



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“ASOCIACIÓN ENTRE LA VACUNA
ANTINEUMOCÓCICA 13-VALENTE Y
LA PREVALENCIA DE CO-
COLONIZACIÓN NASOFARÍNGEA DE
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE Y
STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN NIÑOS
SANOS MENORES DE DOS AÑOS EN
LIMA, PERÚ”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN
INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA

BRAYAN ENRIQUE GONZALES JAIMES

LIMA – PERÚ

2023

ASESOR

PhD. Monica Jhenny Pajuelo Travezaño

CO ASESOR

PhD. Jorge Eugenio Vidal

JURADO DE TESIS

Dr. Andres Guillermo Lescano Guevara

PRESIDENTE

Mg. Carlos Gabriel Grijalva Kato

VOCAL

Mg. Fatima Rosario Concha Velasco

SECRETARIO (A)

DEDICATORIA.

A mis padres Nancy y Jorge, gracias por apostar en mí y por su apoyo durante mis estudios.

A mis abuelitos Vicenta y Arturo por sus consejos y motivación.

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Theresa J. Ochoa y al Grupo Peruano en Investigación en Neumococo por haberme brindado el permiso y la información de sus estudios previos para poder realizar esta tesis.

A mi asesora, PhD. Mónica Pajuelo por su constante guía y apoyo.

A mi co-asesor, PhD. Jorge E. Vidal por su invaluable experiencia en el área y soporte académico.

A mis compañeros del Laboratorio de Infectología Pediátrica, en especial a Noemi Hinostroza y María Pinedo por sus críticas constructivas durante la investigación.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Tesis autofinanciada.

ASOCIACIÓN ENTRE LA VACUNA ANTINEUMOCÓCICA 13-VALENTE Y LA PREVALENCIA DE CO-COLONIZACIÓN NASOFARÍNGEA DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE Y STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN NIÑOS SANOS MENORES DE DOS AÑOS EN LIMA, P

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	healthsciences.ku.dk Fuente de Internet	1%
2	rpmesp.ins.gob.pe Fuente de Internet	1%
3	www.tandfonline.com Fuente de Internet	1%
4	core.ac.uk Fuente de Internet	<1%
5	open.uct.ac.za Fuente de Internet	<1%
6	pubmed.ncbi.nlm.nih.gov Fuente de Internet	<1%
7	Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia Trabajo del estudiante	<1%

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Antecedentes	1
Marco Teórico	4
Planteamiento del Problema.....	13
Justificación.....	14
Pregunta de investigación.....	15
Objetivos	16
II. METODOLOGÍA.....	17
Diseño y lugar de estudio	17
Población, muestra u objeto de estudio	18
Variables.....	22
Procedimientos y técnicas	24
Consideraciones éticas	25
Cálculo de potencia estadística.....	27
Análisis estadístico	28
III. RESULTADOS	31
IV. DISCUSIÓN	51
Hallazgos generales	51
Limitaciones y fortalezas.....	58
V. CONCLUSIONES	61
VI. RECOMENDACIONES	62
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	63
VIII. ANEXOS	

RESUMEN

Introducción: Las vacunas antineumocócicas (PCV) han producido no solo cambios en las dinámicas de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* (Spn), sino también en el incremento en la frecuencia de infecciones por *Staphylococcus aureus* (Sa). Considerando que ambas bacterias son usuales colonizadores de la nasofaringe en niños jóvenes, la PCV podría afectar la co-existencia de ambas bacterias. El objetivo de este estudio fue determinar si existe asociación entre la PCV13 y la colonización por Spn, por Sa y co-colonización (Spn + Sa) en niños sanos <24 meses de edad de cinco hospitales nacionales de Lima, Perú entre los años 2018 y 2019. **Métodos:** Estudio secundario, transversal, multicéntrico. Se analizaron los datos demográficos y clínicos de 894 niños <24 meses de edad. Los cálculos de frecuencia, comparaciones y de asociaciones se realizaron a través de pruebas paramétricas, no paramétricas y regresión multinomial para estimar RP, considerando un $p < 0,05$ como significativo. **Resultados:** De los niños participantes, 17,4% estuvieron colonizados solo por Spn, 16,8% solo por Sa y 2,9% estuvieron co-colonizados. El 89,4% habían recibido al menos una dosis de la PCV13. La colonización solo por Spn se asociaron a síntoma respiratorio (RPa: 1,95; $p=0.001$), vivir con otros niños (RPa: 1,99; $p=0.001$), hospitalización previa (RPa: 0,29; $p=0.048$) y haber recibido al menos una dosis de la PCV13 (RPa: 3,00; $p=0.022$). La colonización solo por Sa se asocia a completar lactancia materna exclusiva (RPa: 0,59; $p=0.028$) y haber recibido al menos una dosis de la PCV13 (RPa: 0,48; $p=0.017$). Adicionalmente, la co-colonización no se asoció a la inmunización con la PCV13 (RPa: 1,71; $p=0.521$) y los niños del género masculino se asociación con mayor frecuencia de co-colonización (RPa: 2,50; $p=0.049$).

Conclusión: La inmunización con la PCV13 se asocia positivamente a la colonización solo por Spn, negativamente a la colonización solo por Sa y no se asocia a la co-colonización por ambos patógenos.

PALABRAS CLAVES

VACUNAS ANTINEUMOCÓCICAS, *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*,
STAPHYLOCOCCUS AUREUS, CO-COLONIZACIÓN

ABSTRACT

Introduction: The pneumococcal conjugate vaccines (PCV) have not only generated changes in the dynamics of serotypes of *Streptococcus pneumoniae* (Spa), also an increase in the *Staphylococcus aureus* (Sa) frequency. Considering that these bacteria commonly colonize the nasopharynx in young children, PCV could potentially impact the co-existence of these pathogens. The aim of this study was to determine the association between the PCV13 and the colonization by Spn, Sa and co-colonization (Spa + Sa) in healthy children under two years old from five national hospitals. in Lima, Peru between 2018 and 2019. **Methods:** A multicenter cross-sectional study, that developed a secondary data analysis using demographic, clinical data from 894 children under two years old. The analysis of associated factors was carried out using parametric and non-parametric tests, and multinomial regression to estimated PR, statistical significance level was set at $p < 0.05$. **Results:** 17.4% were only Spa carriers, 16.8% were only Sa carriers, and 2.9% were co-colonized Spa + Sa. 89.4% were immunized with at least one dose of PCV13. In only Spn carriers, they were associated with mild respiratory illness (RPa: 1.95; $p = 0.001$), living with other children (RPa: 1.99; $p = 0.001$), prior hospitalization (RPa: 0.29; $p = 0.048$) and have received at least one dose of PCV13 (RPa: 3.00; $p = 0.022$). In only Sa carriers, they were associated with completing exclusive breastfeeding (RPa: 0.59; $p = 0.028$) and have received at least one dose of PCV13 (RPa: 0.48; $p = 0.017$). Additionally, co-colonization was not associated with PCV13 immunization (RPa: 1,71; $p = 0.521$) and male children were associated with co-colonization (RPa: 2.50; $p = 0.049$). **Conclusion:** Immunization with PCV13 was

positively associated with colonization by Spn, negatively with colonization by Sa and not associated with co-colonization by both pathogens.

