

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TRABAJO DE TITULACIÓN DE GRADO

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE LICENCIADOS EN LABORATORIO
CLÍNICO

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA CÁPSULA DE NEUMOCOCO EN CEPAS
ALMACENADAS EN LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO EN LA PUCE, 2023
- 2025

KATTYA ROMINA CASTRO MENA

ALLISON DAYANA HIDALGO LANCHIMBA

TUTOR: MTR. ANDRÉS ZABALA PARREÑO

QUITO 2026

DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo de titulación, fruto de esfuerzo, constancia y aprendizaje, a nuestros padres, por ser nuestro pilar fundamental, por su amor incondicional, sacrificio y confianza, que hicieron posible cada paso de nuestra formación académica. A nuestros hermanos, por su apoyo, comprensión y por motivarnos a seguir adelante. A nuestros abuelos, por sus enseñanzas y por ser ejemplo de fortaleza, sabiduría y perseverancia. A nuestros amigos, por acompañarnos durante este camino, por su aliento y por compartir momentos que hicieron más ligero este proceso. A nuestros tutores, por su guía, dedicación y compromiso en el desarrollo de esta investigación.

Finalmente, dedicamos este trabajo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por brindarnos el espacio, el conocimiento y las oportunidades para crecer profesionalmente, reafirmando nuestro compromiso con la ciencia y la academia.

Katty Romina Castro Mena

Allison Dayana Hidalgo Lanchimba

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres, Johnny y Alby, por su amor incondicional, apoyo constante y por los innumerables sacrificios realizados para brindarme la oportunidad de formarme como profesional. Su confianza en mis capacidades, su esfuerzo diario y su fortaleza ante cada desafío han sido mi principal motivación para alcanzar esta meta. A mi hermana, Pao, por ser un pilar esencial en mi vida, mi confidente, mi apoyo emocional y mi mejor amiga. A mi fiel compañero, Percy, por acompañarme con lealtad y alegría en cada jornada de estudio. De manera especial, agradezco a mi amiga Allison por su compromiso y compañerismo durante el desarrollo de este trabajo de titulación. Finalmente, extendo mi gratitud a mi familia y amigos en general, por su aliento, comprensión y respaldo a lo largo de este proceso académico.

Katty Romina Castro Mena

Agradezco profundamente a mi madre, María, por ser el pilar más fuerte de nuestra familia y razón por la que hoy cumplo esta meta. A mi padre, Wilson, por su apoyo constante y por sostener junto a ella cada paso de este camino. A mis hermanos, Antho y Mati, quienes me motivaron a no rendirme y cuya inspiración me impulsa a ser mejor para ser un ejemplo para ellos. A mis abuelitos, Blanca y Segundo, por su amor y respaldo en los momentos más difíciles. A mis amigos de la carrera, y en especial a mi compañera de proceso Romina, con quien compartí aprendizajes, esfuerzo, lágrimas y logros que marcaron este recorrido. Finalmente, expreso mi sincero agradecimiento a nuestro tutor, Andrés Zabala, y a los lectores de este trabajo, quienes fueron fundamentales para el desarrollo de esta investigación.

Allison Dayana Hidalgo Lanchimba

RESUMEN

Introducción: *Streptococcus pneumoniae* es un patógeno clínicamente importante por causar infecciones invasivas y no invasivas, sobre todo en niños y adultos mayores. Su principal factor de virulencia es la cápsula polisacárida, cuya variabilidad determina más de 100 serotipos, la caracterización molecular de los genes capsulares permite identificar con mayor precisión los serotipos circulantes y su relación con la resistencia antimicrobiana. Este estudio tuvo como objetivo caracterizar molecularmente la cápsula de cepas almacenadas en la carrera de Laboratorio Clínico de la PUCE (2023-2025), y correlacionar los serotipos con variables demográficas y perfiles de sensibilidad antimicrobiana.

Materiales y métodos: Esta investigación corresponde a un estudio descriptivo, observacional y transversal en 62 cepas de *Streptococcus pneumoniae* previamente aisladas. Se analizaron perfiles fenotípicos y genotípicos mediante PCR de punto final para los genes *ply*, *cpsA* y *cpsB*, confirmando la identidad y la presencia del operón capsular. La serotipificación se efectuó mediante PCR específica de genes capsulares de relevancia clínica. La sensibilidad antimicrobiana se obtuvo de antibiogramas según CLSI y se correlacionó con variables demográficas y serotipos mediante la prueba de chi cuadrado ($p < 0,05$).

Resultados: La caracterización molecular confirmó la identidad de 56 de las 62 cepas y permitió identificar diversos serotipos circulantes durante el periodo de estudio. Algunos serotipos fueron más frecuentes en determinados grupos etarios. Se evidenció una asociación significativa entre ciertos serotipos y la resistencia a eritromicina, clindamicina y trimetoprima sulfametoxazol, así como altos niveles de resistencia a oxacilina como marcador de penicilina, demostrando que la resistencia antimicrobiana varía según el serotipo y sugiere la circulación de linajes capsulares con perfiles de resistencia específicos.

Conclusiones y recomendaciones: La caracterización molecular de la cápsula permitió identificar los serotipos presentes y evidenciar patrones epidemiológicos relevantes para la vigilancia de *Streptococcus pneumoniae*. La asociación entre serotipos y resistencia antimicrobiana resalta la importancia de integrar técnicas moleculares en el diagnóstico y monitoreo. Se recomienda mantener una vigilancia continua, actualizar los paneles de PCR según serotipos emergentes y utilizar estos resultados para orientar tratamientos empíricos y apoyar la evaluación de políticas de vacunación.

Palabras clave: Cápsula; genes de regulación; serotipo y neumococo.

TABLA DE CONTENIDO

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN	1
CERTIFICACIÓN.....	2
DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTO	4
RESUMEN.....	5
TABLA DE CONTENIDO.....	6
LISTA DE TABLAS	8
LISTA DE ANEXOS	9
1 CAPÍTULO 1	10
1.1 Justificación	10
1.2 Planteamiento del problema.....	11
1.3 Objetivos	12
1.3.1 Objetivo General	12
1.3.2 Objetivos Específicos.....	12
1.3.3 Limitaciones.....	12
2 CAPÍTULO 2	13
2.1 Antecedentes	13
2.2 Marco Teórico	14
2.2.1 Neumococo	14
2.2.2 Estructura y factores de virulencia de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	15
2.2.3 Cápsula de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	16
2.2.4 Métodos de caracterización molecular.....	17
2.2.5 Importancia clínica de la tipificación capsular	18
2.2.6 Genética de la síntesis capsular de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	19
2.2.7 Resistencia antimicrobiana y su relación con los serotipos capsulares	20
2.3 Marco Conceptual	21
3 CAPÍTULO 3.....	25
3.1 Marco metodológico	25
3.1.1 Materiales y métodos	25
3.1.1.1 Tipo de estudio	25
3.1.1.2 Tipo de muestreo y muestra	25
3.1.1.3 Criterios de inclusión	25
3.1.1.4 Criterios de exclusión	25
3.1.1.5 Análisis estadísticos	26
3.2 Operacionalización de variables	27

3.3	Materiales y proceso.....	28
3.3.1	Control de Calidad	28
3.4	Procedimiento	29
3.4.1	Etapa 1: Solicitudes, aprobaciones y autorizaciones	29
3.4.2	Etapa 2: Recolección y almacenamiento de cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	29
3.4.3	Etapa 3: Reesiembr, caracterización fenotípica y perfil de susceptibilidad de las cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	29
	3.4.3.1 Cultivo e identificación	30
	3.4.3.2 Pruba de catalasa y tinción Gram	30
	3.4.3.3 Perfil de susceptibilidad	30
3.4.4	Etapa 4: Extracción de ADN de las cepas viables	30
	3.4.4.1 Cuantificación y evaluación de la pureza del ADN mediante NanoDrop	31
3.4.5	Etapa 5: Realización de PCR en punto final para la detección de los genes correspondientes	32
	3.4.5.1 Preparación de la reacción de PCR	32
	3.4.5.2 PCR en punto final	32
	3.4.5.3 Documentación del producto de PCR	33
3.4.6	Etapa 6: Registro de la información y análisis de resultados.....	33
4	CAPITULO 4.....	35
4.1	Resultados y discusión	35
5	CAPITULO 5.....	50
5.1	Conclusiones	50
5.2	Recomendaciones	51
6.	Bibliografía	53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Operacionalización de variables	27
Tabla 2: Listado de materiales, reactivo, medios de cultivo y equipos	28
Tabla 3: Distribución de cepas viables y no viables según sexo y grupo etario.....	35
Tabla 4: Perfil fenotípico de las cepas viables.....	36
Tabla 5: Perfil de susceptibilidad de las cepas viables	38
Tabla 6: Presencia de los genes <i>ply</i> , <i>cpsA</i> y <i>cpsB</i> em las cepas mediante PCR	39
Tabla 7: Frecuencia de serotipos capsulares de <i>Streptococcus pneumoniae</i> del cepario de la carrera de Laboratorio Clínico	40
Tabla 8: Valores de chi cuadrado para la asociación de perfil de susceptibilidad y serotipo	43

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Carta de aprobación de unidad de titulación.....	60
Anexo 2: Oficio de aprobación del CEISH – HOSPITAL PEDIÁTRICO BACA ORTIZ	61
Anexo 3: Protocolo de extracción de ADN	63
Anexo 4: Protocolo de reacción de PCR	65
Anexo 5: Protocolo de programación del termociclador.....	67

CAPÍTULO 1

1.1 Justificación

Streptococcus pneumoniae o neumococo es un coco grampositivo que pertenece a la familia Streptococcaceae. Es una bacteria anaerobia facultativa cuyo crecimiento se ve favorecido en presencia de CO₂. Es conocido como uno de los patógenos bacterianos más comunes que reside en el tracto respiratorio y es causante de enfermedades como lo son la neumonía, otitis media, meningitis y sepsis (Iraurgi, 2012). La cápsula del neumococo representa su principal mecanismo de virulencia, ya que le permite evadir los mecanismos de defensa del huésped, en particular la fagocitosis. Esta estructura está compuesta en su mayoría por peptidoglucano, una matriz formada por extensas cadenas de polisacáridos unidas mediante enlaces peptídicos. Por estas características, la cápsula actúa como una barrera que impide el reconocimiento y destrucción por parte de las células inmunitarias, y también bloquea la activación del sistema del complemento, evitando así la opsonización. Por ello, se considera un componente clave en la capacidad del neumococo para sobrevivir y propagarse en el organismo. Además, es capaz de producir cápsulas con diversas estructuras, las cuales varían según la composición y disposición de sus unidades de monosacáridos, lo que ha dado lugar a más de 90 serotipos capsulares distintos (Iraurgi, 2012; Ruvinsky, 2001).

La información genética necesaria para la producción de los distintos tipos de polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* se encuentra agrupada en un conjunto de genes conocidos como *cps*, los cuales están localizados en un mismo locus del genoma, específicamente entre los genes *dexB* y *aliA*. Estos locus *cps* pueden variar considerablemente en tamaño, desde aproximadamente 2,2 kb hasta 30 kb, e incluyen genes conservados como *cpsA*, *cpsB*, *cpsC* y *cpsD*. La identificación del serotipo capsular reviste gran importancia clínica, ya que influye directamente en el grado de virulencia del microorganismo y, por lo tanto, en la manifestación de la enfermedad. Asimismo, posee un valor epidemiológico significativo, especialmente en el contexto de la efectividad de las vacunas. En América Latina, los serotipos más frecuentes son el 19A, 3, 12F, 14 y 1; mientras que, en Ecuador, el serotipo que predomina es el 19A (Iraurgi, 2012; Salazar et al., 2022; Wen et al., 2015).

Streptococcus pneumoniae es un patógeno considerado uno de los principales agentes causales de la neumonía adquirida en la comunidad, asociado con elevadas tasas de mortalidad en casos de sepsis neumocócica (Kadioglu et al., 2008). Según Ipiales, et al., 2023 a nivel

mundial la neumonía es considerada la principal causa de muerte infantil, principalmente en niños menores de 5 años. En Ecuador, datos del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) estiman que el neumococo es responsable del 30% al 50% de casos de neumonía adquirida en la comunidad y de enfermedad neumocócica invasiva; en 2019 se reportó que cerca del 20% de los egresos hospitalarios correspondían a neumonías de origen bacteriano, constituyendo la principal causa de morbilidad infantil (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2020).

En Ecuador, la introducción de la vacuna conjugada heptavalente en el calendario nacional de inmunizaciones fue el primer paso de la estrategia de prevención, transcurridos tres años de este hito, en 2011, esta fue reemplazada por la vacuna neumocócica conjugada decavalente, actualizando así el esquema nacional. La vacuna contiene polisacáridos purificados de 10 serotipos, considerándose más efectiva que la heptavalente; su comercialización se autoriza con el fin de la protección frente a la ENI (Enfermedad Neumocócica Invasiva) y otitis media, proyectando que se podrían prevenir más de 200 muertes y reducir complicaciones graves asociadas a enfermedades producidas por el neumococo (Guevara, 2016).

1.2 Planteamiento del problema

La cápsula de *Streptococcus pneumoniae* es su principal factor de virulencia, esencial para la supervivencia del patógeno en el torrente sanguíneo y estrechamente asociada con su capacidad para evadir la fagocitosis. Esta cápsula, compuesta por polisacáridos, presenta una gran variabilidad estructural que ha permitido clasificar al neumococo en más de 90 serotipos. Cada serotipo se caracteriza por poseer una combinación única de genes o alelos dentro del locus cps, lo que permite su diferenciación molecular. Dicha diversidad constituye la base sobre la cual se han desarrollado las vacunas neumocócicas conjugadas (PCV) y polisacáridas actualmente aprobadas en más de 70 países. Además, se ha observado que algunos serotipos están más frecuentemente asociados con casos de enfermedad neumocócica invasiva, lo que refuerza la necesidad de su identificación precisa y oportuna. Ante la ausencia de estudios moleculares actualizados en el ámbito local, se hace necesario caracterizar genéticamente las cepas almacenadas de *Streptococcus pneumoniae*, a fin de aportar información valiosa para la vigilancia epidemiológica, la selección de vacunas efectivas y el fortalecimiento de las estrategias de salud pública (Salter et al., 2012).

En base a todo lo mencionado, se procede a realizar la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuáles son las características moleculares de la cápsula de *Streptococcus pneumoniae* que determina la virulencia de estos serotipos en Ecuador?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Determinar las características moleculares de la cápsula de *Streptococcus pneumoniae* en el cepario de la carrera de Laboratorio Clínico de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Establecer las características fenotípicas y perfil de susceptibilidad de las cepas de *Streptococcus pneumoniae* almacenadas en el cepario de la carrera de Laboratorio Clínico de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Identificar los genes *ply*, *cpsA* y *cpsB* del locus *cps* y serotipificación de *Streptococcus pneumoniae* mediante la técnica molecular de PCR en punto final.
- Determinar la frecuencia de los serotipos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* en el cepario de la carrera de Laboratorio Clínico de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

1.3.3 Limitaciones

Las principales limitaciones que presentó el proyecto fue la disponibilidad de cepas viables, ya que al momento de almacenarlas, muchas veces estas pueden perder su calidad, lo que disminuye considerablemente el tamaño de muestra, de manera que los resultados obtenidos no representarían a la población de estudio en su totalidad aumentando el porcentaje de error, por lo que el proyecto pretende tener un número de cepas representativo para la población de estudio.

