %(p/v). Con coloración directa utilizando SYBR® Safe ADN gel stain (invitrogen) añadiendo al gel en su estado líquido 5 ul de este colorante.

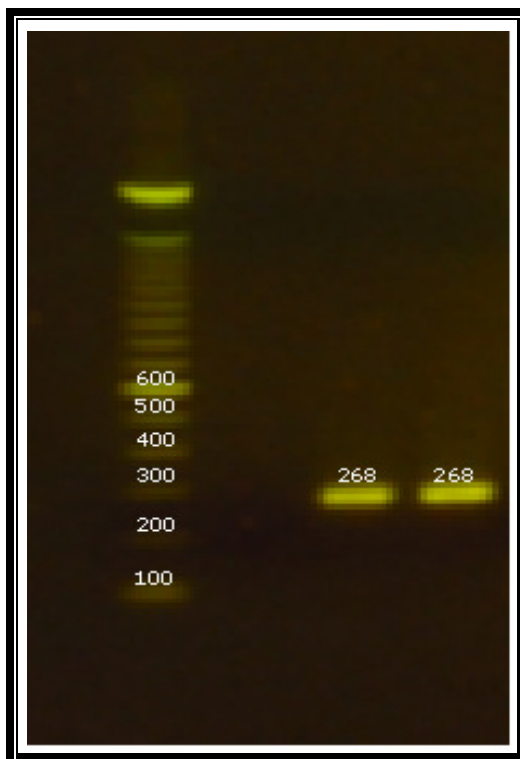
Se procedió a preparar el gel de agarosa con una concentración de 1.6 % con 70 ml TAE 1X (tris/acetato/EDTA) y 1.12 gr de agarosa (Ultra-Pure™, invitrogen), el TAE 1X fue preparado a partir de una solución stock de TAE 50X que contiene Tris HCl, 2M pH 7.2; EDTA 50 mM pH 8, ácido acético 57.1 ml y agua destilada hasta llegar a un litro.

La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis horizontal (Marca Labner, laboratorio de post-PCR del laboratorio de Biología Molecular y Citogenética DISerLAB-PUCE de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador) donde se colocó el gel de agarosa y se cubrió con TAE 1X (tris/acetato/EDTA) como buffer tampón.

La preparación de las muestras se realizó con el buffer de carga DYE para otorgar densidad a la muestra y con el producto de la amplificación a proporción 1:5 con 10 ul de muestra y 2 ul de DYE, esta mezcla se cargó en los pocillos del gel, como marcador de peso molecular se utilizó Trackit 100 pb ADN ladder (invitrogen) que consiste en 15 fragmentos de ADN de entre 100 y 1500 pares de bases en múltiplos de 100 pares de base y un fragmento adicional de 2072 pares de bases. Se cargó un pocillo con el marcador para cada corrida electroforética y las muestras en los pocillos restantes. Una vez completa la carga del gel se procedió a la corrida electroforética de 1 hora a un voltaje de 70 voltios.

Transcurrido este tiempo se procedió a observar los resultados de la amplificación de β -Globina con la ayuda de un transiluminador de marca Safe Imager™ Invitrogen, el que nos proporciona luz azul.

Figura 2.1 Visualización de la amplificación del Gen β -Globina como control de extracción de ADN



Fuente: Miranda G.

2.3.1.6 Amplificación de *Streptococcus pneumoniae* por Reacción en cadena de la polimerasa Nested PCR

Antes de iniciar con el protocolo de trabajo siempre se verificó que todo el material, las muestras, reactivos y equipos estén listos y a temperatura ambiente.

Para la amplificación de *Streptococcus pneumoniae* por el método de nested PCR se utilizaron los siguientes primers:

Tabla 2.3 Primers utilizados para la amplificación de *S. pneumoniae*

Primers	Secuencia (5' a 3')	Tamaño de producto en pb (pares de bases)
IA forward	ATTTCTGTAACAGCTACCAACGA	348
IB forward	GAATTCCTGTCTTTTCAAAGTC	
IIA forward	CCCACTTCTTCTTGCGTTGA	208
IIB forward	TGAGCCGTTATTTTTTCATACTG	

Fuente: Salo P, Ortquist A, Leinonen M. 1995.