KEY WORDS

PNEUMOCOCCAL CONJUGATE VACCINE, *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, CO-COLONIZATION

I. INTRODUCCION

Antecedentes

Las vacunas conjugadas antineumocócicas (PCV, por sus siglas en inglés *pneumococcal conjugate vaccines*) representan una estrategia mundial para reducir la carga de las enfermedades causadas por *Streptococcus pneumoniae* (neumococo). Sin embargo, con su introducción generalizada han surgido preocupaciones sobre el posible incremento de las tasas de mortalidad y morbilidad por *Staphylococcus aureus* (1). *S. aureus* es un organismo oportunista que coloniza las membranas mucosas y la piel del 20 - 80% de la población humana de forma permanente y sin síntomas (2), y es un común causante de infecciones bacterianas tanto a nivel comunitario como hospitalario. Del mismo modo, *S. pneumoniae* está asociado a un alto porcentaje de neumonías, meningitis y otras enfermedades invasivas que provocan una alta mortalidad y morbilidad entre los niños menores de cinco años (3). La co-colonización de estos patógenos (Spn + Sa) adquiere relevancia clínica ya que tanto los portadores nasofaríngeos de neumococo como los de *S. aureus* tienen un mayor riesgo de desarrollar infecciones por estos patógenos (4).

Luego de la introducción de las PCVs, se ha observado el reemplazo de serotipos de *S. pneumoniae* por un aumento en la prevalencia de serotipos no vacunales (no incluidas en las PCVs) clínicamente relevantes como el serotipo 19A tras la introducción de la vacuna antineumocócica 7-valente (PCV7). Esta sustitución puede desempeñar un papel en la alteración de los patrones de susceptibilidad a los antibióticos en las cepas colonizadoras, ya que algunos

serotipos son particularmente resistentes a los antibióticos (5). Previamente a la introducción de la vacuna antineumocócica 13-valente (PCV13), los actuales serotipos vacunales de *S. pneumoniae* habían sido extensamente estudiados por su alta prevalencia y por estar asociados a la enfermedad neumocócica invasiva (6). En la actualidad, las investigaciones sobre la dinámica de los serotipos no vacunales emergentes son escasos y no se ha evaluado la interacción con la microbiota nasofaríngeo, entre ellos *S. aureus*.

El primer ensayo clínico en evaluar la PCV7 y su efecto en la colonización por *S. aureus*, reportó un incremento en la frecuencia de colonizados luego de haber recibido dos dosis (7). Sin embargo, tanto el estudio previamente mencionado como otros también reportan que existe una asociación inversa entre *S. pneumoniae* serotipos vacunales (serotipos incluidos las PCV, serotipo-PCV) y *S. aureus* (4,7–11), sugiriendo que la colonización es un evento donde participan diversos factores. Por ejemplo, debido a que ciertos *S. pneumoniae* presenta un metabolismo más acelerado (12) que *S. aureus*, lo cual le confiere un mejor aprovechamiento de los nutrientes del medio y que adicionalmente pueden producir peróxido de hidrógeno (H₂O₂) mediado por las enzimas *SpxB* y *LctO*, esta bacteria tiene la capacidad de intoxicar y eliminar a *S. aureus* (13). En contraste, *S. pneumoniae* puede interactuar de manera benéfica con otros patógenos respiratorios como *Haemophilus influenzae*. Esta bacteria se aprovecha de uno de los mecanismos neumocócicos de invasividad (neumolisina) que estimula la sobre producción de la molécula de adhesión intercelular-1 del hospedero, la cual es utilizada por *H. influenzae* para facilitar su invasión a las células de las vías respiratorias (14). Adicionalmente, reportes mostraron que la co-colonización Spn + Sa es 2,13 (IC95%: 0,24 - 0,95)

veces menor con aislamientos neumocócicos que presentan *pilus* (estructura extracelular utilizada en los mecanismos de invasividad neumocócica) en comparación con los aislamientos carentes de *pilus* (15); sugiriendo que estas estructuras favorecen a la competencia contra otros patógenos nasofaríngeos, limitando o favoreciendo su desarrollo (dependiendo de la interacción entre ambos) (16,17). Sin embargo, estas estructuras han sido reportadas en serotipos invasivos (que principalmente están incluidos en las PCVs) (18,19), lo cual podría explicar la relación inversa entre *S. aureus* y *S.pneumoniae* serotipo-PCV7 al menos en la era pre-vacunal (antes de la introducción de las PCVs). A pesar de esto y considerando la actual emergencia de serotipos no PCVs y ausentes de *pilus*, aún no se han explorado las interacciones entre estos serotipos y otros patógenos nasofaríngeos, así como potenciales factores asociados que favorezcan a interacciones benéficas entre bacterias nasofaríngeas.

Las implicaciones de la co-colonización por Spn + Sa en la era de las PCVs requieren más investigación (3), ya que la interacción entre estos patógenos podría influir en la eficacia de la vacunación, debido a que las tasas de portación por neumococo no han sido reducidas después de la introducción de las PCVs en ciertas partes del mundo, sugiriendo complejas interacción entre la microbiota natural del tracto respiratorio alto y la inmunidad inducida por estas (20). Además, es necesario que los estudios que midan el efecto de la vacunación sobre la epidemiología de *S. pneumoniae* en Perú, también examinen los cambios concurrentes en *S. aureus*, dado que mientras los serotipos vacunales de neumococo (serotipos-PCV) se han asociado a la no colonización por *S. aureus*, otros estudios han reportado que luego de la introducción de las PCVs se ha incrementado la frecuencia de colonización

por patógenos respiratorios, en especial *S. aureus* (21,22). La PCV7 fue la primera generación de las PCVs y fue introducida en el Esquema Nacional de Vacunación de nuestro país en julio de 2009. Tres años más tarde, se introdujo la PCV 10-valente (PCV10), y en 2015, la vacuna 13-valente (PCV13) (23). Sin embargo, al igual que en otros países de medianos y bajos ingresos, no se ha evaluado si la introducción de las vacunas antineumocócicas favorece o disminuye la colonización nasofaríngea de *S. pneumoniae* y por otras bacterias de importancia clínica, tales como *S. aureus* (24,25), y como interactúan estos patógenos con las cepas no vacunales y vacunales de *S. pneumoniae* tras la inmunización.