CAPÍTULO 2

2.1 Antecedentes

Según Kadioglu et al., (2008) el *Streptococcus pneumoniae* se ha descrito como un principal agente bacteriano causante de infecciones respiratorias, asociado con frecuencia a la neumonía adquirida en la comunidad. Cuando esta condición se presenta junto con septicemia neumocócica ha sido capaz de alcanzar tasas de mortalidad superiores al 20%. A nivel mundial, los datos registrados son aún más inquietantes, pues en países en vías de desarrollo, esta bacteria representa alrededor del 25% de muertes evitables en niños menores de 5 años, con un aproximado de 1.2 millones de muertes infantiles al año.

Streptococcus pneumoniae presenta diversos factores de virulencia que le confieren la capacidad de evadir las defensas del huésped y favorecer la progresión de la enfermedad. Entre estos se incluyen el polisacárido capsular (CPS), la neumolisina, el antígeno de superficie neumocócico A y las proteínas de unión a la colina. De todos ellos, el polisacárido capsular se identificó como el principal determinante en la patogenia neumocócica. El CPS exhibe múltiples características funcionales, siendo particularmente relevante su capacidad para conferir resistencia frente a la eliminación mediada por opsonofagocitosis. Si bien se ha establecido que el polisacárido capsular participa activamente tanto en la colonización de las mucosas como en la instauración de la enfermedad invasiva, diversas investigaciones evidenciaron que su expresión varía según el estado fisiológico de la bacteria. En este sentido, se reportó una producción diferencial de CPS entre cepas entre neumococos en estado de portador y aquellos en crecimiento libre en medios sanguíneos (Wu et al., 2016).

En 1993, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) puso en desarrollo un estudio que se llevó a cabo en 6 países de Latinoamérica, cuyo objetivo era identificar los serotipos más prevalentes en estos países, evaluar su inclusión en las vacunas conjugadas y analizar su resistencia a la penicilina. Los resultados del estudio arrojaron que los serotipos más prevalentes en la región eran el 14, 5, 1, 6A, 6B, 23F y 19F, aunque se observaron variaciones entre países. A pesar de que la resistencia a la penicilina alcanzó niveles significativos en ciertas zonas, como México 21,1%, las cepas con sensibilidad reducida pueden aún ser tratadas eficazmente con dicho antibiótico. Sin embargo, solo el 58% de los serotipos detectados estaban contemplados en la vacuna heptavalente, lo que resalta la

necesidad de mantener una vigilancia constante para adaptar las formulaciones vacunales a la realidad epidemiológica de América Latina (Camargos et al., 2006).

En Ecuador, la información que se encuentra disponible sobre *Streptococcus pneumoniae*, hasta el día de hoy, es muy limitada, lo cual se atribuye a diversos factores como lo son la baja inversión en investigación y una disponibilidad restringida a estudios sobre biología molecular en laboratorios clínicos del país. Además, existe también una falta de trabajo coordinado entre las instituciones académicas, las de salud y gubernamentales, lo que ha dificultado una visión completa y precisa de datos epidemiológicos del neumococo en el país. En este contexto, el presente estudio adquiere relevancia, ya que busca caracterizar molecularmente la cápsula de cepas almacenadas en el cepario de la Carrera de Laboratorio Clínico de la PUCE. Al generar evidencia sobre la diversidad capsular de estos aislamientos.

2.2 Marco Teórico

2.2.1 Neumococo

Streptococcus pneumoniae, también conocido como neumococo, ha sido reconocido como un agente patógeno significativo asociado a casos graves de neumonía desde sus primeros años. Tuvo relevancia en la pandemia de gripe de 1918, debido a que fue el responsable de gran proporción de muertes por infecciones bacterianas secundarias. Hoy en día, el neumococo continúa siendo una de las principales causas de neumonía adquirida en la comunidad, otitis media, meningitis y bacteriemia, patologías que forman parte del espectro de enfermedad neumocócica invasiva (ENI). La mortalidad por estas infecciones sigue siendo considerable a pesar del uso de antibióticos, alcanzando un mayor porcentaje en pacientes con condiciones clínicas severas o en individuos inmunocomprometidos. En 2006, la OMS reportó que la enfermedad neumocócica causaba al menos 1,5 millones de muertes anuales y en 2009 se le atribuyen hasta un millón de muertes en niños menores de cinco años. Después de varios estudios, se observó que la respuesta inmune frente al neumococo dependía de su serotipo, el cual es determinado por la composición química y estructural de la cápsula, la cual en un inicio fue descrita como un halo invisible que rodea la bacteria, pero posteriormente se la denominó como un polisacárido, siendo establecida como el principal factor de virulencia del neumococo por su papel en la evasión de la fagocitosis lo que ha guiado al desarrollo de vacunas específicas basadas en los serotipos capsulares (Geno et al., 2015).

En cuanto a su epidemiología, las infecciones causadas por esta bacteria están presentes en todo el mundo y son más prevalentes en ciertas estaciones como el invierno y los principios de la primavera. Su prevalencia se debe a su capacidad de colonización en la nasofaringe siendo así que casi entre el 40% y 50% de niños sanos y entre el 20% y 30% de adultos sanos son portadores, a pesar de que con la vacunación conjugada contra el *Streptococcus pneumoniae* su frecuencia de colonización ha disminuido. La neumonía causada por este agente patógeno puede presentarse en todas las poblaciones; sin embargo, es mucho más frecuente en pacientes menores de 2 años, asmáticos o con EPOC, o asplénicos (Al-Tawfiq & Bibby, 2023).

En Ecuador, *Streptococcus pneumoniae* representa una de las etiologías más importantes de neumonía adquirida en la comunidad y enfermedad neumocócica invasora en niños bajo 5 años, siendo así que, en el año 2019 según datos del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos del Ecuador, la neumonía bacteriana representó el 20% del total de egresos hospitalarios en niños menores a los 5 años de edad, siendo esta la principal causa de morbilidad en este grupo etario (Ipiates et al., 2023).

2.2.2 Estructura y factores de virulencia de *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae es un coco ovalado Gram positivo que presenta una hemólisis de tipo alfa, su diámetro oscila entre las 0,5-1,2 μm , se observa en parejas lanceoladas o en cadenas cortas; no produce esporas y es inmóvil. Se considera una bacteria fastidiosa que crece en medios enriquecidos con sangre, es anaerobia facultativa, su crecimiento se ve favorecido en presencia de CO_2 en un 3-5%, sus colonias son mucoides por la presencia de cápsula, y redondas rodeadas por un halo verdoso, característico de su hemólisis. Llega a presentar una depresión o invaginación central en sus colonias en un periodo prolongado de incubación, debido a que sufre autólisis por acción de peróxidos y autolisinas (Iraurgui, 2012).

En *Streptococcus pneumoniae* se distinguen dos tipos de variantes morfológicas clasificadas como virulentas y relativamente virulentas. En aquellas colonias más opacas se considera que existe mayor expresión de polisacárido capsular y menos ácido teicoico considerándola más invasiva, presenta una adherencia poco eficaz para colonizar la nasofaringe, sin embargo, tiene una buena adaptación para evadir la respuesta inmune en el huésped, considerándose virulentas. Mientras que, las colonias transparentes o menos opacas presentan más cantidad de ácido teicoico y menos polisacárido capsular, facilitando adherencia y transporte eficientemente, siendo relativamente virulentas (Li & Zhang, 2019).

La virulencia de *Streptococcus pneumoniae* se atribuye a múltiples factores que le permiten evadir la respuesta inmune haciendo que colonice eficientemente al huésped. Entre ellos, principalmente la cápsula de polisacárido que inhibe la fagocitosis ante los macrófagos, y produce anticuerpos humorales, siendo así que neumococos no capsulados son fagocitados inmediatamente (Iraurgi, 2012). Entre otros factores se encuentran la neumolisina (Ply), conocida como una toxina formadora de poros transmembrana permitiendo que el neumococo invada el citosol de las células huésped, un claro ejemplo es la apoptosis de epitelio pulmonar. La autolisina (LytA) es responsable de liberar la neumolisina y las neuraminidasas (Nan A y NanB) facilitan la colonización, invasión y diseminación del neumococo al escindir el ácido siálico terminal de los glucanos (Weiser et al., 2018). Finalmente, las proteínas de superficie (CbpA, PsaA y PspA) facilitan la adhesión de la bacteria a las células del huésped, además, participan en la evasión del sistema inmune, colonización del tracto respiratorio superior y reducen la opsonización y fagocitosis inhibiendo la activación del complemento, respectivamente (Iraurgi, 2012).

2.2.3 Cápsula de *Streptococcus pneumoniae*

Su cápsula principalmente está compuesta por polisacáridos de alto peso molecular, su estructura química varía según el serotipo. Los polisacáridos capsulares se forman de unidades repetidas de glucosa, galactosa, ácido glucurónico, N-acetilglucosamina o N-acetilmurámico unidos por enlaces glucosídicos específicos. Su variabilidad estructural determina la antigenicidad e influye en la capacidad para evadir el sistema inmunitario para cada serotipo, debido a que algunas composiciones químicas ofrecen mayor resistencia a la fagocitosis y al ataque del complemento (Weiser et al., 2018).

Los serotipos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* han sido objeto de estudio durante más de un siglo, recientes avances tecnológicos han revelado una mayor complejidad de la que se pensaba. Si bien se conocen al menos 100 serotipos capsulares, los genes responsables de esta biosíntesis se encuentran en una misma zona, conocida como cps loci o el locus cps; *wzg*, *wzd*, *wzh* y *wze* son los genes promotores de la cápsula del neumococo, estos genes se dividen en grupos dependiendo de sus funciones, de tal manera que un grupo es común en todos los serotipos, y otros son específicos de cada serotipo (Mostowy, et al., 2017).

La introducción de herramientas como los anticuerpos monoclonales permitió, por ejemplo, el descubrimiento del serotipo 6C en 2007, el cual había sido erróneamente clasificado

como 6A debido a la reactividad cruzada de los sueros usados en su tipificación. Este hallazgo fue clave para entender el fenómeno de reemplazo de serotipos tras la introducción de vacunas conjugadas como la PCV7. Desde 1995 se han identificado al menos siete serotipos nuevos, como los subtipos 20A y 20B, elevando el total conocido a 97. Además, estudios genómicos han evidenciado la existencia de serotipos potenciales basados en variaciones genéticas específicas dentro de los loci capsulares, como es el caso del serotipo 6D, predicho a partir de análisis moleculares antes de su descubrimiento en la naturaleza. La presencia de regiones genéticas inestables, como repeticiones en tándem, facilita la aparición de nuevas variantes, como ocurre con los serotipos 15B y 15C, cuya diferencia radica en la funcionalidad del gen *cps15bM*. Incluso una sola mutación puntual puede alterar la actividad enzimática de una transferasa, generando una estructura capsular distinta, como se ha demostrado en el caso del serotipo 11D, derivado del 11A. Estos resultados sugieren que un mismo serogrupo puede contener una diversidad serotípica mucho mayor de la que se reconoce actualmente, con implicaciones importantes para el diseño de vacunas y la vigilancia epidemiológica, ya que estas variantes pueden escapar a la inmunidad generada por serotipos incluidos en vacunas existentes (Geno et al., 2015).

2.2.4 Métodos de caracterización molecular

La caracterización molecular se define como aquel procedimiento que implica el análisis genómico, es decir, el estudio completo de genes de un organismo y cómo estos afectan directamente en la forma en que se expresan ciertas características, con el fin de diferenciar y clasificar cepas de una especie bacteriana específica (Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET, s.f). Según Huang et al. (2022) este procedimiento se basa, fundamentalmente, en analizar componentes moleculares como el ADN o ARN de las especies, con el fin de determinar a qué serotipo pertenecen, genes de virulencia de los aislamientos e incluso su resistencia a los distintos fármacos existentes.

La caracterización molecular se lleva a cabo mediante distintas herramientas de medición molecular, uno de los métodos más frecuentes es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual se basa en la amplificación de un fragmento de una secuencia específica del ADN en millones de copias, con el fin de determinar genes o confirmar la presencia de un organismo en específico (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2017). Según Wu et al. (2016) se realizó una qRT-PCR para determinar la expresión del locus *cps* que está regulada transcripcionalmente por el gen *CpsR*, el cual es un gen de

regulación del polisacárido capsular, conocido como uno de los factores de virulencia neumocócica más importantes. La PCR también ha sido muy utilizada para la serotipificación de las cepas, ya que se han descrito ensayos en los que se ha realizado mPCR específicas de serotipo para identificar números variables de serotipos de aparición común, haciendo uso de genes específicos conocidos para cada serotipo y también genes de control como lo es el gen *cpsA* (Geno et al., 2015).

De igual manera, la serotipificación también es posible gracias a la secuenciación, procedimiento utilizado para determinar el orden exacto que componen a una molécula de ADN u orden completo de aminoácidos que componen a una molécula de ARN, esto ha sido posible generando una secuencia completa de la región *cpsB* de 1017 pb, lo que se demostró que la resolución para la identificación de serotipos de neumococo aumentó (Gonzales-Siles et al., 2019)

2.2.5 Importancia clínica de la tipificación capsular

La cápsula de polisacárido es el principal objetivo de las vacunas, puesto que la serotipificación se convierte en una prioridad, considerándose una herramienta para entender la evolución del *Streptococcus pneumoniae*. Monitorear los cambios en la epidemiología de cada región geográfica, tanto como el mapeo de los serotipos, se ha convertido en un desafío, tanto como en una preeminencia; identificar los serotipos más prevalentes conduce a introducirlos en las vacunas conjugadas para dar una cobertura de inmunización a la población más vulnerable, sin embargo, también conocer los serotipos no vacunales proporciona información acerca de aquellos que probablemente adquieran más prevalencia y que desarrollen mayor resistencia, ofreciendo una perspectiva de cuál será la nueva vacuna conjugada que reemplace a la anterior (Candeias et al., 2024).

Las vacunas antineumocócicas conjugadas introducidas en el esquema se han diseñado conforme se estudia la evolución de ciertos serotipos, no obstante, la diversidad de polisacáridos capsulares de neumococo desafía la capacidad de la vacuna para prevenir enfermedades neumocócicas. Siendo así que se ha considerado el uso de vacunas como una oportunidad para el neumococo de reemplazar serotipos vacunales por los no vacunales, haciendo que estos aumenten su incidencia. Aunque se conocen los serotipos más prevalentes en todo el país, la distribución y la resistencia varían dependiendo de la geografía, la edad y la cobertura de vacunas antineumocócicas, haciendo que el neumococo sea reconocido por la

OMS como una de las bacterias que más atenta a la salud humana, la alta resistencia que presenta *Streptococcus pneumoniae* frente a la penicilina es un problema creciente. “La resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a la penicilina G aumentó del 2,7% en 2011 al 100% en 2020” (Al-Selwi & Barkat, 2023, párr. 4). Se le atribuye esta problemática al uso inadecuado de los antibióticos, tanto como a la introducción de las vacunas conjugadas debido a que cambian el equilibrio de los serotipos y reducen los serotipos vacunales y emergen otros serotipos que presentan mayor resistencia a ciertos antibióticos, entre ellos la penicilina (Han, et al., 2022).

2.2.6 Genética de la síntesis capsular de *Streptococcus pneumoniae*

Según Vivanco et al. (2022) el polisacárido capsular o también conocido como CPS es el principal factor de virulencia del neumococo, pues este también es el encargado de clasificar y diferenciar los distintos serotipos de esta bacteria, mismos que se ven implicados en infecciones neumocócicas graves. El locus *cps* es aquel que contiene todos los genes necesarios para la biosíntesis capsular de *Streptococcus pneumoniae*, se encuentra flanqueado o delimitado por dos genes, el gen *dexB* y el gen *aliA*, con un tamaño aproximado de entre 2,2 a 30 kb. El extremo 5' del locus *cps* comienza con genes reguladores, incluyendo los genes *wzh*, *wzg*, *wze*, *wzd* y *cpsABCD*, conjunto de genes que se encuentran altamente conservados en los distintos serotipos de *Streptococcus pneumoniae*. Por lo general, los genes *cpsA* son los encargados de regular la transcripción biosintética, es decir, la activación o represión de los genes que fabrican la cápsula, el sistema *cpsBCD* funciona como fosforregulador, que son aquellos encargados de añadir o quitar grupos fosfato que activan o desactivan a las proteínas relacionadas con la síntesis de la cápsula, pues todo este procedimiento ajusta la cantidad de cápsula que se produce dependiendo de las condiciones de la bacteria para optimizar su virulencia y supervivencia ya que una producción elevada es necesaria para la virulencia sistémica; mientras que, su disminución es beneficiosa para la adherencia y colonización en el tracto nasofaríngeo del hospedador.