Para la reacción de nested PCR se procedió a realizar la primera amplificación colocando en un microtubo para PCR de 200 μ l 45 μ l de Platinum Supermix, a este se adicionó 1 μ l de cada Primer (IA y IB) a una concentración de 200 nM y 3 μ l de ADN de cada muestra, se mezcló bien con la ayuda del vórtex, se cargaron las muestras en el termociclador marca Tecny se procedió a correr el programa descrito a continuación:

Tabla 2.4 Programa para amplificación de *S. pneumoniae*

Ciclo	Temperatura	Tiempo
Denaturación	94 °C	1 minuto
Alineamiento	55 °C	1 minuto
Extensión	72 °C	1 minuto

Fuente: Optimizado por Sisilema Fernanda. PUCE.

Terminado este proceso de primera amplificación se procedió a realizar la segunda amplificación de donde obtuvimos el producto final de amplificación, se colocó en un microtubo para PCR de 200 μ l 45 μ l de Platinum Supermix, a este se adicionó 1 μ l de cada

Primer (IIA y IIB) a una concentración de 200 nM y 3 *ul* de ADN de cada muestra, se mezcló bien con la ayuda del vórtex, se cargaron las muestras en el termociclador marca Tecney se procedió con el mismo programas de la primera amplificación.

Con cada grupo de muestras analizadas se corrió conjuntamente un **control positivo** donde se usó extracto de ADN de neumococo conocido y un control **negativo** que se realizó con agua destilada estéril (Platinum PCR supermix Invitrogen ® Versión/2007).

2.3.1.7 Visualización de resultados, mediante electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa.

Para la visualización de los resultados por la separación de las bandas de ADN se realizó electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa (Ultra-Pure™, invitrogen) a una concentración de 1.6 % (p/v). Con coloración directa utilizando SYBR® Safe ADN gel stain (invitrogen) añadiendo al gel en su estado líquido 5 *ul* de este colorante.

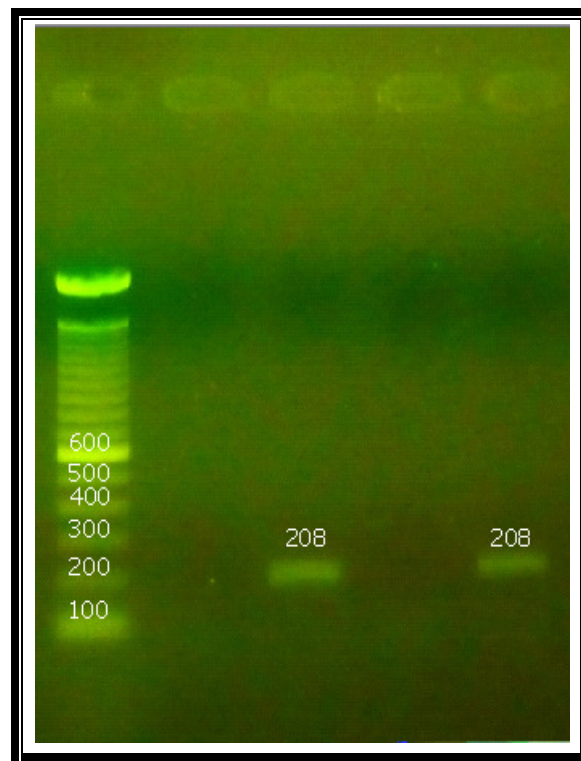
Se procedió a preparar el gel de agarosa con una concentración de 1.6 % con 70 ml TAE 1X (tris/acetato/EDTA) y 1.12 gr de agarosa (Ultra-Pure™, invitrogen).

La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis horizontal (Marca Labner, laboratorio de de post-PCR del laboratorio de Biología Molecular y Citogenética DISerLAB-PUCE de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador) donde se colocó el gel de agarosa y se cubrió con TAE 1X como buffer tampón

La preparación de las muestras se realizó con el buffer de carga DYE para otorgar densidad a la muestra y con el producto de la amplificación proporción 1:5 con 10 *ul* de muestra 2 *ul* de DYE, esta mezcla se cargo en los pocillos del gel, como marcador de peso molecular se utilizó Trackit 100 pb, ADN ladder (invitrogen), se cargó un pocillo con el marcador para cada corrida electroforética y las muestras con los productos finales de amplificación en cada uno de los siguientes pocillos y se procedió a correr el ciclo de

electroforesis por 1 hora a un voltaje de 70 voltios. Transcurrido este tiempo se realizó la visualización con la ayuda de un transiluminador que brinda luz azul. Se procedió a tomar las fotografías correspondientes para tener respaldo de los resultados obtenidos, y visualizar de mejor forma las bandas obtenidas.

Figura 2.2 Visualización de resultados de *Streptococcus pneumoniae*



Fuente: Miranda G.