Marco Teórico

Streptococcus pneumoniae

Llamada comúnmente como “neumococo”, es una bacteria gram-positiva encapsulada, generalmente dispuesta como diplococos o en cadenas cortas; son anaerobios facultativos, presentan alfa-hemólisis, catalasa y oxidasa negativos, inmóviles y no esporuladas. Nutricionalmente, es una bacteria exigente que necesita sangre para su crecimiento, ya que necesita una fuente que provea catalasa para poder contrarrestar el H₂O₂ producido por ella mismo. Crece óptimamente a 37 °C a 5% de CO₂ y pueden presentar lisis durante la fase de crecimiento estacionario (26).

La neumonía es una de las principales causas de muerte en niños menores de cinco años en Perú. De 1996 al 2000, esta enfermedad causó el 20% de las muertes infantiles y entre 30 - 50% de estos casos, eran causados por neumococo.

En 2004, en Perú, las enfermedades neumocócicas invasivas (ENI) fueron causante de la muerte de 1 612 000 niños, 716 000 de los cuales tenían menos de cinco años; superando las defunciones causadas por rotavirus, fiebre amarilla, hepatitis B, tos ferina, etc. Debido a esto, se estima que cada día fallecen de 5 – 8 niños menores de cinco por neumonía neumocócica (27). En 2014, la tasa de mortalidad por neumonía en niños menores de cinco años en Perú fue de 9,1 por cada 100 000 niños (28).

Una de las estrategias usadas para combatir las ENI en nuestro país y a nivel global ha sido la introducción de las PCV, incluyendo la 7-valente, 10-valente y 13-valente (PCV13) (28). Aunque las vacunas actuales contra neumococo cubren los serotipos más comunes, estos incluyen solo son una pequeña parte de los más de 90 serotipos existentes (29). Por otro lado, el mal uso de los antibióticos ha contribuido en el incremento de la frecuencia de cepas de neumococo resistentes a betalactámicos y a quinolonas, llegando a ser considerada como una superbacteria (30). Además, la resistencia a los antibióticos y las fallas vacunales aumentan gracias a la capacidad de formación de *biofilms* de dicha bacteria (31).

La resistencia a los antibióticos de las cepas neumocócicas se considera actualmente un problema mundial que puede conducir al fracaso terapéutico, al aumento de la morbilidad y la mortalidad en los grupos en riesgo (niños jóvenes y adultos mayores) consecuentemente al aumento de los costos hospitalarios y al uso de agentes antimicrobianos más tóxicos (32). Del mismo modo, los patrones de resistencia neumocócica evolucionan con el tiempo según factores como el uso excesivo de antibióticos (presión antibiótica), la recombinación genética, el uso de

las vacunas conjugadas y el reemplazo de serotipos. Este último es un fenómeno también conocido como emergencia de serotipos, el cual sugiere que tras la disminución de serotipos vacunales, el nicho ecológico es cubierto por nuevos serotipos, poco frecuentes o no reportados frecuentemente en esa población (33).

Serotipos de *Streptococcus pneumoniae*

Se han reportado más de 90 serotipos neumocócicos de los cuales, la frecuencia, papel en la colonización y la capacidad de producir enfermedad invasiva varían según la edad, la región geográfica y las condiciones socioeconómicas. La introducción de las PCVs dio como resultado la disminución de la enfermedad invasiva y las tasas de colonización nasofaríngea por parte de los serotipos vacunales, consecuentemente con el aumento de serotipos no vacunales. Este fenómeno es denominado como reemplazo o emergencia de serotipo (34).

Cada serotipo difiere entre sí en la capacidad de invasiva a su huésped y su coexistencia con otras bacterias (35,36). Por otro lado, el reemplazo de serotipos conduce al reconocimiento de serotipos no vacunales clínicamente relevantes (5). Con el conocimiento generado mediante las vigilancias epidemiológicas durante la introducción de la PCV7, se desarrolló la PCV13 que incluye protección contra seis serotipos adicionales (1, 3, 5, 6A, 7F y 19A). Es nuevamente probable que enfrentemos nuevas presiones selectivas que conduzcan al reemplazo de serotipos cubiertos por esta nueva generación de la PCV, debido a que estudios tempranos sugieren la presencia de este fenómeno en países luego de la inclusión de la PCV13 en sus planes de inmunización nacional (37–42).

Staphylococcus aureus

Es una bacteria gran positiva que se agrupa comúnmente en racimos; son fermentadores, catalasa y coagulasa positiva, y son parte de la flora normal de la epidermis y mucosas humanas. Por otro lado, tienen la capacidad de generar infecciones invasivas que están relacionadas a abscesos, otitis media, septicemia e infecciones de las vías respiratorias. El daño que ocasiona *S. aureus* a su huésped es principalmente debido a la producción de enzimas y toxinas que coagulan el plasma, hemolizan la sangre y provocan intoxicaciones por la enterotoxina estafilocócica. Acompañada con su gran facilidad de adquirir resistencia a los antibióticos (debido a la capacidad de adquirir elementos exógenos por transferencia horizontal intra e inter especie) y que por lo menos, todas las personas sufren una infección por *S. aureus* a lo largo de toda su vida (26,43), la Organización Mundial de la Salud (OMS) cataloga a este patógeno como prioridad crítica para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos (44).

Colonización nasofaríngea

La colonización neumocócica de la nasofaringe generalmente ocurre dentro de los dos primeros años de vida y su prevalencia oscila entre 30 y 60%, aunque puede llegar hasta 76% en países de bajos ingresos (24,37). Asimismo, es el primer paso en la patogenia de la enfermedad neumocócica es el transporte o colonización nasofaríngea que conduce a la infección no invasiva o invasiva, la cual, juega un papel importante en la transmisión horizontal en las poblaciones y es fundamental para el desarrollo de resistencia a los antibióticos porque proporciona un entorno para la recombinación de genes y el intercambio de material genético inter e intra

especie (capacidad de *S. pneumoniae* de adquirir ADN exógeno) (33,45). La colonización nasal o nasofaríngea de *S. aureus* es un factor importante para que el niño presente infecciones recurrentes por este patógeno (46). La colonización de *S. aureus*, de la misma manera que en *S. pneumoniae*, está asociada a condiciones de hacinamiento comunitario o en el hogar (47,48).