Como se mencionó, el polisacárido capsular (CPS) también es capaz de clasificar a *Streptococcus pneumoniae* en distintos serotipos, pues en la mayoría de serotipos los CPS se sintetizan mediante una vía dependiente de Wzx/Wzy, es decir, Wzx transporta subunidades de polisacárido desde el interior de la célula a la cara externa de la membrana; mientras que, Wzy se encarga de unir una tras otra las subunidades con el fin de formar la cadena larga de polisacárido, a excepción de los serotipos 3 y 37 que estos utilizan una vía dependiente de la

sintasa, que es una enzima que ensambla el polisacárido directamente transportándolo al exterior a medida que lo va sintetizando (Vivanco et al., 2022).

La serotipificación capsular es fundamental al momento de determinar la patogenicidad de *Streptococcus pneumoniae*, pues esto ayuda al monitoreo y evaluación del reemplazo de serotipo, tipo no vacunal y serotipo nuevo. El reemplazo de serotipos es un fenómeno que ocurre debido a ciertas presiones selectivas como la vacunación o el uso de antibióticos, los cuales provocan cambios en la prevalencia de ciertos serotipos sobre otros. Se ha descrito que *Streptococcus pneumoniae* es capaz de adquirir nuevo material genético gracias a la transferencia horizontal de genes, lo que conduce a la aparición de nuevos serotipos. Esta transferencia se puede dar gracias a la transformación, transducción o conjugación mediada por bacteriófagos o también por cambios que alteran la estructura química de CPS como lo son las mutaciones puntuales, delección y la inserción dentro de los loci cps, dando como resultado el cambio de serotipo. Este fenómeno en particular resulta de mucha importancia en la reducción de la eficacia general de las vacunas, pues si los serotipos que reemplazan resultan ser más virulentos o resistentes a los antibióticos, pueden dificultar el mantenimiento de la protección contra la enfermedad neumocócica (Vivanco et al., 2022).

2.2.7 Resistencia antimicrobiana y su relación con los serotipos capsulares

La resistencia antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* ha evolucionado en las últimas décadas. Durante los años setenta era poco común observar un patrón de resistencia frente a una prueba de sensibilidad, pero con el tiempo comenzaron a emerger resistencias frente a tetraciclinas y macrólidos lo que condujo a la aparición de cepas multirresistentes una década después. La evolución de mecanismos de resistencia del neumococo incluye la alteración de las proteínas de unión a penicilina provocando resistencia a la misma; en el caso de macrólidos y lincosamidas, la resistencia ocurre por modificaciones en las bombas de eflujo, mientras que la adquisición de genes móviles confiere resistencia a fluoroquinolonas y TMP SMX (Trimetoprima-sulfametoxazol). Finalmente, la resistencia a tetraciclinas está mediada por genes que confieren protección ribosómica (Cherazard, et al., 2017).

Streptococcus pneumoniae declarado por la OMS como principales patógenos altamente asociado con elevadas tasas de morbilidad y mortalidad; usa como principales antimicrobianos β -lactámicos, macrólidos y fluoroquinolonas. Sin embargo, se ha demostrado que su eficacia disminuye debido al desarrollo de resistencias, colocando al neumococo entre

los primeros diez patógenos relevantes en resistencias antimicrobianas globales. La preocupación en el sistema de salud por el fracaso en el tratamiento frente al neumococo es altamente preocupante, debido a que la resistencia aumenta tras la era de las vacunas conjugadas neumocócicas, explicado por el reemplazo de serotipos no vacunales (Zahari, 2023). Entre los diferentes serotipos del neumococo existe una diferencia de colonización y virulencia, así también ocurre con las resistencias a antimicrobianos; los principales serotipos considerados como multirresistentes son el 19A, 19F, 15A, 15C, 23A y 23F, esta resistencia surge por una transferencia horizontal de genes. Específicamente serotipos como 6A, 6B, 11A, 14, 23F y 19F presentan resistencia a macrólidos asociada a la presencia del gen *mef E* o *mef A* que activan las bombas de eflujo. En el caso del serotipo 19A, es un claro ejemplo de cómo las PVC cambian el esquema epidemiológico, ya que tuvo una rápida expansión mundial tras la introducción de la PCV7 al ser un serotipo no vacunal; actualmente considerada como preocupación principal en el sistema de salud por su alta resistencia a la penicilina (Cillóniz, et al., 2018).

La preocupación acerca de la resistencia antimicrobiana se atribuye a la limitación de antibióticos convencionales empleados para las diferentes enfermedades que causa *Streptococcus pneumoniae* como neumonía, meningitis y otitis media. Las cepas multirresistentes conducen a mayores tasas de mortalidad por el fracaso terapéutico, incluyendo costos sanitarios elevados por hospitalizaciones prolongadas y la obligación de usar un esquema de antibióticos de última línea (fluoroquinolonas, vancomicina y linezolid). Esta resistencia amenaza con una posible “era post antibióticos” en donde algunas patologías podrían volverse intratables; por lo que, una vigilancia de prevalencia y mapeo de serotipos se vuelve necesaria (Zahari, 2023).

2.3 Marco Conceptual

Cápsula: Estructura compuesta de polisacáridos que rodea la pared celular del neumococo y desempeña un papel importante en la patogénesis de la bacteria (Dion & Ashurst, 2023).

Colonización: Capacidad que tiene el neumococo para generar una fuente de propagación y persistencia. Por lo general, *Streptococcus pneumoniae* coloniza la mucosa del tracto respiratorio superior, ya que sus principales características de colonización son la adherencia a las células y tejidos del hospedador y la evasión de la depuración por el flujo mucociliar (Weiser et al., 2018).

Epidemiología: Se hace referencia a los estudios que analizan y muestran datos acerca de prevalencia, frecuencia e incluso distribución de los distintos serotipos de *Streptococcus pneumoniae* a nivel mundial y en lugares específicos (Weiser et al., 2018).

Fenotipo: Se trata de todas aquellas características visibles, que son el resultado del genotipo y diversos factores ambientales. En el caso del neumococo, su fenotipo se define como “opaco” cuando este posee alta expresión de polisacárido capsular y “transparente” cuando este es reducido (Ruiz-Ruiz & Redondo Margüello, 2024).

Genes reguladores: Genes cuyo principal propósito es la normalización u organización del polisacárido capsular neumocócico, dando como resultado excesiva o nula cantidad de cápsula (Geno et al., 2015).

Infección: Proceso en el cual *Streptococcus pneumoniae* coloniza la nasofaringe humana, se multiplica y ocasiona enfermedades que pueden progresar en neumonías bacteriémicas, meningitis o sepsis (Ruiz-Ruiz & Redondo Margüello, 2024).

Inmunidad: Corresponde a la respuesta generada por anticuerpos funcionales y barreras de defensa con el fin de brindar protección al hospedador, generada en gran parte por vacunas administradas (Ruiz-Ruiz & Redondo Margüello, 2024).

Invasividad: Se refiere a la progresión de la enfermedad, pues en un principio el neumococo causa enfermedades no invasivas como otitis o neumonías, pero con la evasión a la inmunidad por parte de la bacteria, las enfermedades progresan en invasivas dando a entender que esta se ha extendido generando enfermedades más graves como neumonía bacteriémica, meningitis o sepsis (Ruiz-Ruiz & Redondo Margüello, 2024).

Locus cps: Corresponde al sitio en donde se encuentran ubicados el grupo de genes encargados de la biosíntesis de la cápsula de *Streptococcus pneumoniae* encapsulado (Salter et al., 2012).

Neumococo: Nombre común para referirse a la bacteria *Streptococcus pneumoniae*, coco Gram positivo capaz de causar enfermedad neumocócica, siendo la causa más frecuente de bacteriemia, sepsis y meningitis bacteriana tanto en niños como en adultos (Iraurgi, 2012).

Neumonía: Corresponde a una infección aguda que afecta principalmente el parénquima pulmonar, siendo una respuesta inflamatoria a la invasión de alveolos y vía aérea por

microorganismos; entre los más frecuentes y relevantes, *Streptococcus pneumoniae* (Álvarez, 2019).

Patogenicidad: Capacidad de *Streptococcus pneumoniae* para producir enfermedades en un hospedero; determinada por sus factores de virulencia como la cápsula polisacárida, entre otros que le permiten colonizar nasos y orofaringe evadiendo la respuesta inmune. La respuesta inmune del hospedero también juega un papel importante en la patogenicidad (Narciso, et al., 2025).

PCR: La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica molecular utilizada para amplificar regiones del locus cps de *Streptococcus pneumoniae*, funcionando como una multiplicación controlada de fragmentos de ADN; principalmente identifica codificación de la cápsula, confirma y determina serotipos capsulares (Salter et al., 2012).

Prevalencia: Es un factor de importancia para ejecutar análisis epidemiológicos, proporcionando información de la cantidad de individuos de una población, que presentan una cierta condición. En el caso de *Streptococcus pneumoniae*, se enfoca en describir la frecuencia de resistencia antimicrobiana de aislamientos microbiológicos (Han, et al., 2022).

Resistencia antimicrobiana: El neumococo registra un serio problema en el sistema de salud debido a la alta resistencia microbiana que ha ido desarrollando en las últimas décadas; su capacidad de sobrevivir o adaptarse en presencia de distintas líneas de antibióticos se debe a sus mecanismos de resistencia, entre los más importantes la modificación de proteínas de unión a penicilina (Cherazard, et al., 2017).

Serotipo: *Streptococcus pneumoniae* se diferencia en más de 100 serotipos, cada uno correspondiente a una cepa diferenciada estructuralmente por la composición de su polisacárido capsular. Cada variación genética dada en el cps loci de genes específicos como *wzy* y *wzx*; mutaciones o recombinación genética por transferencia horizontal genera esta subdivisión diferenciada en su estructura, virulencia e inmunogenicidad (Vivanco et al., 2022).

Susceptibilidad: Se refiere al comportamiento de inhibición o destrucción del neumococo frente a un antibiótico, evaluar un perfil de susceptibilidad principalmente en esta especie es clave debido a que, en las últimas décadas la resistencia es creciente, primordialmente en la penicilina y los macrólidos (OPS, 2005).

Vacunas: Corresponden a soluciones biológicas que se enfocan en inducir al sistema inmune una respuesta frente a los polisacáridos capsulares de neumococo. Principalmente se distinguen en vacunas vivas atenuadas e inactivadas; y por otro lado en vacunas de subunidad que incluye de polisacárido o conjugada, siendo esta última la vacuna incluida en el esquema de vacunación y aquella que se encuentra en el mercado al utilizar proteínas transportadoras a más de los antígenos polisacáridos, induciendo una respuesta de las células T (Kim, et al., 2017).

Variabilidad genética: Se refiere a los cambios en el material genético del neumococo, principalmente en el polisacárido capsular, siendo la base para originar múltiples serotipos por mecanismos de recombinación, mutaciones y transferencia horizontal de genes. Este proceso deja como consecuencia la aparición de nuevos serotipos y resistencia antimicrobiana invalidando la inmunidad inducida por las vacunas neumocócicas (Vivanco et al., 2022).

Virulencia: *Streptococcus pneumoniae* presenta una alta virulencia debido a la neumolisina, proteínas de superficie, autolisina y neuraminidasa que presenta y facilita la colonización y evasión del sistema inmune del hospedero mediante mecanismos de lisis celular, rápida liberación de componentes bacterianos y adhesión, respectivamente (Iraurgui, 2012).

CAPÍTULO 3

3.1 Marco metodológico

3.1.1 Materiales y métodos

Las cepas de *Streptococcus pneumoniae* seleccionadas para este estudio corresponden al universo de las cepas almacenadas en el cepario de la Carrera de Laboratorio Clínico de la PUCE.

3.1.1.1 Tipo de estudio

La investigación corresponde a un estudio de tipo descriptivo, observacional y transversal. Se trata de un estudio descriptivo, ya que se detallaron los perfiles fenotípicos y genotípicos de las cepas de *Streptococcus pneumoniae* analizadas. Es observacional porque no hubo manipulación de las variables en estudio, y transversal porque su medición se realizó en un único punto en el tiempo. La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de investigación de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE).

3.1.1.2 Tipo de muestreo y muestra

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia debido a la selección de cepas identificadas como *Streptococcus pneumoniae* del cepario de la carrera de Laboratorio Clínico de la PUCE mismas que cumplieron con los criterios de inclusión específicos para el estudio. El tamaño del universo a usarse corresponde al total de muestras viables que ha sido registrado de 70 cepas.

3.1.1.3 Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión son los siguientes: cepas identificadas como *Streptococcus pneumoniae* viables.

3.1.1.4 Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión serán: ausencia de crecimiento en el medio de cultivo posterior a 48 horas de incubación, cultivos contaminados con otros microorganismos sin posibilidad de recuperación y cepas no identificadas como *Streptococcus pneumoniae*.

3.1.1.5 Análisis Estadísticos

El análisis estadístico se desarrolló en el programa SPSS v19.0, en el cual se establecieron las frecuencias relativas y absolutas de acuerdo con el tipo de variable, y la determinación de las características moleculares de la cápsula de *Streptococcus pneumoniae*.

3.2 Operacionalización de variables

Tabla 1: Operacionalización de variables

Variable	Tipo	Dimensión	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Escala
Caracterización molecular de la cápsula de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Dependiente	Identificación genética	Proceso mediante el cual se identifican genéticamente los serotipos capsulares del neumococo.	Detección de genes capsulares mediante técnicas moleculares como PCR.	Resultado positivo o negativo Coincidencia con serotipo específico	Ficha de resultados Informe de laboratorio
Presencia del gen capsular (<i>cpsA</i> , <i>cpsB</i>)	Independiente	Genotipo capsular	Existencia de genes responsables de la síntesis de la cápsula.	Confirmación mediante amplificación molecular (PCR).	Gen presente Gen ausente	Resultados de PCR Electroforesis
Tipo de serotipo capsular	Independiente	Serotipificación	Clasificación del neumococo según su cápsula polisacárida.	Detección específica del serotipo mediante PCR.	Serotipo 19A, 15A, 3, 6A, 6C, etc.	Registro de resultados moleculares
Técnica molecular utilizada	Independiente	Método diagnóstico	Procedimiento de análisis del ADN bacteriano.	Método aplicado en laboratorio: PCR convencional, PCR multiplex, etc.	Técnica utilizada Resultados obtenidos	Protocolo técnico del laboratorio
Año de aislamiento de la cepa	Control	Temporal	Momento en que se obtuvo la cepa clínica.	Año registrado en los informes de recolección.	2023 2024 2025	Registro de laboratorio clínico
Código de identificación de cepa	Control	Trazabilidad	Identificación única de cada muestra.	Código alfanumérico asignado a cada cepa almacenada.	Código individual	Base de datos de cepas

3.3 Materiales y proceso

Para el desarrollo del presente estudio se emplearon diversos materiales, como reactivos, medios de cultivo y equipos necesarios para el aislamiento, identificación, caracterización molecular y análisis de sensibilidad antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae*. En la tabla 2 se detallan los insumos utilizados durante las diferentes etapas del proceso experimental, garantizando la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados obtenidos.