Los resultados obtenidos se registraron en hojas de cálculo de Microsoft Office Excel versión 2007. Anexo # 3.

CAPITULO III: RESULTADOS

3.1. Pacientes

Fueron enrolados un total de 400 niños, de edades comprendidas entre 2 meses y 5 años (60 meses), con un promedio de edad de 27.54 meses (2.3 años). Del total de niños estudiados el 44 % (144) Fueron niñas y el 56 % (226) Fueron varones.

3.2. Diagnóstico molecular por Reacción en Cadena de la Polimerasa Nested PCR

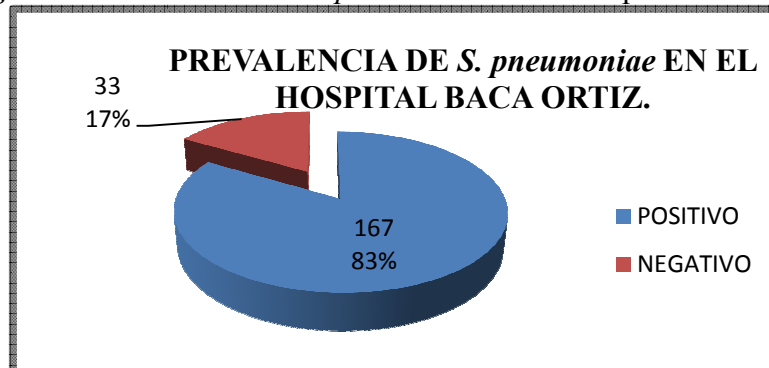
El diagnóstico molecular por Reacción en Cadena de la Polimerasa demostró que de las muestras nasofaríngeas de los 200 pacientes del Hospital Baca Ortiz 167 resultaron positivas para *Streptococcus pneumoniae*, lo que lo que nos da una prevalencia de 83 %.

Tabla 3.1 Resultados del hospital Baca Ortiz

Resultados del hospital Baca Ortiz	
POSITIVO	167
NEGATIVO	33

Fuente: Miranda G

Figura 3.1 Prevalencia de *S. pneumoniae* en el Hospital Baca Ortiz



Fuente: Miranda G

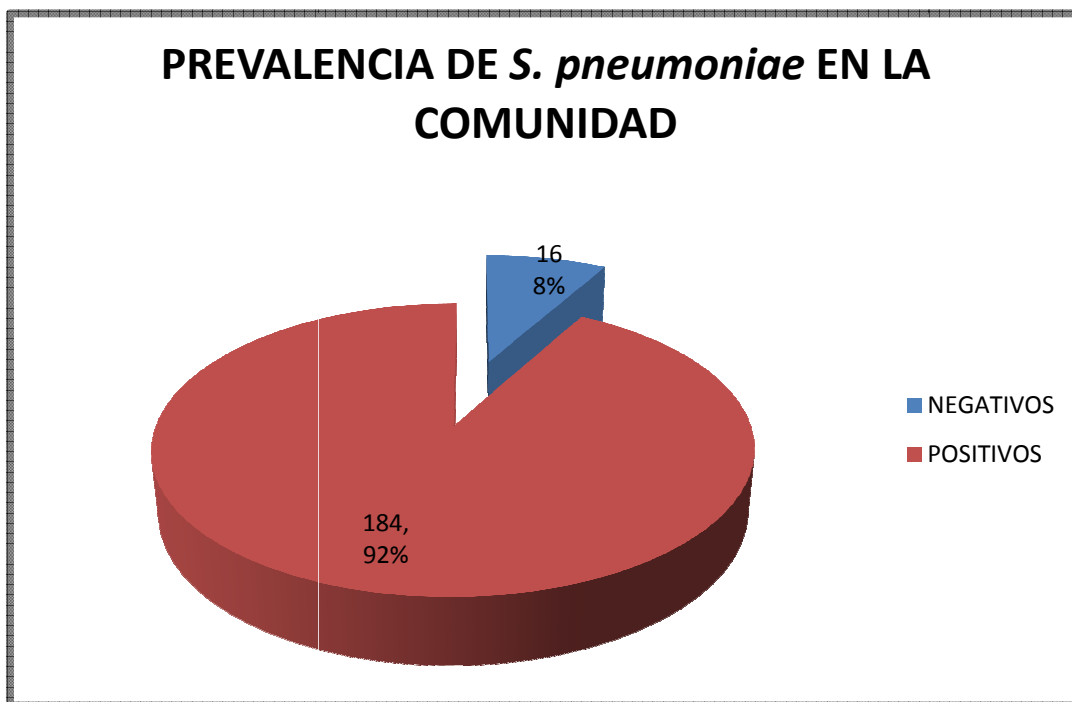
Mientras que la PCR de las 200 muestras nasofaríngeas de los pacientes de los centros infantiles demostró que 184 de ellos resultaron positivos para *Streptococcus pneumoniae* obteniendo así una prevalencia de 92 %