Distintas especies bacterianas como *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, etc, pueden coexistir en nuestra nasofaringe y la interacción que pueden tener, varía entre especies e incluso entre distintas cepas, serotipos o serogrupos (49). Las interacciones son particulares entre cada especie, mientras que unas compiten por nutrientes o recursos necesarios para su crecimiento produciendo sustancias que desencadenan la respuesta inmune celular o humoral del huésped (la cual limita o favorece el crecimiento de ciertas especies), otras pueden producir sustancias que limitan o erradican directamente el crecimiento de las bacterias que compiten por el nicho ecológico en la nasofaringe (50–52). Por ejemplo: tanto *S. pneumoniae* y *S. aureus* colonizan fácilmente la nasofaringe de personas sanas debido a su capacidad formadora de *biofilm*, permitiendo su coexistencia. No obstante, ciertas cepas de *S. pneumoniae* (como la cepa *TIGR4*) productoras de péptidos estimuladores de competencia (*CSP1* y *CSP2*) limitan la producción de *biofilm* de *S. aureus*, dificultando la colonización de la misma (52). Por otro lado, otras cepas de *S. pneumoniae* presentan la capacidad productora de H₂O₂, la cual erradica cepas plánticas de *S. aureus* (como la cepa *Newman*) (53). Lo anterior mencionado, sugiere la complejidad entre las interacciones de *S. pneumoniae* y *S. aureus* que aún no han sido esclarecidas para tener una conclusión general exploradas, principalmente con la interacción con cepas neumocócicas emergentes.

Vacunas conjugadas antineumocócicas

La vacuna PCV7 se incluyó en el programa de vacunación del Perú en 2009. Dos años después, se introdujo la PCV10 y en 2015, se incluyó la PCV13. La actual vacuna antineumocócica (PCV13) cuenta con el esquema 2 + 1. Los niños reciben la primera dosis a los dos meses de edad, la segunda dosis a los cuatro meses de edad y la tercera dosis (dosis de refuerzo) a los 12 meses edad (54).

La inmunogenicidad de las PCVs varía según el tipo de vacuna y la protección contra los serotipos que las conforman. Como se muestra en la Figura 1 adaptada de Madhi *et al.* (55), entre 75 – 90% de los niños de seis semanas de edad inmunizados con una dosis de la PCV13 presentaron concentraciones ≥ 0.35 $\mu\text{g/mL}$ de IgG específico para los serotipos 1, 3, 14 y 19F. Asimismo, entre 25 – 60% de los niños inmunizados con una dosis de la PCV13 presentaron concentraciones ≥ 0.35 $\mu\text{g/mL}$ de IgG específico para los serotipos 4, 5, 7F, 9V, 18C y 19A. Esto sugiere que la inmunización con al menos una dosis de las PCVs genera títulos de anticuerpos ≥ 0.35 $\mu\text{g/mL}$ de IgG específico (punto de corte referencial como protección óptima según los ensayos clínicos realizados) contra los principales serotipos vacunales circulante en Perú (48,56).

Del mismo modo, para los serotipos 1, 4, 5, 9V, 18C, 19A, 19F, el esquema de inmunización 1+1 mostró concentraciones mayores de IgG específico para estos serotipos en comparación de los niños con esquema 2 + 1, lo cual sugiere que la reducción de las dosis de PCVs en los esquemas de inmunización no impactan en la inmunogenicidad de la vacuna (Ver Figura 2) (55). Las implicaciones de implementar el esquema 2+1 o 1+1 fueron evaluadas teniendo como resultado

cambios no sustanciales entre un esquema y el otro. Debido a esto, en Inglaterra desde 2020 se cambió al esquema 1+1 (57–60). Asimismo, países como Corea (esquema 1+1) (61) y Perú (dosis única si el niño no ha iniciado con el esquema inmunización si tiene entre 24 a 48 meses de edad) recomiendan esquemas de vacunación antineumocócica según la edad del niño desde que recibió la primera dosis (61–63).

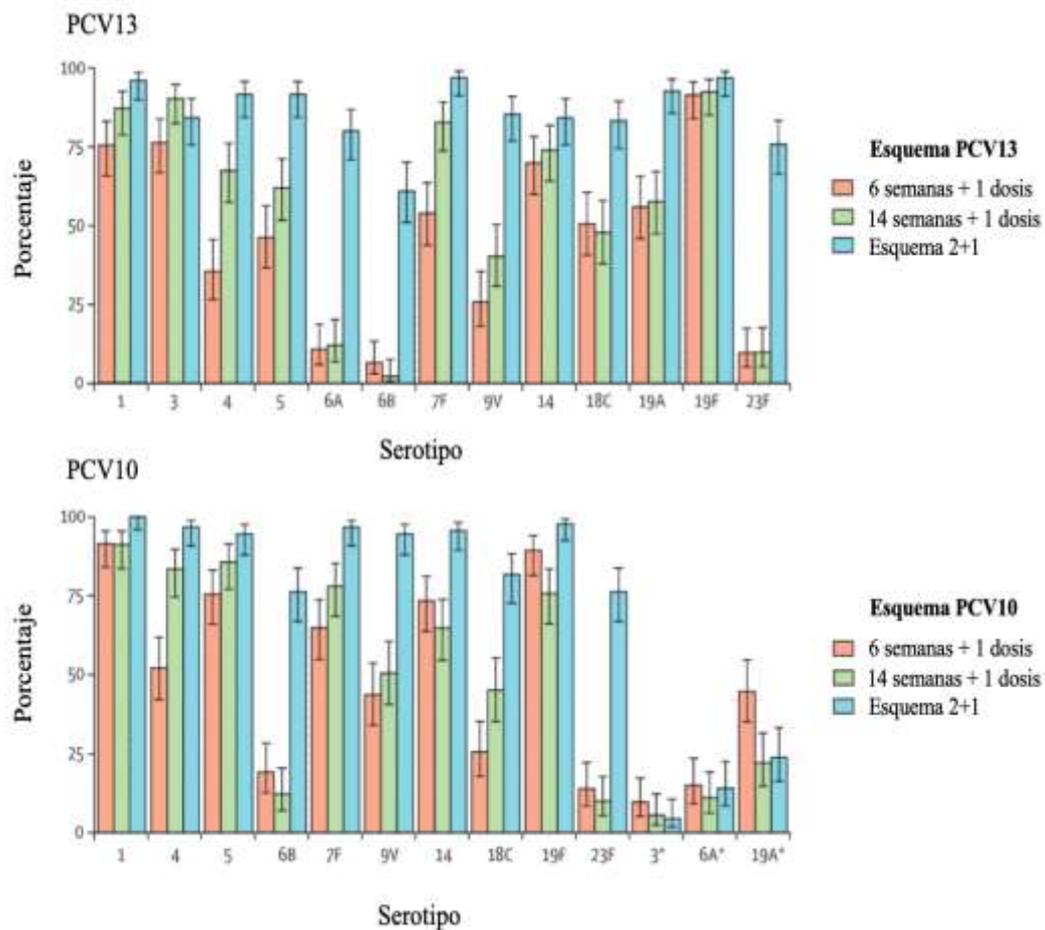


Figura 1. Porcentaje de niños con concentración de IgG $\geq 0.35 \mu\text{g/mL}$ luego de un mes del esquema asignado (Adaptado de Madhi *et al.*, 2020)

6 semanas + 1 dosis (dosis única): niños que recibieron la primera dosis a las 6 semanas de edad.