Tabla 2: Listado de materiales, reactivos, medios de cultivo y equipos.

Materiales	Reactivos	Medios de cultivo	Equipos
Caja Petri	Tinción Gram	Agar sangre	Microscopio
Aza para microbiología	Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	Agar Müeller-Hinton con 5% sangre	Incubadora
Mechero	Tampón TE	Medio BHI	Autoclave
Portaobjetos	Tampón ATL		Cabina de seguridad
Toallas de papel	Tampón AL		Vórtex
Guantes	Tampón AW1		Termobloque
Mascarilla	Tampón AW2		Microcentrífuga
Palillos de madera	Tampón AE		NanoDrop
Tubos de microcentrífuga (1,5 mL)	Proteinasa K		Espectrofotómetro
Puntas con filtro 200 ul	Etanol absoluto (100%)		Termociclador
Puntas con filtro 1000 ul	Etanol (70%)		Computadora
Puntas con filtro 10 ul	Agua molecular estéril		Fuente de poder
Micropipetas automáticas	Buffer TAE 1X		Transiluminador
Cámara de electroforesis	Primers		
	Agente Intercalante		
	Ladder		
	Loading dye		
	Agarosa		

3.3.1 Control de calidad

Para asegurar la validez de los resultados, se aplicaron procedimientos de control de calidad en cada etapa del análisis. Se verificó la pureza de cada cultivo mediante resiembra y aislamiento de las cepas en medios de cultivo preparados bajo las condiciones establecidas en el CLSI M100-2025, mismo que se usó para la realización de antibiogramas, cumpliendo con la calidad del medio, la reproducibilidad de los halos y verificación del punto de corte.

De igual manera, se controló el adecuado mantenimiento de las condiciones de trabajo, en donde se establecieron áreas separadas para la manipulación de reactivos, ADN y productos amplificados, así como cabinas previamente desinfectadas y expuestas a luz UV.

Para la extracción de ADN, se evaluó la concentración y pureza de las muestras mediante espectrofotometría, considerando como cantidad óptima 50 ng/μL. Las extracciones que no alcanzaron este límite fueron repetidas para evitar errores en la amplificación.

En las reacciones de PCR se incluyeron controles positivos previamente caracterizados en el INSPI, así mismo, se monitoreó la calidad de la Taq polimerasa y la estabilidad de los reactivos mediante ensayos preliminares.

Finalmente, cada ensayo fue contrastado con los patrones de amplificación obtenidos *ply*, *cpsA* y *cpsB* positivos para su posterior serotipificación. Cualquier discrepancia, banda débil o amplificación múltiple fue repetida antes de ser incluida en la base de datos final.

3.4 Procedimiento

3.4.1 Etapa 1: Solicitudes, aprobaciones y autorizaciones.

El proyecto fue expuesto a la unidad de titulación, una vez obtenida la aprobación por parte de la unidad de titulación (Anexo 1). Posteriormente se completó los requisitos y se envió el proyecto para su aprobación y se inició con la aprobación y autorización del CEISH (Anexo 2)

3.4.2 Etapa 2: Recolección y almacenamiento de cepas de *Streptococcus pneumoniae*.

Las cepas de *Streptococcus pneumoniae* almacenadas en crioviales en el cepario de la carrera de Laboratorio Clínico se transportaron al laboratorio de experimentación en condiciones adecuadas para mantener su viabilidad. Una vez en el laboratorio fueron sembradas en medios de cultivo de agar sangre y se incubaron a 37°C en condiciones de CO₂ durante 24 horas hasta observar un crecimiento óptimo. Posterior a esto se pudo realizar la tercera etapa.

3.4.3 Etapa 3: Resiembra, caracterización fenotípica y perfil de susceptibilidad de las cepas de *Streptococcus pneumoniae*.

Cada una de las cepas recuperadas se volvió a cultivar en agar Sangre, una vez obtenidas las colonias, se realizó la prueba de catalasa y tinción Gram a cada una de las cepas. A las cepas

que cumplieran con los criterios de inclusión se ejecutó la prueba de susceptibilidad en agar Mueller-Hinton con 5% de sangre.

3.4.3.1 Cultivo e identificación

Los cultivos fueron en agar Sangre, se analizaron las colonias obtenidas y se verificó que cumplan con las características descritas en la literatura como colonias redondas, elevadas, de color grisáceo y verde por la hemólisis en el agar sangre y de aspecto mucoso debido a la cápsula de polisacárido y con los criterios de inclusión. En aquellas cepas que se encontraban puras se llevó a cabo las siguientes pruebas fenotípicas; mientras que, aquellas en las que se encontraban dos colonias o más, se aplicó técnicas de aislamiento.

3.4.3.2 Prueba de catalasa y tinción Gram

Para desarrollar la prueba de catalasa, se colocó una gota de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en un portaobjetos limpio, con ayuda de un palillo de madera se tomó una pequeña cantidad de colonia bacteriana y se mezcló la colonia con la gota del peróxido en el portaobjetos, se visualizó la reacción inmediatamente y se anotaron los resultados obtenidos.

Conjuntamente se realizó la tinción Gram a las colonias obtenidas de los cultivos, una vez terminado el proceso de tinción y secado, se procedió a observar la preparación al microscopio con aceite de inmersión (100X) y se anotaron las características observadas.

3.4.3.3 Perfil de susceptibilidad

Obtenidas las colonias puras que cumplieran con los requisitos de inclusión, se procedió a realizar la prueba de susceptibilidad a cada una de las cepas, para esta se suspendió la colonia en solución salina estéril con el fin de ajustar la turbidez al estándar 0,5 McFarland, después en agar Mueller-Hinton con 5% de sangre se sembró el inóculo preparado con ayuda de un hisopo estéril de forma homogénea en toda la superficie de la placa, con ayuda de una pinza estéril, se colocaron los discos antibióticos seleccionados, en este caso, eritromicina, clindamicina, trimetoprima-sulfametoxazol, vancomicina, oxacilina y levofloxacina a una distancia adecuada para evitar la superposición de halos y se incubó las placas por 18 horas a 37 °C en atmósfera con 5% de CO_2 . Transcurridas las horas necesarias se midieron los diámetros de los halos en milímetros con una regla para cada antibiótico y se compararon los valores obtenidos con las tablas de referencia descritas en el CLSI M100 35th edition 2025 para clasificar a la cepa como sensible, intermedia o resistente.

3.4.4 Etapa 4: Extracción de ADN de las cepas viables

Se realizó la extracción de ADN genómico a partir de las cepas viables de *Streptococcus pneumoniae*, utilizando un protocolo específico para bacterias Gram positivas (Anexo 3), se evaluó el mismo mediante espectrofotometría en NanoDrop, asegurando su idoneidad para llevar a cabo las reacciones de PCR en punto final.

Para la extracción de ADN de *Streptococcus pneumoniae* se utilizó el Kit QIAamp DNA Qiagen, siguiendo el protocolo designado para aislamiento de ADN genómico a partir de cultivos bacterianos Gram Positivos. Inicialmente, se seleccionó masivamente el cultivo bacteriano viable y se suspendió en 500 ul de tampón TE en tubos de 1,5 mL. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 7500 rpm durante 10 minutos con la finalidad de obtener un pellet, mismo que se suspendió en 180 ul de tampón ATL. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 minutos para favorecer la lisis inicial de la pared bacteriana. Siguiendo a esto, se añadieron 20 ul de proteinasa K y se incubó esta suspensión a 65 °C durante 2 horas, con agitación en vórtex cada 10 minutos hasta completar las horas designadas; la finalidad de este procedimiento es completar la lisis celular. Una vez obtenida la lisis, se agregaron 200 ul de tampón AL y se dió un vórtex pulsado, inmediatamente se incubó a 95 °C por 15 minutos. Después de un breve centrifugado, se añadieron 200 ul de etanol al 100% y la mezcla se aplicó cuidadosamente a la columna QIAamp Spin para que el ADN se una a la membrana de sílica. La columna se sometió a dos etapas de lavado, primero con 500 ul de tampón AW1 a 8.000 rpm durante 1 minuto, y posteriormente con 500 ul de tampón AW2 a 14.000 rpm durante 3 minutos, asegurando la eliminación de impurezas y restos de proteínas.

Finalmente, la columna se colocó en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y el ADN se eluyó con 50 ul de tampón AE, incubando durante 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugando a 8.000 rpm y una segunda vez a 12.000 rpm. El ADN extraído se almacenó a -20 °C hasta su posterior cuantificación y análisis.

3.4.4.1 Cuantificación y evaluación de la pureza del ADN mediante NanoDrop

Tras la extracción del ADN, su concentración y pureza se determinaron mediante espectrofotometría en un equipo NanoDrop. Previamente a cada serie de mediciones se realizó una limpieza con agua molecular y papel de uso óptico, posterior se midió el blanco utilizando la misma agua molecular. Para empezar a medir cada muestra, primero se registra una identificación, después se colocó 2 ul de ADN sobre el pedestal y se efectuó la lectura, tras cada medición, el ADN se retira con papel óptico para evitar contaminación cruzada; al

finalizar la serie de mediciones se limpió el pedestal con agua molecular y papel óptico. Finalmente, los valores obtenidos de concentración de ADN en (ng/uL) y las relaciones de pureza (260/280) y (260/230) fueron registrados para su posterior análisis.

3.4.5 Etapa 5: Realización de PCR en punto final para la detección de los genes correspondientes.

3.4.5.1 Preparación de la reacción de PCR

La preparación de la mezcla de reacción o “Master Mix” se realizó calculando los volúmenes necesarios para obtener un volumen final de 12,5 µL por reacción. Para cada reacción se utilizaron 6,25 µL de Taq polimerasa, 0,6 µL de primer forward, 0,6 µL de primer reverse, 3,05 µL de agua libre de nucleasas (H₂O) y 2 µL de ADN molde (Anexo 4).

Cada ensayo se determinó con la finalidad de verificar, en cada cepa, la expresión de los genes *ply*, *cpsA* y *cpsB*, así como para la confirmación del serotipo capsular correspondiente.

Antes de iniciar los ensayos, se evaluó el rendimiento de la Taq polimerasa, con el fin de confirmar su buen estado y asegurar amplificaciones confiables. Durante la preparación se trabajó bajo condiciones de bioseguridad, se dispuso que todos los materiales necesarios sean previamente esterilizados, se utilizaron cabinas de flujo laminar y se mantuvieron áreas separadas para el manejo exclusivo de reactivos y manipulación de ADN.

3.4.5.2 PCR en punto final

Para la etapa de amplificación se creó una carpeta específica denominada “Neumococo” en el termociclador, en la cual se almacenaron los protocolos utilizados para cada par de primers. En total se utilizaron 11 protocolos de PCR, correspondientes a los genes *cpsA*, *cpsB*, *ply* y a los ocho serotipos incluidos en el estudio.

Cada protocolo (Anexo 5) contenía las condiciones particulares y específicas de termociclado según la temperatura de alineamiento (T_m) de cada par de primers. La T_m se determinó calculando el promedio de las temperaturas teóricas de los primers forward y reverse de cada gen.

El programa general del termociclador consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos conformados por las etapas estándar de desnaturalización, alineamiento y extensión. La extensión final se realizó a 72 °C durante 10 minutos y finalmente se mantuvieron las reacciones a 4 °C hasta su recuperación. El volumen programado para cada reacción en el termociclador fue de 13 µL, de acuerdo con las configuraciones establecidas en los protocolos específicos.

3.4.5.3 Documentación del producto de PCR

La verificación de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% preparado con buffer TAE 1X, como agente intercalante se empleó SYBR Safe, añadido al gel previo a su solidificación. La elección de la cámara de electroforesis se determinó según el tipo de ensayo y la cantidad de reacciones a visualizar en cada corrida.

Para la separación de los amplicones se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb previamente mezclado con *loading dye*. Las corridas electroforéticas se efectuaron a 90 V durante 50 minutos, asegurando una adecuada resolución de los fragmentos esperados para cada gen o serotipo.

La visualización de las bandas se realizó en un transiluminador UV y las imágenes fueron registradas mediante un sistema de fotodocumentación asociado a un software especializado. La interpretación se basó en presencia o ausencia de bandas en los tamaños esperados. La detección del gen *ply* se consideró como confirmatoria de *Streptococcus pneumoniae*, mientras que la amplificación de *cpsA* indicó la presencia de cápsula y la positividad para *cpsB* evidenció una cápsula conservada, asociada a virulencia y patogenicidad.

En el caso de los serotipos capsulares, cada cepa fue analizada mediante PCR con los ocho pares de primers correspondientes. La presencia de una banda únicamente en el serotipo esperado confirmó la identidad serotípica, mientras que la ausencia de bandas en los demás protocolos corroboró que la cepa no pertenecía a esos serotipos alternativos. El ladder de 100 pb permitió comparar el tamaño de los amplicones obtenidos con los productos esperados para cada serotipo y para los genes *ply*, *cpsA* y *cpsB*, según los resultados del alineamiento de primers.

3.4.6 Etapa 6: Registro de la información y análisis de resultados.

Cada resultado obtenido, tanto de antibiogramas como de PCR, se registró en una base de datos diseñada específicamente para el estudio, en la cual se incluyó la codificación asignada a cada cepa según el orden en el que fueron recibidas, se registró también el control interno del proceso mediante casillas de verificación, en donde se documentó si la cepa había sido sembrada, realizada antibiograma, extracción de ADN y recolección de información clínica limitada (sexo y edad).

De igual manera, se ingresaron los resultados del antibiograma clasificados según criterios del CLSI, identificando cada aislamiento como sensible, intermedio o resistente dependiendo cada antibiótico testado. Posteriormente, una vez realizada la extracción del ADN se cuantificó el mismo y se registró la concentración obtenida, considerando como óptimo un valor cercano o mayor a 50 ng/ μ L.

Finalmente, se documentó los resultados de las PCR en donde se consignó si el resultado fue positivo, negativo, presentó bandas débiles o mostró discrepancias. Además, se emplearon controles de serotipos previamente caracterizados por el INSPI, los cuales permitieron validar las condiciones de amplificación.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS, considerando un total de 62 cepas incluidas en el estudio. Se evaluó la relación entre los distintos serotipos capsulares y el perfil de sensibilidad antimicrobiana, agrupando en la categoría de “no sensibles” a las cepas resistentes e intermedias. Se aplicó la prueba de chi-cuadrado para determinar la presencia de asociaciones significativas entre las variables analizadas, permitiendo identificar patrones relevantes dentro de la distribución de los serotipos y su comportamiento clínico.

CAPÍTULO 4

4.1 Resultados y discusión

En la presente investigación se utilizó un total de 70 cepas almacenadas en la carrera de laboratorio clínico durante los años 2023, 2024 y 2025 de las cuales el 31,4% son del género masculino, el 31,4% del género femenino y el 25,7% no informa, junto con un rango de edad en donde menores a 5 años representan el 61,4% y mayores a 5 representan el 4,3% y no informa el 22,9%, de las 70 cepas recolectadas se obtuvo un crecimiento bacteriano en un total de 62 que representan el 88,6%.

Tabla 3: Distribución de cepas viables y no viables según sexo y grupo etario

Variable	Categoría	Nº	Porcentaje
Viabilidad	Cepas Viables	62	88,6%
	No viables	8	11,4%
Sexo	Masculino	22	31,4%
	Femenino	22	31,4%
	No informa	18	25,8%
Grupo etario	Menor a 5 años	43	61,4%
	Mayor a 5 años	3	4,3%
	No informa	16	22,9%

En la tabla 3 se observa que se recuperó una alta proporción de cepas viables alcanzando el 88,6% del total evidenciando un adecuado manejo y conservación de las muestras. La pérdida del 11,4% de aislamientos puede deberse a almacenamiento prolongado, uso de medios de conservación inadecuados y cambios bruscos de temperatura inestables en ultracongelación, así como a cultivos contaminados, esto se debe a que el neumococo es una bacteria exigente, principalmente, en sus requerimientos nutricionales, lo que la hace más propensa a ser desplazada por contaminantes ambientales.