Tabla 3.2 Resultados de la comunidad

Resultados de la comunidad	
POSITIVOS	184
NEGATIVOS	16

Fuente: Miranda G

Figura 3.2 Prevalencia de *S. pneumoniae* en la comunidad



Fuente: Miranda G

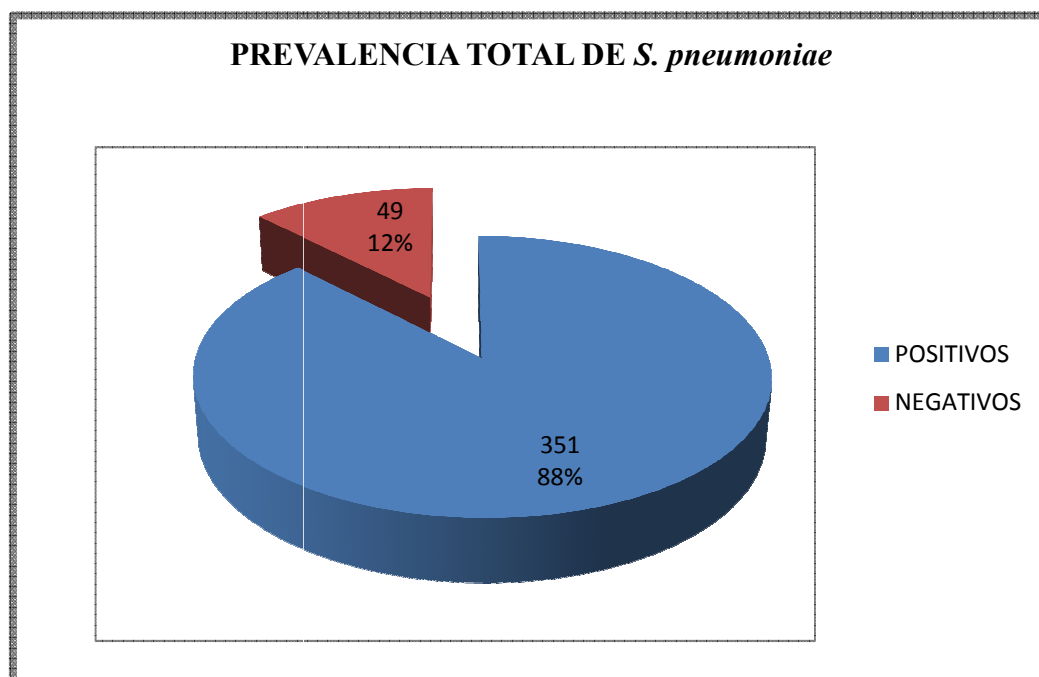
Encontrando una prevalencia total de 88 % con 351 muestras positivas para *Streptococcus pneumoniae* por Reacción en Cadena de la Polimerasa (nested PCR).

Tabla 3.3 resultados del hospital Baca Ortiz y la comunidad

Resultado total	
POSITIVOS	351
NEGATIVOS	49

Fuente: **Miranda G**

Figura 3.3 Prevalencia de *S. pneumoniae* en muestras nasofaríngeas de niños menores de 5 años de la ciudad de Quito



Fuente: **Miranda G**

3.3. Parámetros demográficos

Los parámetros demográficos obtenidos en este estudio fueron: edad y sexo

3.3.1. Edad

Para definir este parámetro se dividió a los pacientes en grupos de rangos, obteniendo así 5 grupos

En la siguiente tabla se puede observar la distribución por edades de los niños del hospital Baca Ortiz

Tabla 3.4 Distribución de niños del Hospital Baca Ortiz por rango de edad

RANGO DE EDADES	CANTIDAD
De 2 a 12 meses	107
De 13 a 24 meses	58
De 25 a 36 meses	26
De 37 a 48 meses	5
De 49 a 60 meses	4

Fuente: Miranda G.

Figura 3.4 Porcentajes de los niños del Hospital Baca Ortiz por rango de edad



Fuente: Miranda G.

ERROR: syntaxerror
OFFENDING COMMAND: %ztokenexec_continue

STACK:

-filestream-
1952
32
0