14 semanas + 1 dosis (dosis única): niños que recibieron la primera dosis a las 14 semanas de edad.

Esquema 2 + 1: niños que recibieron las dos primeras dosis a las 6 y 14 semanas + la dosis de refuerzo (a las 40 semanas de edad).

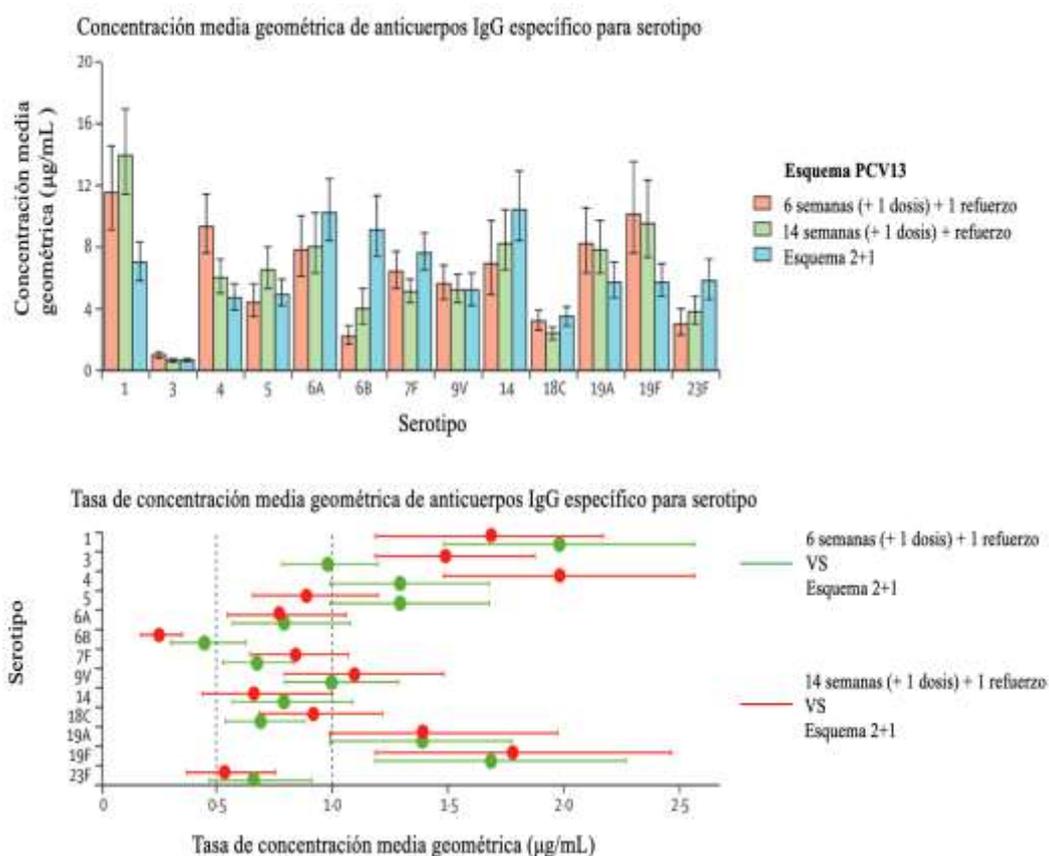


Figura 2. IgG en suero luego de un mes después de la dosis de refuerzo de PCV13 en niños con esquema de inmunización con 1 y 2 dosis (Adaptado de Madhi *et al.*, 2020)

6 semanas (+ 1 dosis) + 1 refuerzo (esquema 1 + 1): niños que recibieron la primera dosis a las 6 semanas de edad y la dosis de refuerzo a las 40 semanas de edad

14 semanas (+ 1 dosis) + 1 refuerzo (esquema 1 + 1): niños que recibieron la primera dosis a las 14 semanas de edad y la dosis de refuerzo a las 40 semanas de edad

Esquema 2 + 1 (niños que recibieron las dos primeras dosis a las 6 y 14 semanas de edad + la dosis de refuerzo (a las 40 semanas de edad).

La introducción de la PCV en el Perú tuvo como objetivo la reducción de casos de ENI. Asimismo, otro potencial impacto de las PCVs es la disminución de la portación neumocócica comunitaria, al menos por serotipos no PCVs. Por ejemplo, en una comunidad andina en San Marcos-Cajamarca, entre 125 niños estudiados de 2009 a 2011, con una cobertura de 60% de al menos dos dosis de PCV7, los serotipos PCV7 disminuyeron del 48,0% al 28,8%. Sin embargo, los serotipos no-PCV7 incrementaron del 52,0% al 71,2%, (este estudio no reporta la prevalencia de portación nasofaríngea) (64).

Adicionalmente, las vacunas conjugadas pueden reducir la resistencia neumocócica en poblaciones vacunadas y no vacunadas al reducir los portadores de serotipos resistentes, protegiendo así a las poblaciones vacunadas y previniendo la transmisión de enfermedad invasiva, reduciendo así el uso de antibióticos (5). Los estudios han demostrado que la vacunación con PCV7 reduce la portación nasofaríngea de cepas neumocócicas resistentes a penicilina, no obstante, dos años después de la disminución inicial de las cepas resistentes, se observó la portación de cepas con resistencia intermedia, principalmente debido a la presencia del serotipo 19A (5), que posteriormente fue cubierto con PCV13. Del mismo modo, la resistencia a macrólidos en *S. pneumoniae* ha incrementado luego de la introducción de la PCV13 en el plan nacional de inmunización del Perú, el cual, está asociado a la presencia del serotipo 19A tanto en aislamientos de portadores como en aislamientos procedentes de ENI (65).

Se hipotetiza que, la presión que ejerce las PCVs en las poblaciones circulantes de serotipos en ciertas áreas geográficas ha sido afectada, dando lugar a

la aparición de cepas no capsulares. Estos serotipos de cepas no capsulares no cubiertos por las PCVs, por el momento son encontrados exclusivamente en niños sanos. Pese a esto, presentan mayor capacidad de formación de *biofilm* en comparación con cepas invasivas. Esto es preocupante debido a que, como mencionamos previamente, la portación es el primer paso en el desarrollo de ENI y a medida que estos serotipos no cubiertos por las PCVs incrementen, pueden volverse clínicamente relevantes en los próximos años (66).