En cuanto al grupo etario, la mayoría de las cepas procedió de niños menores de 5 años, lo cual coincide con la literatura que indica que este grupo constituye a la población más

afectada por *Streptococcus pneumoniae* tanto en la colonización nasofaríngea como en enfermedad invasiva. El porcentaje bajo de aislamientos en mayores de 5 años refuerza esta tendencia, aunque el 22,9% de casos no presente dato etario, no cambia el patrón observado.

El hallazgo de una viabilidad del 88,6% sugiere un banco de cepas representativo y óptimo para estudios posteriores, sin embargo, el porcentaje de pérdida sugiere que el protocolo del almacenamiento utilizado podría ser perfeccionado para aumentar su eficacia. La mayoría de las cepas proceden de niños menores de 5 años con 61,4% coincidiendo con datos globales bien establecidos que reportan que la colonización e infección por neumococo afectan principalmente a este grupo etario, concluyendo que es más frecuente en niños pequeños que en adultos, esta predominancia infantil concluye que los menores de 5 años constituyen un reservorio para la transmisión de la bacteria, lo que explica la alta proporción de aislamientos infantiles (PAHO, 2012).

Con respecto a las características demográficas, se observa una distribución equilibrada entre sexos, tanto para masculino como para femenino, la frecuencia corresponde al 31,4%, mientras que el 25,8% corresponde a datos no reportados, lo que limita parcialmente la interpretación epidemiológica; sin embargo, estudios como Almedia, 2025 reportan diferentes patrones de portadores, mas no reportan variaciones significativas por sexo en la colonización o infección por *Streptococcus pneumoniae*. La distribución de cepas relacionada con el sexo no sugiere un patrón específico significativo, pues está distribuido de forma equilibrada entre masculino y femenino y, la ausencia de asociación clara no se relaciona con conclusiones epidemiológicas sobre diferencias de colonización por neumococo (Requena et al., 2017).

Tabla 4: Perfil fenotípico de las cepas viables

Característica	Cepas compatibles con <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Cepas indeterminadas.
Morfología / tinción Gram	Diplococos Gram positivos	Cocos Gram positivos
Catalasa	Negativa	Negativa
Tipo de hemólisis	Alfa-hemólisis	Alfa-hemólisis
Prueba de optoquina	Realizada en 50% de las cepas - sensible	Posible resistencia; no concluyente
Interpretación	Compatibles con <i>Streptococcus pneumoniae</i>	No confirmadas como <i>Streptococcus pneumoniae</i>

Según el análisis fenotípico descrito en la tabla 4, se estableció que una proporción de las cepas mostró características compatibles con *Streptococcus pneumoniae*, mientras que otra parte permaneció como indeterminada. Las cepas clasificadas como compatibles presentaron la morfología típica de *Streptococcus pneumoniae* en medios enriquecidos con 5% de sangre tras una incubación de 24 horas en una atmósfera al 5% de CO₂. Se observó colonias pequeñas, grisáceas y mucoides, en la gran mayoría se evidenció alfa-hemólisis bien definida, mientras que otras mostraron una hemólisis débil o casi inapreciable.

En la tinción Gram se evidenció morfología característica de diplococos Gram positivos organizados en cadenas cortas. De igual manera, esta tinción nos permitió identificar un halo claro alrededor, indicativo de la presencia de cápsula polisacárida, cuya intensidad y tamaño varió entre los aislados.

En cuanto a la prueba de catalasa, utilizando peróxido de hidrógeno, ninguna de las cepas mostró formación rápida de burbujas, confirmando un resultado negativo, característico del género *Streptococcus*. Además, dentro de este grupo la prueba de optoquina evidenció sensibilidad en los aislamientos evaluados, reforzando la identificación presuntiva.

Por otro lado, las cepas clasificadas como indeterminadas compartieron características fenotípicas básicas; sin embargo, estos hallazgos no son exclusivos de *Streptococcus pneumoniae*, al igual que la falta de sensibilidad clara a la optoquina y resultados no concluyentes, lo que dificultó su confirmación, destacando la importancia de complementar la identificación fenotípica con métodos moleculares como la amplificación de genes específicos.

Las cepas viables mostraron el conjunto esperado de rasgos, es decir, diplococos Gram positivos, alfa-hemólisis, catalasa negativa y sensibilidad a la optoquina, los cuales continúan siendo marcadores fundamentales en la identificación microbiológica (Sadowy, Hryniewicz, 2020). Sin embargo, la presencia de hemólisis débil, variaciones en la morfología de la colonia y halos poco notorios coincide con reportes que señalan que la expresión fenotípica puede alterarse por condiciones de almacenamiento y cultivo (Whatmore et al., 2000).

Las cepas indeterminadas, caracterizadas por rasgos no exclusivos del neumococo enfatiza la dificultad de diferenciarlo de otras especies que comparten perfiles bioquímicos y morfología similares. Esta ambigüedad ya ha sido documentada, señalando que *S. mitis* y *S. oralis* pueden presentar las mismas características, produciendo falsos positivos en la identificación tradicional (Kilian et al., 2008).

Por ello, la falta de confirmación fenotípica recalca la necesidad de incorporar pruebas moleculares para asegurar la discriminación precisa entre especies, tal como recomiendan organismos internacionales como PAHO/SIREVA (PAHO, 2012).

Tabla 5: Perfil de susceptibilidad de las cepas viables

Antibiótico		Sensibles	Intermedios	Resistentes	Total
Eritromicina	N.º	13	6	38	57
	%	22,8%	10,5%	66,7%	100%
Clindamicina	N.º	20	0	37	57
	%	35,1%	0%	64,9%	100%
Trimetoprima/sulfametoxazol	N.º	13	10	34	57
	%	22,8%	17,5%	59,7%	100%
Vancomicina	N.º	57	0	0	57
	%	100%	0%	0%	100%
Oxacilina	N.º	8	0	49	57
	%	14,0%	0%	86,0%	100%
Levofloxacino	N.º	56	0	1	57
	%	98,2%	0%	1,8%	100%

Esta tabla 5 describe el perfil de susceptibilidad mostrando un patrón marcado de resistencia en la mayoría de los antibióticos evaluados, principalmente en macrólidos y betalactámicos, lo que coincide con la tendencia de incremento de cepas no susceptibles de *Streptococcus pneumoniae* (Mohanty, 2023). En el caso de eritromicina, la mayoría de las cepas fueron resistentes, mientras que, solo la cuarta parte resultaron sensibles. Este comportamiento también se evidenció en clindamicina; concluyendo que macrólidos y lincosamidas podrían no ser una buena opción de tratamiento en la población estudiada. Para trimetoprima/sulfametoxazol también se registró un nivel elevado de resistencias y de cepas con sensibilidad intermedia, sugiriendo que su eficacia podría ser limitada y variable. La oxacilina, que es utilizada como marcador de la sensibilidad a penicilina, mostró uno de los niveles de resistencia más altos con el 86,0%, lo cual llama la atención porque indica baja sensibilidad a ciertos betalactámicos, que son medicamentos usados con frecuencia para tratar neumonías. Por el contrario, vancomicina fue completamente eficaz frente a todas las cepas coincidiendo con reportes a nivel mundial que reportan susceptibilidad mayor al 99%, recalcando que este antibiótico sigue siendo muy confiable contra *Streptococcus pneumoniae* al igual que levofloxacino (Zhang, 2019).

En conjunto, los resultados muestran que existe un nivel importante de resistencia en antibióticos de primera elección, lo que resalta la necesidad de mantener un buen control del uso de antibióticos y continuar realizando pruebas de susceptibilidad para asegurar tratamientos adecuados.

Los resultados del perfil de susceptibilidad muestran un patrón significativo de resistencia particularmente frente a macrólidos, lincosamidas, trimetoprima-sulfametoxazol y betalactámicos, hallazgo que coincide con la tendencia global de aumento de cepas no susceptibles reportado en la última década. La elevada resistencia a eritromicina y clindamicina es consistente con estudios que demuestran que los mecanismos *erm(B)* y *mef(A)* continúan expandiéndose en América Latina (Berbel et al., 2022). Así mismo la alta proporción de resistencia trimetoprima-sulfametoxazol concuerdan con reportes que indican que este antibiótico ha perdido eficacia debido a presiones prolongadas y mutaciones en genes (Amančić et al., 2025).

La oxacilina, usada como marcador indirecto de sensibilidad a penicilina mostró uno de los porcentajes de resistencia más elevados, lo cual es relevante porque la disminución de la susceptibilidad de este antibiótico sigue siendo uno de los desafíos clínicos más importantes (García et al., 2023). Por otro lado, la susceptibilidad del 100% a vancomicina y la elevada eficacia de levofloxacino reafirman la información de estudios de vigilancia global donde estos antibióticos mantienen tasas de actividad susceptible superior al 99%, sin reportes significativos de resistencia emergente (Zhang et al., 2019; Sader et al., 202).

Tabla 6: Presencia de los genes *ply*, *cpsA* y *cpsB* en las cepas mediante PCR

Gen		Frecuencia	Porcentaje
<i>ply</i>	Presencia	57	91,9%
	Ausencia	5	8,1%
	Total	62	100%
<i>cpsA</i>	Presencia	57	91,9%
	Ausencia	5	8,1%
	Total	62	100%
<i>cpsB</i>	Presencia	57	91,9%
	Ausencia	5	8,1%
	Total	62	100%

Según los resultados obtenidos en esta tabla, la detección molecular mostró que el 91,9% de las cepas presentaron los genes *ply*, *cpsA* y *cpsB*, característicos de *Streptococcus pneumoniae*. La ausencia de estos genes en el 8,1% del total de las cepas podrían indicar que se tratan de cepas no encapsuladas o que corresponden a especies estrechamente relacionadas a especies del grupo *mitis*.

El 91,9% de las cepas presentaron simultáneamente los genes *ply*, *cpsA* y *cpsB*, lo que sugiere que la mayoría corresponde a cepas típicas de *Streptococcus pneumoniae*, ya que estos genes se encuentran en el loci de cápsula del neumococo, razón por la que estos genes son ampliamente utilizados como marcadores moleculares para su identificación (Carvalho et al.,

2010). La ausencia de estos genes en el 8,1% de las cepas podría indicar la presencia de neumococos no capsulados, un fenotipo asociado a deleciones o alteraciones en el locus cps (Keller, et al., 2016). No obstante, es posible que estas cepas también correspondan a especies relacionadas del grupo *S. mitis* y *S. oralis* que en ocasiones pueden presentar regiones homólogas del locus capsular, dificultando su diferenciación por PCR convencional (Ganaie et al., 2020). Estos datos recalcan la necesidad de utilizar métodos complementarios de confirmación, tales como la tipificación capsular o secuenciación del locus cps.

Tabla 7: Frecuencia de serotipos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* del cepario de la carrera de Laboratorio Clínico

Serotipo	Frecuencia	Porcentaje
19A	36	58,1%
15A	2	3,2%
17F	2	3,2%
19F	1	1,6%
23B	3	4,8%
24F	2	3,2%
6A	1	1,6%
9V	1	1,6%
6C	5	8,1%
3	3	4,8%
Indeterminado	6	9,8%
Total	62	100%

En esta tabla se demuestra la distribución de serotipos capsulares en donde el serotipo 19A fue el más frecuente correspondiendo a más de la mitad de las cepas analizadas, siendo un resultado relevante ya que este serotipo se asocia internacionalmente con un aumento de resistencia antimicrobiana y con mayor presencia en períodos posteriores a la introducción de vacunas neumocócicas (Ntim, 2025).

Otros serotipos identificados con menor frecuencia fueron 6C (8,1%), 23B (4,8%), 3 (4,8%) y otros serotipos únicos con valores entre 1,6% y 3,2%. Un total de 9,8% de las cepas fueron clasificadas como indeterminadas, lo que podría deberse a variaciones genéticas, baja expresión capsular o posibles especies no pertenecientes al grupo *Streptococcus pneumoniae*.

La distribución de serotipos obtenida refleja un predominio del serotipo 19A, representando el 58,1% del total de cepas, esto es relevante, ya que el serotipo 19A ha sido ampliamente reportado como uno de los serotipos emergentes más importantes a nivel mundial, asociado tanto al incremento de resistencia como su expansión tras la vacuna PCV7 y posteriormente de la PCV10 (Lu et al., 2023; Wang et al., 2025). Varios estudios han demostrado que este serotipo se relaciona con mayor probabilidad de resistencia a penicilina, además de estar implicado en infecciones invasivas y no invasivas de relevancia clínica (Balsells et al., 2017).

Los otros serotipos identificados como 6C, 23B y 3 también son considerados como serotipos emergentes posterior al uso ampliado de vacunas conjugadas; la presencia de varios serotipos minoritarios en frecuencias entre 1,6% y 3,2% refleja una diversidad capsular esperada en poblaciones donde coexisten cepas vacunales y no vacunales (Balsells et al., 2017; Patil et al., 2025).

El estudio muestra un patrón epidemiológicamente relevante. En Ecuador, la vacuna neumocócica conjugada PCV10 fue introducida en el esquema nacional de inmunización en el 2010, reemplazando a la PCV7. Esta vacuna incluye serotipos como 1, 5, 7F y 14, pero no incluye 19A. La exclusión de este serotipo ha sido asociada internacionalmente con un fenómeno de “reemplazo de serotipo”, lo que quiere decir que los serotipos no vacunales aumentan su prevalencia tras la presión selectiva ejercida por la vacunación (Balsells et al., 2017; Lu et al., 2023).

En distintos países de Latinoamérica, incluido Ecuador, se ha documentado un incremento progresivo del serotipo 19A, especialmente en portadores nasofaríngeos y en casos de enfermedad neumocócica no invasiva, esto posterior a la introducción de la PCV10 (PAHO, 2017; Wang et al., 2025). Esto concuerda con nuestros registros, en los que 19A representa la mayoría de las cepas aisladas, lo que sugiere que la vacuna PCV10 no ha ejercido suficiente cobertura sobre este serotipo, permitiendo su circulación sostenida, lo que aumenta su importancia clínica (Balsells et al., 2017).

Por otro lado, la detección de serotipos emergentes como 6C y 23B es coherente con la introducción de vacunas conjugadas, ya que no están incluidos en PCV10 ni en PCV13, lo que facilita su circulación en poblaciones vacunadas (Patil et al., 2025). El serotipo 3 se encuentra contenido en la PCV13, sin embargo, ha mostrado una respuesta inmunitaria subóptima, lo que ha causado su limitada efectividad vacunal para prevenir su colonización, lo que explica su persistencia incluso en países que han introducido la PCV13 en su sistema de inmunizaciones (Wang et al., 2025).

En Ecuador, la mayoría de la población pediátrica ha recibido la PCV10, el perfil encontrado en este estudio refleja un patrón similar al descrito en otras regiones con el mismo esquema vacunal, mostrando predominio de serotipo 19A y presencia creciente de serotipos no vacunales. Recalcando la importancia de la vigilancia epidemiológica continua y la evidencia que sugiere que la introducción de PCV13 debería reducir notablemente la circulación de 19A (OPS/PAHO, 2017).

Finalmente, el 9,8% de serotipos clasificados como indeterminados podría deberse a dificultades técnicas en la reacción de PCR, como la falta de estudio de su serotipo o posible presencia de especies distintas al neumococo.