Planteamiento del Problema

Desde el uso generalizado de las PCVs, se ha producido un cambio no solo en las frecuencias de los serotipos de *S. pneumoniae* no vacunales, sino también se ha reportado cambios en las tasas de portación de *S. aureus* en algunas poblaciones de niños sanos (8,21,22). La colonización frecuente con *S. pneumoniae* y *S. aureus* se asocia con la diseminación bacteriana a nivel poblacional y un mayor riesgo de autoinfección, incluidas infecciones del tracto respiratorio (67–69). La mayoría de los estudios sobre esta co-colonización encontraron que la correlación inversa entre *S. pneumoniae* y *S. aureus* era significativa pero solo para el transporte de cepas de *S. pneumoniae* de tipo vacunal, que eran los más comunes antes de la introducción de las PCV7 (4,7–11). Una co-existencia entre estos dos patógenos puede sugerir cambios epidemiológicos posiblemente debido a la vacunación generalizada con PCVs, de igual manera como sucede con la aparición de serotipos emergentes de *S. pneumoniae* (5,8). Sin embargo, el mecanismo detrás de esto y las implicaciones clínicas aún no se han determinado por completo (9).

Justificación

Determinar si existe o no una asociación entre la PCV13 y la colonización por de *S. pneumoniae*, *S. aureus* y co-colonización nasofaríngea en niños menores de dos años de una ciudad aportará información que puede servir de base para el planteamiento y desarrollo de otros estudios en los que se evalúen la asociación entre la PCV13 y el transporte nasofaríngeo de otras bacterias y las asociaciones entre ellas. Así como para implementar una vigilancia en portadores luego de la introducción de las nuevas generaciones de las PCVs, enfocado es bacterias con potencial invasivo.

Considerando que la reducción de la dosis de las PCVs al esquema 1+1 no tiene un impacto significativo en la inmunogenicidad producida por la misma y que el hecho de haber recibido al menos una dosis de la PCV13 genera la suficiente producción de IgG específico para los serotipos 1, 3, 14 y 19F que son los más frecuentes en Lima, Perú (48,56) (al menos en la era pre-PCV13), consideramos que tener al menos una dosis de la PCV13 podría generar un cambio en la dinámica de los patógenos nasofaríngeos. Adicionalmente a esto, y como lo menciona la literatura abordada, *S. pneumoniae* puede interaccionar de maneras benéfica y antagónica con *S. aureus* y otras bacterias comensales. Por ello, es necesario determinar ¿Cuál es el efecto de la introducción de la PCV13 en la frecuencia de la colonización asintomática de *S. pneumoniae*, *S. aureus* y en la co-existencia entre ambas bacterias?

A la fecha no se han presentado reportes sobre estudios en portadores nasofaríngeos después de la inclusión de la PCV13 y como esta puede afectar a la

población bacteriana nasofaríngea en Perú. Los únicos reportes sobre este evento fueron realizados cuando la PCV7 formaba parte de los planes nacionales de vacunación en Europa, Estados Unidos, Asia y África. Los resultados evaluados con la PCV7 no podrían ser extrapolables con la actual vacuna PCV13 ya que esta última brinda protección contra cinco serotipos extras que pueden estar interactuando de distinta manera con la población bacteriana comensal de la nasofaringe.

Además, permitirá que el personal de salud esté informado de los factores asociados a la co-colonización Spn + Sa, cuya interacción podría ocasionar inconvenientes en el tratamiento de infecciones respiratorias en la población pediátrica. Por ello, la presente investigación tiene como objetivo determinar si existe asociación entre la vacuna antineumocócica 13-valente y la prevalencia colonización de *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y co-colonización nasofaríngea en niños sanos menores de dos años de edad que acuden en forma ambulatoria a sus controles de crecimiento y desarrollo y/o vacunación en cinco hospitales de Lima, Perú entre los años 2018 y 2019.

Pregunta de investigación

¿Existe asociación entre la vacuna antineumocócica 13-valente con el estado de colonización de *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y co-colonización asintomática en niños sanos menores de dos años de edad, que acuden en forma ambulatoria a sus controles de crecimiento y desarrollo y/o vacunación en cinco centros de salud en Lima, Perú?

Objetivos

Objetivo principal

Determinar si existe asociación entre la vacuna antineumocócica 13-valente y la prevalencia de *S. pneumoniae*, *S. aureus* y co-colonización asintomática en niños sanos menores de dos años de edad, que acuden en forma ambulatoria a sus controles de crecimiento y desarrollo y/o vacunación en cinco hospitales nacionales de Lima, Perú entre los años 2018 y 2019.

Objetivos específicos

- Describir las características demográficas, clínicas y epidemiológicas de la población estudiada.
- Determinar los factores asociados a la colonización de *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y co-colonizados en la población estudiada.

Objetivos secundarios

- Determinar los patrones de resistencia antimicrobiana en los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* de los niños co-colonizados sanos.

II. METODOLOGÍA

Diseño y lugar de estudio

Este estudio de tesis utilizó la base de datos proveniente del estudio principal titulado: “Distribución de serotipos y sensibilidad antibiótica de neumococo en niños portadores nasofaríngeos luego de la introducción de la vacuna 13-valente en Lima, Perú”. Este estudio principal fue de corte transversal y multicéntrico, realizado entre 2018 - 2019, donde se incluyeron a 1000 niños menores de dos años de edad que asistieron de manera ambulatoria a sus controles de crecimiento y desarrollo y/o vacunación en los hospitales nacionales que participaron en el estudio (Hospital Nacional Cayetano Heredia, Instituto Nacional de Salud del Niño-Sede Breña, Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins, Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé y Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión). El objetivo del estudio principal fue determinar las frecuencias de los serotipos y resistencia antimicrobiana de cepas de *S. pneumoniae* aisladas de niños menores de dos años. De cada participante, se recolectaron características demográficas y clínicas en el momento del enrolamiento.

La presente tesis realizó un análisis datos secundarios, tuvo un diseño transversal y contó con la variable dependiente “estado de colonización” y con la variable independiente principal “inmunización con al menos una dosis de PCV13”. Además, entre otras co-variables independientes se analizó a: “sexo”, “edad”, “vive con otros niños menores de seis años de edad en casa” , “lactancia materna exclusiva”, “presencia de síntoma respiratorio”, “asistencia a guardería, nacimiento prematuro”, “uso de antibióticos previo”, “hospitalización previa”, según el

diagrama acíclico dirigido (DAG) construido en base a la búsqueda bibliográfica solo los principales confusores entre la potencial asociación entre la PCV13 y el estado de co-colonización (Anexo 1.1). Este estudio tuvo como objetivo determinar si existe asociación entre la vacuna antineumocócica 13-valente y la prevalencia de co-colonización nasofaríngea de *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* en niños sanos menores de dos años de edad, que acuden en forma ambulatoria a sus controles de crecimiento y desarrollo y/o vacunación en los centros de salud en donde se realizó el estudio principal.