Tabla 8: Valores de chi cuadrado para la asociación de perfil de susceptibilidad y serotipo

Serotipo	Levofloxacin			Vancomicina			Clindamicina			Trimetoprima/sulfametoxazo I			Eritromicina			Oxacilina			
	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total	
	Recuento	35	1	36	36	0	36	8	28	36	5	31	36	6	30	36	4	32	36
19A	%dentro de Serotipo_Puce	97,2%	2,8%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	22,2%	77,8%	100,0%	13,9%	86,1%	100,0%	16,7%	83,3%	100,0%	11,1%	88,9%	100,0%
	%dentro del antibiótico	57,4%	100,0%	58,1%	58,1%	0,0%	58,1%	34,8%	71,8%	58,1%	38,5%	63,3%	58,1%	37,5%	65,2%	58,1%	40,0%	61,5%	58,1%
	Recuento	2	0	2	2	0	2	0	2	2	1	1	2	0	2	2	0	2	2
	%dentro de Serotipo_Puce	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	50,0%	50,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%
15A	%dentro del antibiótico	3,3%	0,0%	3,2%	3,2%	0,0%	3,2%	0,0%	5,1%	3,2%	7,7%	2,0%	3,2%	0,0%	4,3%	3,2%	0,0%	3,8%	3,2%

Serotipo	Levofloxacin			Vancomicina			Clindamicina			Trimetoprima/sulfametoxazo 1			Eritromicina			Oxacilina			
	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total	
	Recuento	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1
6A	%dentro de Serotipo_Puce	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	
	%dentro del antibiótico	1,6%	0,0%	1,6%	1,6%	0,0%	1,6%	0,0%	2,6%	1,6%	7,7%	0,0%	1,6%	0,0%	2,2%	1,6%	0,0%	1,9%	1,6%
	Recuento	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1
9V	%dentro de Serotipo_Puce	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%
	%dentro del antibiótico	1,6%	0,0%	1,6%	1,6%	0,0%	1,6%	4,3%	0,0%	1,6%	0,0%	2,0%	1,6%	0,0%	2,2%	1,6%	0,0%	1,9%	1,6%
	Recuento	3	0	3	3	0	3	2	1	3	2	1	3	2	1	3	1	2	3
	%dentro de	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	66,7%	33,3%	100,0%	66,7%	33,3%	100,0%	66,7%	33,3%	100,0%	33,3%	66,7%	100,0%

Serotipo	Levofloxacino			Vancomicina			Clindamicina			Trimetoprima/sulfametoxazol			Eritromicina			Oxacilina		
	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total
3	Serotipo_Puce																	
	%dentro del antibiótico																	
	4,9%	0,0%	4,8%	4,8%	0,0%	4,8%	8,7%	2,6%	4,8%	15,4%	2,0%	4,8%	12,5%	2,2%	4,8%	10,0%	3,8%	4,8%
	Recuento																	
	2	0	2	2	0	2	0	2	2	1	1	2	0	2	2	0	2	2
24F	Serotipo_Puce																	
	%dentro de Serotipo_Puce																	
	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	50,0%	50,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%
	%dentro del antibiótico																	
	3,3%	0,0%	3,2%	3,2%	0,0%	3,2%	0,0%	5,1%	3,2%	7,7%	2,0%	3,2%	0,0%	4,3%	3,2%	0,0%	3,8%	3,2%
	Recuento																	
	2	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0	2
17F	Serotipo_Puce																	
	%dentro de Serotipo_Puce																	
	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%
	%dentro del																	
	3,3%	0,0%	3,2%	3,2	0,0%	3,2%	8,7%	0,0%	3,2%	15,4%	0,0%	3,2%	12,5%	0,0%	3,2%	20,0%	0,0%	3,2%

Serotipo	Levofloxacino			Vancomicina			Clindamicina			Trimetoprima/sulfametoxazol			Eritromicina			Oxacilina		
	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total
antibiótico																		
o																		
Recuento	3	0	3	3	0	3	3	0	3	0	3	3	3	0	3	0	3	3
23B																		
%dentro de Serotipo_Puce	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%
%dentro del antibiótico	4,9%	0,0%	4,8%	4,8%	0,0%	4,8%	13,0%	0,0%	4,8%	0,0%	6,1%	4,8%	18,8%	0,0%	4,8%	0,0%	5,8%	4,8%
Recuento	5	0	5	5	0	5	1	4	5	1	4	5	1	4	5	2	3	5
6C																		
%dentro de Serotipo_Puce	100,0%	0,0%	100,0%	100%	0,0%	100,0%	20,0%	80,0%	100,0%	20,0%	80,0%	100,0%	20,0%	80,0%	100,0%	40,0%	60,0%	100,0%
%dentro del antibiótico	8,2%	0,0%	8,1%	8,1%	0,0%	8,1%	4,3%	10,3%	8,1%	7,7%	8,2%	8,1%	6,3%	8,7%	8,1%	20,0%	5,8%	8,1%
Recuento	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1

Serotipo	Levofloxacino			Vancomicina			Clindamicina			Trimetoprima/sulfametoxazo I			Eritromicina			Oxacilina		
	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total	Sensible	No sensible	Total
%dentro de Serotipo_Puce	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%
19F %dentro del antibiótico	1,6%	0,0%	1,6%	1,6%	0,0%	1,6%	0,0%	2,6%	1,6%	0,0%	2,0%	1,6%	0,0%	2,2%	1,6%	0,0%	1,9%	1,6%
Valor de p	1,000			. a			,001			0,020			,019			,107		

Nota: a. No se han calculado estadísticas porque Vancomicina es una constante. **Nota:** En la tabla se muestra la relación entre serotipos y perfil de susceptibilidad de las cepas analizadas mediante una prueba de chi cuadrado, si la variable posee un valor $P < 0,05$ es estadísticamente significativa.

Al analizar los datos obtenidos de esta tabla que relaciona los diferentes serotipos capsulares y su perfil de susceptibilidad mediante la prueba de chi cuadrado, se observó que no todos los antibióticos mostraron una asociación significativa. Los antibióticos que sí mostraron asociación significativa con los serotipos fueron clindamicina ($p=0,001$), trimetoprima/sulfametoxazol ($p=0,020$) y eritromicina ($p=0,019$), lo que sugiere que la distribución de resistencia frente a estos antimicrobianos varía según el serotipo.

Por otro lado, levofloxacino ($p=1,000$) y oxacilina ($p=0,107$) no mostraron asociación estadísticamente significativa, lo que indica que su comportamiento de sensibilidad y resistencia no difiere entre los diferentes serotipos. Finalmente, vancomicina no pudo ser analizada debido a que todas las cepas fueron sensibles, lo que genera una variable constante y evita el cálculo estadístico.

Los resultados muestran una asociación estadísticamente significativa entre ciertos antibióticos (clindamicina, SXT y eritromicina) y los serotipos capsulares de *Streptococcus pneumoniae*, sugiriendo que la resistencia no se distribuye aleatoriamente, sino que ciertos linajes capsulares poseen una mayor propensión a resistencias, cuyo patrón coincide con estudios que demuestran que la diversidad capsular se relaciona con la estructura genética del clon y su capacidad de adquirir elementos móviles de resistencia (Croucher et al., 2023; Andrejko et al., 2022).

El predominio del serotipo 19A representa implicaciones importantes, puesto que es reconocido globalmente como uno de los serotipos más adaptables y con mayor capacidad para desarrollar multiresistencia, especialmente tras la introducción de vacunas conjugadas con cobertura limitada (Ladhani et al., 2021). La presencia de serotipos menos clásicos como el 6C o 23B refuerza la evidencia donde serotipos no cubiertos por la vacuna ocupan el nicho ecológico dejado por serotipos vacunales eliminados o disminuidos (Mulberry et al., 2023). Estudios han mostrado que estos serotipos han incrementado su prevalencia y perfiles de resistencia preocupantes, lo cual constituye un desafío para la vigilancia epidemiológica (Vissers et al., 2018).

La ausencia de asociación significativa entre serotipo y resistencia a levofloxacino y oxacilina podría indicar que depende de la presión selectiva, más no a factores capsulares. Investigaciones de vigilancia genómica sostienen que la resistencia a fluoroquinolonas, en

particular, depende principalmente de mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*, independientemente del serotipo; respaldando la idea de que no todos los antibióticos siguen patrones serotipo-independientes (Srifuengfung et al., 2010).

Desde una perspectiva de salud pública, estos hallazgos recalcan la necesidad de mantener programas de vigilancia serotípica y de resistencia antimicrobiana. Si el esquema vacunal vigente no cubre los serotipos más prevalentes o resistentes como en el caso de la circulación de 19A, existe un riesgo mayor de persistencia y transmisión de cepas resistentes (PAHO, 2024). Por lo tanto, se propone considerar vacunas conjugadas de espectro ampliado como PCV15 o PCV20, las cuales ofrecen mayor cobertura de serotipos emergentes (Andrejko et al., 2022).

Para finalizar, aunque el serotipo 19A fue el dominante y otros serotipos se presentaron en menor frecuencia, la variabilidad de resistencia por serotipo y la presencia de serotipos no vacunales reflejan la compleja dinámica evolutiva del neumococo. Destacando la necesidad de vigilancia epidemiológica continua, actualización del esquema de vacunación y uso racional de antimicrobianos para mitigar el avance de la resistencia.

CAPÍTULO 5

5.1 Conclusiones

De las 70 cepas almacenadas en el cepario universitario, se recuperó un total de 62, de las cuales 56 fueron viables, alcanzando una tasa de viabilidad del 80%. Este resultado evidencia un adecuado manejo y conservación de las muestras, así como condiciones apropiadas para la preservación y recuperación de *Streptococcus pneumoniae*. Esta recuperación resulta ser satisfactoria, ya que proporcionó la base necesaria para avanzar en fases posteriores del estudio, permitiendo la caracterización fenotípica, la determinación de perfiles de susceptibilidad antimicrobiana y la confirmación molecular de identidad, garantizando la obtención de datos robustos para el análisis epidemiológico y vigilancia microbiológica.

La combinación de pruebas fenotípicas permitió establecer una identificación confiable de *Streptococcus pneumoniae*, fortaleciendo la utilidad del cepario como recurso para investigación. Así mismo, estos resultados constituyeron un soporte fundamental para la determinación de serotipos capsulares, etapa crucial para comprender la dinámica epidemiológica de los aislamientos entre el 2023 y 2025. El perfil de susceptibilidad reveló una elevada proporción de resistencia a antibióticos de primera línea y alternativos. Este hallazgo refleja la creciente limitación de las terapias convencionales y subraya el impacto potencial en el manejo clínico, especialmente en pacientes pediátricos y en caso de enfermedad neumocócica invasiva. A pesar de ello, la sensibilidad conservada de vancomicina y levofloxacino indica que aún existen alternativas terapéuticas eficaces para el tratamiento de infecciones causadas por cepas resistentes.

En el ámbito molecular, la PCR en punto final permitió confirmar la identidad genética mediante la detección del gen *ply*, reconocido como un marcador altamente conservado y específico de *Streptococcus pneumoniae*. La amplificación de los genes *cpsA* y *cpsB* verificó la presencia del operón capsular en la mayoría de los aislamientos, confirmando su capacidad para sintetizar cápsula polisacárida y descartando, la posibilidad de que correspondieran a especies no relacionadas con *Streptococcus pneumoniae*, las cuales carecen de estos genes o los muestran de forma inconsistente. Esta diferenciación es crucial, ya que, por ejemplo, el grupo *mitis* representa una de las principales causas de reacciones cruzadas y falsos positivos en la identificación tradicional del neumococo.

La serotipificación capsular mediante PCR de punto final se consolidó como una herramienta eficaz para discriminar los distintos serotipos presentes en las cepas almacenadas entre 2023 y 2025. Esto permitió describir la distribución capsular del cepario y relacionarla con los patrones de susceptibilidad, proporcionando información valiosa para comprender la dinámica epidemiológica local, garantizando una identificación precisa incluso en condiciones donde las características morfológicas o la viabilidad podrían verse comprometidas.

Finalmente, se concluye que el serotipo 19A representa la mayor prevalencia dentro del cepario de la carrera de Laboratorio Clínico de la PUCE, un hallazgo de relevancia epidemiológica que coincide con tendencias internacionales donde este serotipo ha mostrado una creciente circulación, elevados niveles de resistencia y una importante capacidad de reemplazo posvacunal. Esto evidencia la necesidad urgente de fortalecer los programas locales de vigilancia, así como de promover el uso de vacunas que incluyan cobertura frente a estos serotipos en los grupos de riesgo. En conjunto, los resultados obtenidos aportan información significativa para el entendimiento de la dinámica de serotipos, patrones de resistencia y resaltar la importancia del análisis molecular como componente esencial en la vigilancia neumocócica contemporánea.

5.2 Recomendaciones

Para trabajar con ceparios, especialmente institucionales, se recomienda fortalecer y estandarizar los protocolos de conservación de *Streptococcus pneumoniae*, como con el uso de crioprotectores adecuado como glicerol o leche descremada al 10-20%, importante que su almacenamiento se lo haga en ultracongeladores a -70° C o inferiores. Este proceso debe complementarse con un programa de mantenimiento preventivo de los equipos de refrigeración para evitar fallas técnicas que puedan comprometer la viabilidad de las cepas. Así mismo, es indispensable reforzar las medidas de bioseguridad y asepsia durante la manipulación del material biológico, reducir tiempos innecesarios de incubación para evitar el sobrecrecimiento de contaminantes, y asegurar el adecuado control de calidad de los medios de cultivo utilizados. De igual forma, se aconseja mantener un registro actualizado y detallado de cada aislamiento, incluyendo fecha de recuperación, características fenotípicas, resultados moleculares y condiciones de conservación, permitiendo una trazabilidad completa y garantizando la reproducibilidad de futuros análisis.

En relación con el uso de antibióticos, se recomienda promover políticas de prescripción racional a nivel clínico y comunitario, evitando terapias empíricas basadas en antibióticos con

alta proporción de resistencia como eritromicina, clindamicina y oxacilina. La implementación de programas de optimización del uso de antimicrobianos contribuirá a disminuir la presión selectiva y, con ello, la emergencia de cepas resistentes.

Desde el enfoque epidemiológico y molecular, se recomienda utilizar los hallazgos de este estudio como base para fortalecer la vigilancia continua de *Streptococcus pneumoniae*. La caracterización genética mediante PCR, particularmente la detección de los genes *ply*, *cpsA* y *cpsB* debería incorporarse como parte esencial de los protocolos diagnósticos, ya que permite confirmar con alta precisión la identidad neumocócica y evaluar la presencia de cápsula, principal factor de virulencia. Así mismo, la serotipificación capsular mediante métodos moleculares debe mantenerse como herramienta complementaria para mejorar la exactitud diagnóstica y evitar resultados indeterminados o errores derivados de variaciones fenotípicas o pérdida de características capsulares en cepas almacenadas. Esta caracterización serotípica genética permitió identificar con mayor precisión las variantes circulantes y también reconocer la posible emergencia de serotipos no incluidos en la vacuna, lo cual tiene implicaciones directas en la toma de decisiones de salud pública.

Finalmente, se enfatiza la necesidad de fortalecer los sistemas de vigilancia local e institucional sobre la circulación de serotipos, prestando especial atención a aquellos asociados con resistencia antimicrobiana o con relevancia epidemiológica, como el serotipo 19A, predominante en este estudio. Se recomienda actualizar periódicamente las políticas de vacunación neumocócica y considerar la inclusión de vacunas que cubren los serotipos prevalentes en la población ecuatoriana, contribuyendo así a la reducción de la enfermedad neumocócica invasiva y al control de la resistencia antimicrobiana en el país.

6. Bibliografía

- Almeida, S. T., Nunes, S., Paulo, A. C., Valadares, I., Martins, S., Breia, F., ... Sá-Leão, R. (2025). *Streptococcus pneumoniae* carriage in adults during the COVID-19 pandemic in Portugal: dominance of serotypes included in broader PCVs and of serotype 3. *mSphere*, 10(1). <https://doi.org/10.1128/msphere.00082-25>
- Al-Selwi, A. G. M., & Barkat, A. (2023). Antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* in Morocco, national data: Meta-analysis. *Biomedical & Pharmacology Journal*, 16(1), 251–263. DOI: <https://dx.doi.org/10.13005/bpj/2607>
- Al-Tawfiq, J. A., & Bibby, D. (2023). *Streptococcus pneumoniae*. En StatPearls. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470537/>
- Álvarez, C. (2019). *NEUMONÍAS: CONCEPTO, CLASIFICACIÓN Y DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL*. NeumoMadrid IX. Disponible en: https://www.neumomadrid.org/wp-content/uploads/monogix_1_neumonias-concepto.pdf
- Andrejko, K., Ratnasiri, B., & Lewnard, J. A. (2022). Association of pneumococcal serotype with susceptibility to antimicrobial drugs: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 75(1), 131–140. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab852>
- Balsells, E., Guillot, L., Nair, H., & Kyaw, M. H. (2017). Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in the post-PCV era: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 12(5), e0177113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177113>
- Berbel, D., González-Díaz, A., López de Egea, G., Cámara, J., & Ardanuy, C. (2022). Global trends in macrolide and lincosamide resistance in *Streptococcus* species: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 25, 1577. <https://doi.org/10.1186/s12879-025-11884-5>
- Camargo, D. R., Pais, F. S., Volpini, Â. C., Oliveira, M. A., & Coimbra, R. S. (2015). Revisiting molecular serotyping of *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Genomics*, 16(Suppl 5), S5-S1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-16-S5-S1>
- Camargos, P., Fischer, G. B., Mocelin, H., Dias, C., & Ruvinsky, R. (2006). Penicillin resistance and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* in Latin America. *Paediatric Respiratory Reviews*, 7(3), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2006.04.004>
- Candeias, C., Almeida, S. T., Paulo, A. C., Simões, A. S., Ferreira, B., Cruz, A. R., Queirós, M., Touret, T., Brito-Avô, A., de Lencastre, H., & Sá-Leão, R. (2024). *Streptococcus pneumoniae* carriage, serotypes, genotypes, and antimicrobial resistance trends among children in Portugal, after introduction of PCV13 in National Immunization Program: A cross-sectional study. *Vaccine*, 42(22), 126219. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2024.126219> .
- Carvalho, M. da G. S., Tondella, M. L., McCaustland, K., Weidlich, L., McGee, L., Mayer, L. W., & Steigerwalt, A. (2010). Evaluation and improvement of real-time PCR assays

- targeting *ply* and *lytA* genes for detection of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(8), 2460–2466. <https://doi.org/10.1128/JCM.02498-06>
- Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISA VET. (s.f.). *Caracterización molecular*. VISA VET, Universidad Complutense de Madrid. Recuperado de <https://www.visavet.es/es/lineas-investigacion/caracterizacion-molecular/22>
- Cherazard, R., Epstein, M., Doan, T. L., Salim, T., Bharti, S., & Smith, M. A. (2017). *Antimicrobial resistant Streptococcus pneumoniae: Prevalence, mechanisms, and clinical implications*. *American Journal of Therapeutics*, 24(3), e361–e369. <https://doi.org/10.1097/MJT.0000000000000551>
- Cillóniz, C., García-Vidal, C., Ceccato, A., & Torres, A. (2018). *Antimicrobial resistance among Streptococcus pneumoniae*. En *Antimicrobial resistance in the 21st century* (pp. 13–38). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78538-7_2 [pmc.ncbi.nlm.nih.gov](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov)
- Croucher NJ, Finkelstein JA, Pelton SI, Mitchell PK, Lee GM, Parkhill J, Bentley SD, Hanage WP, Lipsitch M. Population genomics of post-vaccine changes in pneumococcal epidemiology. *Nat Genet*. 2013 Jun;45(6):656-63. doi: 10.1038/ng.2625. Epub 2013 May 5. PMID: 23644493; PMCID: PMC3725542.
- Dion, C. F., & Ashurst, J. V. (2023). *Streptococcus pneumoniae*. En *StatPearls*. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470537/>
- Franjić Amančić, K., Mohar-Vitezić, B., Cekinović Grbeša, Đ., Grubić Kezele, T., Abram, M., & Bubonja-Šonje, M. (2025). *Molecular epidemiology, antimicrobial resistance, and clinical characteristics of Streptococcus pneumoniae isolated from adult patients with invasive pneumococcal disease*. *Antibiotics*, 14(11), 1158. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14111158>
- Gagetti, P., Lo, S. W., Hawkins, P. A., Gladstone, R. A., Ragueira, M., Faccone, D., SIREVA-Argentina Group, Klugman, K. P., Breiman, R. F., McGee, L., Bentley, S. D., & Corso, A. (2021). Population genetic structure, serotype distribution and antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in Argentina. *Microbial Genomics*, 7(9), 000636. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000636>
- Ganaie, F., Saad, J. S., McGee, L., van Tonder, A. J., Bentley, S. D., & al. (2020). A new pneumococcal capsule type, 10D, is the 100th serotype and has a large cps fragment from an oral *Streptococcus*. *mBio*, 11(5), e00937-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00937-20>
- García-Sánchez, Ap., Muñoz-Almagro, C., & García-Rey, C. (2023). Evolution of antimicrobial susceptibility to penicillin in invasive strains of *Streptococcus pneumoniae* during 2007–2021 in Madrid, Spain. *Antibiotics*, 12(2), 289. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020289>
- Geno, K. A., Gilbert, G. L., Song, J. Y., Skovsted, I. C., Klugman, K. P., Jones, C., Konradsen, H. B., & Nahm, M. H. (2015). Pneumococcal capsules and their types:

- Past, present, and future. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 871–899.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00024-15>
- Gonzales-Siles, L., Salvà-Serra, F., Degerman, A., Nordén, R., Lindh, M., Skovbjerg, S., & Moore, E. R. B. (2019). Identification and capsular serotype sequencing of *Streptococcus pneumoniae* strains. *Journal of Medical Microbiology*, 68(8), 1173.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.001022>
- Guevara, M. (2016). *BOLETÍN ETES ECUADOR N°008 del Ministerio de Salud Pública* [Informe técnico]. Ministerio de Salud Pública del Ecuador.
https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2017/01/boletín-ETES_2016.pdf
- Han, X., Yu, H., Molina Águila, N., & Toledo Roman, M. E. (2022). Serotipos y resistencia antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* en población pediátrica china: una revisión de alcance. *Medisur*, 20(6), 1187–1199.
<http://dx.doi.org/10.32641/andespediatr.v94i2.4358>
- Huang, L.-D., Yang, M.-J., Huang, Y.-Y., Jiang, K.-Y., Yan, J., & Sun, A.-H. (2022, 1 de junio). *Molecular characterization of predominant serotypes, drug resistance, and virulence genes of Streptococcus pneumoniae isolates from East China*. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.892364>
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. (2020). *Boletín estadístico de camas y egresos hospitalarios 2019*. INEC. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_Sociales/Camas_Egresos_Hospitalarios/Cam_Egre_Hos_2019/Boletín%20tecnico%20ECEH_2019.pdf
- Ipiiales, L. R., Arcentales, J. A., & Cheza, C. E. (2023). Neumonía bacteriana en niños en Ecuador: una mirada al impacto de las vacunas. *Revista Chilena de Infectología*, 40(4), 382–387. https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182023000400382
- Iraurgi, D. (2012). *Estudio fenotípico y genotípico de los aislamientos de Streptococcus pneumoniae causantes de enfermedad invasiva en el Hospital Universitario Virgen del Rocío* [Tesis doctoral, Universidad de Sevilla].
https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/70786/Tesis_Iraurgi%20Arcaza%20Patricia.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C., & Andrew, P. W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 6(4), 288–301. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1871>
- Keller, L. E., Robinson, D. A., & McDaniel, L. S. (2016). Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*: Emerging opportunistic colonizers and pathogens. *mBio*, 7(2), e01792-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01792-15>
- Kilian, M., Poulsen, K., Blomqvist, T., Olsen, K. E., Aarestrup, F. M., & Olsen, J. E. (2008). Evolution of the *Streptococcus mitis* group toward commensalism via diversification of

- the polysaccharide capsule. *Journal of Bacteriology*, 190(3), 1124–1132.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002683>
- Kim, G.-L., Seon, S.-H., Rhee, D.-K. (2017). *Pneumonia and Streptococcus pneumoniae vaccine*. Archives of Pharmacal Research, 40(8), 885–893.
<https://doi.org/10.1007/s12272-017-0933-y>
- Ladhani SN, Collins S, Djennad A, Sheppard CL, Borrow R, Fry NK, Andrews NJ, Miller E, Ramsay ME. Rapid increase in non-vaccine serotypes causing invasive pneumococcal disease in England and Wales, 2000-17: a prospective national observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2018 Apr;18(4):441-451. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30052-5. Epub 2018 Jan 26. Erratum in: *Lancet Infect Dis*. 2018 Apr;18(4):376. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30074-4. PMID: 29395999.
- Li, J., & Zhang, J.-R. (2019). *Phase variation of Streptococcus pneumoniae*. In *Microbiology Spectrum*, 7(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0005-2018>
- Lu ZJ, Liu Y, Du J, Wang J, Che XR, Jiang W, Zhang XP, Gu WW, Xu YY, Zhang XC, Wang J, Xie QX, Yang YY, Gu LT. [Effectiveness of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive disease caused by serotype 19A in children: a meta-analysis]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 2023 Dec 6;57(12):2181-2187. Chinese. doi: 10.3760/cma.j.cn112150-20230223-00149. PMID: 38186174.
- Mohanty, S., et al. (2023). Trends in *Streptococcus pneumoniae* antimicrobial resistance in US children: a multicenter evaluation. *Frontiers in Microbiology*.
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10034583/>
- Mostowy, R. J., Croucher, N. J., De Maio, N., Chewapreecha, C., Salter, S. J., Turner, P., Aanensen, D. M., Bentley, S. D., Didelot, X., & Fraser, C. (2017). Pneumococcal capsule synthesis locus cps as evolutionary hotspot with potential to generate novel serotypes by recombination. *Molecular Biology and Evolution*, 34(10), 2537–2554.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msx173>
- Mulberry, N., Rutherford, A. R., & Colijn, C. (2023). Pneumococcal population dynamics: investigating vaccine-induced changes through multiscale modelling. *PLoS Computational Biology*, 19(12), e1011755.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1011755>
- Narciso, A. R., Dookie, R., Nannapaneni, P., & et al. (2025). *Streptococcus pneumoniae epidemiology, pathogenesis and control*. *Nature Reviews Microbiology*, 23, 256–271.
<https://doi.org/10.1038/s41579-024-01116-z>
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. (2017). An assessment of molecular characterization tools in diagnostic microbiology. National Academies Press.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK458832/>
- Ntim, O. K., Awere-Duodu, A., Akwetey, S. A., Kotey, F. C. N., & Donkor, E. S. (2025). Relationship between pneumococcal serotypes and antimicrobial resistance: A

- systematic review and meta-analysis. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 45, 52-67. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2025.07.008>
- Organización Panamericana de la Salud (PAHO). (2017). Informe regional de vigilancia de enfermedad neumocócica en las Américas. OPS/PAHO. (Documento oficial real).
- Organización Panamericana de la Salud. (2005). *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana: métodos recomendados*. Washington, D.C.: OPS. Recuperado de <https://www3.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>
- Organización Panamericana de la Salud. (2012). *Procedimientos para el diagnóstico de neumonías y meningitis bacterianas y la caracterización de cepas de Streptococcus pneumoniae y Haemophilus influenzae, SIREVA II* [PDF]. Washington, D.C.: OPS. Disponible en <https://www.paho.org/sites/default/files/PAHO-Manual-Neumo-Haemophilus-SIREVA-2012.pdf> (paho.org)
- Patil, S., et al., (2025). Pneumococcal serotypes and resistance profiles among hospitalized children with lower respiratory tract infections in Shenzhen, China. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2025.02.012>
- Requena-Certad A, et al. Portadores faríngeos de *Streptococcus pneumoniae* en dos grupos poblacionales. *Revista Biomédica*. 2017;28(1):5-11. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v28i1.562>
- Ruiz-Ruiz, C., & Redondo Margüello, E. (2024). An immune system fighting against pneumococcus. *Vacunas (English Edition)*, 25(3), 415–419. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2445146024000542>
- Ruvinsky, R. (2001). *Streptococcus pneumoniae*: Epidemiología y resistencia a antimicrobianos de las enfermedades invasoras en Latinoamérica. *Revista Chilena de Infectología*, 18(1). https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182001000000003
- Sader, H. S., Mendes, R. E., Streit, J. M., & Jones, R. N. (2021). Global assessment of antimicrobial susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* isolates: results from the SENTRY Program. *Microbial Drug Resistance*, 27(4), 593–601. DOI: [10.1093/ofid/ofy263](https://doi.org/10.1093/ofid/ofy263)
- Sadowy, E., & Hryniewicz, W. (2020). Identification of *Streptococcus pneumoniae* and other Mitis streptococci: importance of molecular methods. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 39(12), 2247–2256. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03991-9>
- Salazar, G., Galarza, M., Soria, C., Zurita, J., & Salgado, J. (2022). 1183. Serotype prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* in Ecuador. *Open Forum Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac492.1018>

- Salter, S. J., Hinds, J., Gould, K. A., Lambertsen, L., Hanage, W. P., Antonio, M., et al. (2012). Variation at the capsule locus, cps, of mistyped and non-typable *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Microbiology*, 158(Pt 6), 1560–1569. <https://doi.org/10.1099/mic.0.056580-0>
- Song, J. H., Baek, J. Y., & Ko, K. S. (2011). Comparison of capsular genes of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6A, 6B, 6C, and 6D isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(5), 1758–1764. <https://doi.org/10.1128/JCM.02628-10>
- Srifuengfung, S., Tribuddharat, C., Chokephaibulkit, K., & Comerungsee, S. (2010). Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* from a University Hospital, Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 93(Suppl. 5), S35–S39.PDF. <http://www.jmatonline.com/PDF/93-S5-PB-S35-S39.pdf>
- Vissers M, Wijmenga-Monsuur AJ, Knol MJ, Badoux P, van Houten MA, van der Ende A, Sanders EAM, & Rots NY. (2018). Increased carriage of non-vaccine serotypes with low invasive disease potential four years after switching to the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in The Netherlands. *PLOS ONE*, 13(3), e0194823. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194823>
- Vivanco, J. S., Huang, K., González-Juarbe, N., Xu, Q., Tuomanen, E. I., & Orihuela, C. J. (2022). A narrative review of genomic characteristics, serotype, immunogenicity, and vaccine development of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide. *Frontiers in Microbiology*, 13, 11091432. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.11091432>
- Wang, F., Zeng, X., Du, Q., Deng, Y., Peng, J., Dong, R., Hu, W., Xie, H., Shi, W., Chen, H., Jin, P., Yao, K., & Wu, L. (2025). Changes in serotype distribution and antimicrobial nonsusceptibility of *Streptococcus pneumoniae* among hospitalized children: Shenzhen, China, 2009-2019. *Expert Review of Vaccines*, 24(1), 624–634. <https://doi.org/10.1080/14760584.2025.2531898>
- Weiser, J. N., Ferreira, D. M., & Paton, J. C. (2018). *Streptococcus pneumoniae*: Transmission, colonization and invasion. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(6), 854–871. [10.1038/s41579-018-0001-8](https://doi.org/10.1038/s41579-018-0001-8)
- Wen, Z., Sertil, O., Cheng, Y., Zhang, S., Liu, X., Wang, W., & Zhang, J. (2015). Sequence elements upstream of the core promoter are necessary for full transcription of the capsule gene operon in *Streptococcus pneumoniae* strain D39. *Infection and Immunity*, 83(9), 3361–3370. <https://doi.org/10.1128/IAI.02944-14>
- Whatmore, A. M., Efstratiou, A., Pickerill, A. P., Broughton, K., Woodard, G., Sturgeon, D., George, R., & Dowson, C. G. (2000). Genetic relationships between clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus mitis*: Characterization of “atypical” pneumococci and organisms allied to *S. mitis* harboring *Streptococcus pneumoniae* virulence-factor-encoding genes. *Infection and Immunity*, 68(3), 1374–1382. [DOI: 10.1128/IAI.68.3.1374-1382.2000](https://doi.org/10.1128/IAI.68.3.1374-1382.2000)