Población, muestra u objeto de estudio

La población en estudio fueron niños sanos de dos a 24 meses de edad que asistieron a la consulta externa de pediatría, control del niño sano o consultorio de vacunación de los hospitales que participaron en el estudio principal. Se eligió este grupo de edad debido a que la colonización nasofaríngea de las bacterias de interés para el estudio se desarrolla generalmente en etapas tempranas de la vida (<2 años). Además, describe la situación actual de portadores que pueden estar influenciados por el efecto directo e indirecto de la vacuna y es la misma población utilizada en un estudio previo a la introducción de la PCV7 en Perú con el cual el estudio principal realizó comparaciones (39).

Definición de niño sano

El estudio principal definió como “niño sano” a todo niño que acudió a su control de crecimiento, desarrollo y/o inmunización en los hospitales participantes y cuyo padre o cuidador informó que, al momento del enrolamiento, el niño no

padecía de ninguna enfermedad importante como: neumonía, sepsis, bacteriemia o meningitis/encefalitis (70). Los niños podrían haber tenido infecciones respiratorias leves como: rinorrea, tos leve, estornudos, temperatura de 38,0 a 38,5°C; en cualquier estación del año. Si bien los niños que cursaban con infecciones respiratoria leve del tracto respiratorio superior aumentaban su probabilidad de colonización nasofaríngea por bacterias, en este caso por neumococo, se decidió no excluir a estos niños, ya que diversos estudios similares incluyen a estos niños, siempre y cuando se reporten en los resultados su frecuencia y proporción en relación al total de muestras y así puedan ser comparados con publicaciones previas (48). Además, uno de los objetivos del estudio primario fue el comparar los hallazgos con un estudio previo en nuestro país, realizado antes de la introducción de la PCV; en el cual se utilizaron los mismos criterios de inclusión, los que se evitaron modificar para no restar validez a la comparación (39).

Criterios de inclusión

- Niño sano de acuerdo con la definición del estudio principal, cuya edad estaba comprendida entre los dos meses y 24 meses de edad.
- Firma del consentimiento informado por padres o cuidadores mayores de edad.
- El niño podía presentar síntoma respiratorio superior leve (resfrío común, tos leve, rinorrea, estornudos, temperatura de 38,0 a 38,5°C).
- Contar con carnet de vacunación y registro de dosis de vacunas antineumocócicas.

Criterios de exclusión

- Niños que no cumplieran con la definición de niño sano.
- Sospecha de enfermedad aguda seria (neumonía probable, sepsis, bacteriemia, meningitis, encefalitis), por parte del personal de salud responsable de la atención.
- Uso de antibióticos al momento del enrolamiento (últimas 24 horas).

La muestra estuvo conformada por los niños que cumplían los criterios de inclusión y exclusión mencionados anteriormente. Se realizó un muestreo por conveniencia y de manera consecutiva en los hospitales participantes hasta alcanzar el tamaño de muestra calculado para el estudio madre (n=1000). Se aseguró que el personal encargado del enrolamiento esté presente a lo largo de toda la atención de los consultorios a los cuales asistían los posibles voluntarios de manera que el total de participantes represente a la mayoría de los niños que asistían a los hospitales participantes entre enero 2018 a setiembre 2019.

El estudio principal contó con personal entrenado que se encontraba en los hospitales participantes durante toda la jornada de atención de los consultorios a los cuales asistían los posibles voluntarios, quienes enrolaron a los niños de manera consecutiva, verificando que cumplieran con los criterios de inclusión y exclusión. Se brindó la información a los padres o cuidadores sobre el estudio, se absolvió sus dudas y se les invitó a participar. Luego, se les solicitó firmar el consentimiento informado, se les realizó una encuesta con el objetivo de recolectar datos demográficos, epidemiológicos y clínicos y finalmente, se procedió con la toma de la muestra de hisopado nasofaríngeo. Los hisopados nasofaríngeos fueron

colectados de los menores utilizando un hisopo de Rayon (*Puritan®*, *sterile rayon tipped applicators*). Se tomó una muestra por paciente, siguiendo la técnica recomendada por la OMS (71). La técnica consistía en: sostener al paciente fijando su cabeza con cuidado y extendiéndola ligeramente, luego se introducía el hisopo por la fosa nasal en forma gentil y paralela a la base de la cavidad nasal hasta llegar a la nasofaringe, donde se rotó 180 grados y se retiró lentamente.

De igual forma, a los padres o cuidadores de los menores participantes se les aplicó cuestionario tipo encuesta titulado “Ficha de Recolección de Datos” (Anexo 1.2). El cuestionario estaba conformado por 21 preguntas divididas en dos secciones. La primera sección del cuestionario pretendía recopilar información general del menor, tales como nombre, número de DNI, hospital de enrolamiento, nombre del padre o cuidador, número de historia clínica, fecha de nacimiento, edad en meses, sexo, dirección, teléfono, fecha de toma de muestra y el nombre del centro de vacunación. Por otro lado, en la segunda sección se le consultaba al padre o cuidador sobre datos clínicos del menor, entre los que se incluyeron: duración de la lactancia materna exclusiva, duración de lactancia materna, número de otros niños menores de 6 años en el mismo domicilio, asistencia a la guardería, frecuencia de asistencia a la guardería, condición clínica del enrolamiento (si se presentaba como asintomático o con síntoma respiratorio), uso de antibióticos en los últimos tres meses, hospitalización previa en los últimos tres meses y el número de dosis de la PCV13.

Variables

Variable dependiente

Estado de colonización (resultados del cultivo para *S. pneumoniae* y *S. aureus*). Esta variable fue determinada según las pruebas microbiológicas y bioquímicas estándares para identificación de aislamientos de *S. pneumoniae* y *S. aureus*. Es una variable categórica politómica nominal, la escala de medición está categorizada como “No colonizado=0”, “Solo *S. pneumoniae*=1”, “Solo *S. aureus*=2”, “Co-colonizado=3”.

Variable independiente

Haber recibido al menos una dosis de PCV13 (registro de las aplicaciones de la vacuna antineumocócica 13-valente según el carnet de vacunas del paciente). Esta variable original del estudio primario fue determinada por la encuesta aplicada a los padres o cuidadores de los niños, los cuales presentaron el carnet de vacunación de los niños en el momento de la encuesta. Se consideró a todo niño que haya recibido al menos una dosis de la PCV13 si había recibido una dosis de la vacuna por lo menos 14 días previos al enrolamiento y toma de muestra. Es una variable categórica dicotómica nominal, la escala de medición esta categorizada como “No recibió PCV13=0” o Recibió al menos una dosis=1”.