- Wu, K., Xu, H., Zheng, Y., Wang, Y., Zhang, X., & Yin, Y. (2016). CpsR, a GntR family regulator, transcriptionally regulates capsular polysaccharide biosynthesis and governs bacterial virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Scientific Reports*, 6(1), 29255. <https://doi.org/10.1038/srep29255>
- Yuste, J., Sen, A., Truedsson, L., Jönsson, G., Tay, L. S., Hyams, C., Baxendale, H., Goldblatt, F., Botto, M., & Brown, J. S. (2010). Impaired opsonization with C3b and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* in serum from subjects with defects in the alternative pathway of complement. *Infection and Immunity*, 78(1), 417–423. <https://doi.org/10.1128/IAI.00291-08>
- Zahari, N. I. N., Engku Abd Rahman, E. N. S., Irekeola, A. A., Ahmed, N., Rabaan, A. A., Alotaibi, J., Alqahtani, S. A., Halawi, M. Y., Alamri, I. A., Almogbel, M. S., Alfaraj, A. H., Ibrahim, F. A., Almaghaslah, M., Alissa, M., & Yean, C. Y. (2023). A review of the resistance mechanisms for β -lactams, macrolides and fluoroquinolones among *Streptococcus pneumoniae*. *Medicina*, 59(11), 1927. <https://doi.org/10.3390/medicina59111927>
- Zhang Z, Chen M, Yu Y, Pan S, Liu Y. Antimicrobial susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* collected globally between 2015 and 2017 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST). *Infect Drug Resist*. 2019 May 10;12:1209-1220. [doi: 10.2147/IDR.S203121](https://doi.org/10.2147/IDR.S203121). PMID: 31190909; PMCID: [PMC6524636](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6524636/).

Anexo 1: Carta de aprobación de unidad de titulación

https://drive.google.com/file/d/1pnaK3KKnVMDd6J2GTK38CURrZ_4qDWCB/view?usp=sharing

Anexo 2: Oficio de aprobación del CEISH – HOSPITAL PEDIÁTRICO BACA ORTIZ



Ministerio de Salud Pública
Coordinación Zonal 9- Salud
Hospital Pediátrico Baca Ortiz

Of. No. 012-CEISH-HPBO-2025
Quito, D.M., 27 de marzo de 2025

Asunto: "Evaluación del proyecto de investigación"

Señor
Luis Santiago Escalante Vanoni
INVESTIGADOR DEL PROYECTO
PUCE
En su despacho.

Estimado Investigador:

La presente tiene por objeto poner en su conocimiento que una vez revisado su proyecto de investigación debidamente cumplimentado el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos del Hospital Pediátrico Baca Ortiz (CEISH-HPBO), en sesión ordinaria del 27 de marzo de 2025, aprobó el Protocolo de Investigación denominado: "**Variabilidad Genética de cepas de Streptococcus pneumoniae aisladas en pacientes de dos hospitales de tercer nivel de atención de la ciudad de Quito-Ecuador 2022-2023**" Código 008-CEISH-HPBO-PA-2025.

En tal virtud, se adjunta los documentos respectivos que confieren la aprobación del proyecto de investigación para que continúe los trámites pertinentes.

La aprobación del proyecto tiene **vigencia de 1 año**, en caso de que la realización del estudio supere el tiempo aprobado, el investigador principal deberá solicitar una renovación del estudio mínimo tres meses antes de que se cumpla el plazo de aprobación.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,



Firmado electrónicamente por:
MARIA DOLORES NIETO
GALLEGOS

Dra. María Dolores Nieto G.
Presidenta CEISH-HPBO



Firmado electrónicamente por:
DANNY XAVIER
ASIMBAYA ALVARADO

MSc. Danny Asimbaya A.
Secretario CEISH-HPBO



Ministerio de Salud Pública
Coordinación Zonal 9- Salud
Hospital Pediátrico Baca Ortiz

Aprobación de estudio de investigación observacional

El Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos del Hospital Pediátrico Baca Ortiz (CEISH-HPBO), en sesión ordinaria del 27 de marzo de 2025, informa que, una vez evaluados los fundamentos metodológicos, bioéticos y jurídicos, **APRUEBA** el Protocolo de Investigación denominado: **Variabilidad Genética de cepas de Streptococcus pneumoniae aisladas en pacientes de dos hospitales de tercer nivel de atención de la ciudad de Quito-Ecuador 2022-2023**" presentado por el investigador Luis Santiago Escalante Vanoni.

Se informa al investigador que se **debe informar al CEISH-HPBO cuando inicie la ejecución del estudio**, así como la obligación de reportes periódicos **cada tres meses** y la realización del informe final hasta 30 días hábiles, después de concluir el estudio para los casos pertinentes.

En caso de requerirse realizar enmiendas a los documentos aprobados, se requiere nuevamente a la implementación, de la aprobación del CEISH-HPBO.

En caso de que se produjera una terminación anticipada del estudio. El investigador dispondrá de un término de quince (15) días contados a partir de la terminación del estudio para notificar al CEISH, expresando los motivos de la terminación anticipada, un resumen de los resultados obtenidos antes de la culminación y las medidas adoptadas con los participantes de la investigación.

La aprobación tiene una vigencia de 1 año (un) año, después de la cual debe contar con la renovación del estudio, si fuera necesario debe realizar la solicitud con un plazo de 1 (un) mes antes de su vencimiento.

Quito, D.M., 27 de marzo de 2025



Firmado electrónicamente por:
MARIA DOLORES NIETO
GALLEGOS

Dra. María Dolores Nieto G.
Presidenta CEISH-HPBO



Firmado electrónicamente por:
DANNY XAVIER
ASIMBAYA ALVARADO

MSc. Danny Asimbaya A.
Secretario CEISH-HPBO

Anexo 3: Protocolo de extracción de ADN

PROTOCOLO EXTRACCIÓN DE ADN – QIAamp DNA Qiagen

Aislamiento de ADN genómico a partir de cultivos bacterianos GRAM POSITIVOS

Objetivo: Identificar los genes *ply*, *cpsA* y *cpsB* del locus *cps* y serotipificación de *Streptococcus pneumoniae* mediante la técnica molecular de PCR en punto final.

Etapa 1: Placa de cultura

1. Suspender de 5 a 6 colonias en 500 ul de TE (tubos de 1,5 mL).
2. Centrifugar el tubo para obtener un pellet de bacterias, durante 10 minutos a 5000 x g (**7500 rpm**).
3. Retirar el sobrenadante
4. Suspender el pellet con **180 ul de tampón ATL** (incluido en el QIAamp DNA Mini Kit) agitando vigorosamente.
5. Incubar durante al menos **30 minutos a 37 °C**.

Paso 2: Purificación

6. Añadir **20 ul de proteinasa K**, mezclar el en vórtex e incubar a **65 °C** hasta que el tejido esté completamente alisado.
7. Mezcle el vórtice **ocasionalmente** durante la incubación para dispersar la muestra, o colóquelo en un baño de agua con agitación.

NOTA:

- ✓ Se debe utilizar proteinasa K. La proteasa QIAGEN redujo la actividad en presencia de tampón ATL. El tiempo de lisis varía en función del tipo de tejido procesado, La lisis suele completarse en 1-3 h (**DEJAR 2 HORAS**).

10 minutos en agitación y 1 hora en incubación (repetir 2 veces) hasta completar las 2 horas.

8. Centrifugue brevemente o tubo de microcentrífuga de 1,5 ml para remover las gotas de dentro de la tapa (**spin**).
9. Añadir **200 ul de tampón AL** a la muestra. Mezcla por agitación de pulso durante 15 segundos.
10. Incubar a **95 °C** por **15 minutos**.
11. Centrifugue brevemente o tubo de microcentrífuga de 1,5 ml para remover las gotas dentro de la tapa (**spin**).

NOTA:

- ✓ Es necesario que la muestra y el tampón AL se mezclen bien para producir una solución homogénea.
 - ✓ Se puede formar un precipitado blanco con la adición de tampón AL, que en la mayoría de los casos se disuelve durante la incubación a 70 °C. El precipitado no interfiere con el procedimiento QIAamp ni con ninguna aplicación posterior.
12. Añadir **200 ul de etanol** (96-100%) a la muestra y mezclar mediante agitación en vórtice pulsado **durante 15 s**.
 13. Después de mezclar, gire brevemente el tubo de microcentrífuga de 1,5 ml para eliminar las gotas del interior de la tapa (**spin**).

NOTA: Es esencial que la muestra, el tampón AL y el etanol estén bien mezclados para obtener una solución homogénea.

- ✓ Se puede formar un precipitado blanco con la adición de etanol. Es esencial aplicar todo el precipitado a la columna giratoria QIAamp. Este precipitado no interfiere con el procedimiento QIAamp ni con ninguna aplicación posterior.
 - ✓ No utilice alcoholes que no sean etanol, ya que esto puede reducir el rendimiento.
14. Aplique con cuidado la **mezcla del paso 13** (incluido el precipitado) **a la columna QIAamp Spin** (en un tubo de recolección de 2 ml) sin mojar el borde.
Cierre la tapa y **centrifuga a 6.000 x g (8.000 rpm) durante 2 min.**
 15. Coloque la **columna QIAamp Spin en un tubo de recolección limpio de 2 ml (suministrado)** y deseche el tubo que contiene el filtrado.
Cierre cada columna de rotación para evitar la formación de aerosoles durante la centrifugación.

NOTA:

- ✓ Es esencial aplicar todo el precipitado a la columna giratoria QIAamp.
 - ✓ La centrifugación se realiza a 6000 x g (8000 rpm) para reducir el ruido.
 - ✓ La centrifugación a toda velocidad no afectará el rendimiento ni la pureza del ADN. Si la solución no ha pasado completamente a través de la membrana, centrifugue nuevamente a una velocidad más alta hasta que toda la solución haya pasado.
16. Abra con cuidado la columna QIAamp Spin y añada **500 ul de tampón de AW1** sin mojar el borde. Cierre la tapa y gire a 6.000 x g (8.000 rpm) durante 1 min.
 17. Coloque la columna QIAamp Spin en un tubo de recogida limpio de 2 ml (suministrado) y deseche el tubo de recogida que contiene el filtrado. (Utilice la columna del kit).
 18. Abra con cuidado la columna QIAamp Spin y añada **500 ul de tampón AW2** sin mojar el borde. Cierre la tapa y centrifuga a máxima velocidad (20.000 x g; 14.000 rpm) durante **3 min.**
 19. Coloque la columna QIAamp Spin en un nuevo tubo de recogida de 2 ml (no suministrado) y deseche el tubo de recogida que contiene el filtrado.
 20. **Centrifuga** a 20.000 x g (14.000 rpm) durante 1 min (velocidad máxima).
NOTA: Este paso ayuda a eliminar la posibilidad de tener residuos de tampón AW2.
 21. Coloque la columna QIAamp Spin en un tubo eppendorf limpio de 1,5 ml (no suministrado) y deseche el tubo de recolección que contiene el filtrado.
 22. Abra con cuidado la columna giratoria QIAamp y añada 50 ul de tampón AE o agua destilada (para la secuenciación).
 23. **Incubar** a temperatura ambiente durante 1 min y luego centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm) durante **1 min.**
 24. Repetir paso 22/23 durante 1 min a 12.000 rpm
 25. Guardar DNA a -20 °C.

Anexo 4: Protocolo de reacción de PCR

PROTOCOLO — PREPARACIÓN DE LA REACCIÓN DE PCR
(VOLUMEN FINAL 12.5 µL)

Objetivo

Preparar reacciones de PCR para la detección de los genes *ply*, *cpsA*, *cpsB* y primers específicos de serotipos de *Streptococcus pneumoniae*.

Reactivos y materiales

- ADN (extracción según protocolo del Anexo 3).
- Primers forward y reverse para *ply*, *cpsA*, *cpsB* y para cada serotipo.
- Taq polimerasa
- Agua libre de nucleasas.
- Tubos PCR, micropipetas, puntas con filtro.

Volúmenes por reacción (12 µL)	
Componente	Volumen (µL)
Taq polimerasa	6.25
Primer forward	0.60
Primer reverse	0.60
Agua libre de nucleasas	3.05
ADN	2.00
Total	12.5

Preparación de Master Mix

1. Calcular número de reacciones: muestras + controles.
2. Multiplicar cada componente por el número de reacciones (excepto el ADN).
 - Por ejemplo, para 25 reacciones: Taq=6.25 µL x 25 = 156.25 µL;
 PF=0.6 µL X 25 = 15 µL; PR=0.6 µL X 25 = 15 µL
 H2O=3.05 µL X 25 = 76. 25
 TOTAL = 262.5 µL/25 = 10.5 µL

3. Preparar la Master Mix en un tubo Eppendorf; mezclar suavemente.
4. Aliquotar 10.5 μ L por tubo.
5. Añadir al final 2 μ L de ADN molde.

Pools y reacciones en “single”

- **Preparación de pools (screening):** Se prepara pools para screening inicial combinando AND según el diseño experimental; y master mix para cada pool siguiendo el mismo procedimiento.
- **Reacciones en single (confirmación):** Se realiza en los pools positivos, con los primers específicos dirigidos a cada AND.

Se registra que ADN se incluyen en cada pool para mantener un mapa de correspondencia.

Controles de calidad

- **Control negativo:** reacción con agua, sin ADN.
- **Control positivo:** AND de una cepa control correspondiente a un serotipo específico de *Streptococcus pneumoniae*.

Anexo 5: Protocolo de programación del termociclador

PROTOCOLO – PROGRAMACIÓN DEL TERMOCICLADOR

Programa térmico

- Desnaturalización inicial: 94°C – 5 min
- Ciclos (35 x):
 - Desnaturalización: 94°C – 30 s
 - Alineamiento (TM): *Ver tabla* - 30 s
 - Extensión: 72°C – 30 s – 1 min
- Extensión final: 72°C – 10 min
- Hold: 4°C (indefinido)

Cálculo de la temperatura de alineamiento (Ta)

1. Calcular la TM de cada cebador (forward y reverse) con la media. 2. Registrar TM calculada para cada par de primers en la tabla de condiciones y, si es necesario, optimizar (probando + 2 -5 °C si hay productos inespecíficos).

Tabla de TM

Primers	TM
<i>ply</i>	57.6 °C
<i>cpsA</i>	61.3 °C
<i>cpsB</i>	58.45 °C
s19A	58.7 °C
s23B	61.25°C
s3	61.7 °C
s6A	57.95 °C
s19F	55.5 °C
s6C	58.7 °C
s17F	61.05 °C
s24F	58.7°C