Co-variables

El estudio contó con las siguiente co-variables:

Variable	Definición	Definición operativa	Tipo / Fuente
Otros niños menores de seis años	Niños menores de seis años que habitan en el mismo domicilio	El padre o el cuidador refiere que el niño convive con al menos otro niño <6años en mismo domicilio	Categórica dicotómica / Cuestionario
Atención en guardería	El niño es usuario de guardería para su cuidado en algún momento de la semana	El padre o el cuidador refiere que el niño asiste a una guardería al menos una vez por semana	Categórica dicotómica / Cuestionario
Lactancia Materna exclusiva	El niño recibió lactancia materna exclusiva	El niño ha recibido lactancia materna por lo menos durante los primero seis meses de vida	Categórica dicotómica / Cuestionario
Síntoma respiratorio	Presencia de síntomas de infección respiratoria leve al momento del enrolamiento	Presencia de uno o más de los siguientes síntomas el día del enrolamiento: tos leve, estornudos, rinorrea o fiebre (38,0 – 38,5° C)	Categórica dicotómica / Cuestionario
Uso de antibióticos previo	Uso de antibióticos en los últimos tres meses	Uso de antibióticos en los últimos 3 meses previos a la toma de muestra	Categórica dicotómica / Cuestionario
Hospitalización previa reciente	Hospitalización en los último tres meses	Hospitalización en los últimos 3 meses previos a la toma de muestra	Categórica dicotómica / Cuestionario
Nacimiento prematuro	El niño tuvo nacimiento prematuro	El padre o el cuidador refiere que el niño nació antes de la semana 37 del embarazo	Categórica dicotómica / Cuestionario
Estación de muestreo	Estación del año en que se enroló al participante	Estación del año en que se enroló y tomó la muestra de hisopado nasofaríngeo	Categórica politómica / Cuestionario
Número de dosis	Número de dosis de la PCV13	Número de dosis de la PCV13 según el carnet de vacunas	Categórica politómica / Cuestionario
Serotipo vacunal	Serotipo de <i>S. pneumoniae</i> vacunal	Serotipo de <i>S. pneumoniae</i> determinado por WGS	Categórica dicotómica / Ficha laboratorio

Procedimientos y técnicas

Toma de muestra nasofaríngea

El estudio principal, colectó muestras de hisopados nasofaríngeos los cuales fueron colocados en medio de transporte STGG (leche descremada, tripticasa de soya, glucosa, glicerol) por personal de enfermería en condiciones asépticas y transportadas en hieleras dentro de las siguientes ocho horas al Laboratorio de Infectología Pediátrica (LIP) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (laboratorio central del estudio principal), para su posterior análisis microbiológico por parte de los investigadores principales.

Pruebas microbiológicas

Como parte del estudio principal, los hisopos se colocaron en 3 mL de THY enriquecido (*Todd-Hewitt Broth* con 0,5% de extracto de levadura) (72) e incubados de cuatro a seis horas a 37° C con 5,0% de CO₂. El crecimiento bacteriano se cultivó en Agar sangre (*Trypto-Casein Soy Agar* enriquecido con sangre de carnero 5%) a las mismas condiciones previamente descritas por 24 horas. Los aislamientos de *S. pneumoniae* se identificaron a través de la morfología de la colonia, la presencia de alfa hemólisis, tinción gram, solubilidad en bilis y sensibilidad a la optoquina. Los aislamientos de *S. aureus* se identificaron mediante el crecimiento bacteriano obtenido en THY enriquecido, sembrado en agar Manitol Salado y con las pruebas de coloración Gram, catalasa y coagulasa (73). Se utilizaron como controles las cepas ATCC 25923 y ATCC 43300 para *S. aureus* y D39/NCTC 7466 para *S. pneumoniae*.

Prueba de sensibilidad a los antibióticos

El estudio principal determinó la sensibilidad antibiótica a penicilina y ceftriaxona para *S. pneumoniae* se determinó utilizando el método de concentración mínima inhibitoria (MIC) por medio de la prueba del E-test. La sensibilidad a azitromicina (para *S. pneumoniae*), eritromicina (para *S. aureus*), cefoxitina (para *S. aureus*), sulfametoxazol / trimetoprim y clindamicina, se evaluó mediante la prueba de disco difusión (Kirby Bauer). Las definiciones de sensibilidad (sensible, intermedio, resistente) se determinaron siguiendo los estándares del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) (74).

Serotipificación de *Streptococcus pneumoniae*

El estudio principal determinó la serotipificación de las cepas de *S. pneumoniae* se realizó a través de secuenciamiento de genoma completo (WGS) utilizando la plataforma de *Illumina Hi-Seq* en colaboración con Wellcome Sanger Institute, Streptococcus Lab del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC-Atlanta, Estados Unidos) y el proyecto Global Pneumococcal Sequencing (GPS).

Consideraciones éticas

El protocolo diseñado por el estudio principal fue evaluado por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y registrado en el Sistema Descentralizado de Información y Seguimiento a la Investigación (SIDISI) - Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT) con código 101321. También, el estudio principal obtuvo la aprobación del protocolo

de investigación en cada uno de los centros de salud participante. Además, los investigadores principales en su totalidad se aseguraron de mantener la confidencialidad de la información de cada niño participante.

Durante la realización del estudio principal se cumplieron con los siguientes aspectos éticos:

- Del individuo y papel de los investigadores: Los investigadores afirmaron conocer las implicancias éticas en la concepción y desarrollo del estudio, como se mencionan seguidamente.
- Del diseño: No se realizaron ninguna intervención que altere el estado de salud del niño.
- Ética colectiva e individual: Las personas y la comunidad no se exponían a riesgos que puedan afectar su salud.
- Riesgos: Mínimo (dolor leve y/o incomodidad al momento del hisopado, raramente mínima excoiación de la mucosa). Se minimizó al máximo este riesgo contando con un personal entrenado para la toma de muestra y usando un hisopo muy delgado y de material apropiado
- Inconveniencias para los participantes: Incomodidad al momento del hisopado y de los padres de familia al momento de responder las preguntas.
- Consentimiento informado: Los familiares fueron informados del estudio y se les invitó a firmar el consentimiento informado. Al ser éste, un estudio con riesgos mínimos y como no pertenece a la categoría de ensayo clínico, solamente se solicitó la firma de la madre o del padre o del apoderado.

Esta tesis realizó un análisis de datos secundarios, por lo que no se realizó algún contacto con los participantes. En este sentido, el riesgo que puede enfrentar el participante es mínimo y principalmente relacionado con una brecha en la confidencialidad. Los investigadores principales cedieron la base de datos para realizar este análisis secundario y el cual contó con un protocolo que se registró en el Sistema Descentralizado de Información y Seguimiento a la Investigación (SIDISI) - Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT) con código 206782, y fue evaluado por el Comité de Ética de la UPCH (CIE-UPCH) previamente a su ejecución. Durante la implementación del estudio se respetaron los principios éticos delineados en la Declaración de Helsinki, y se siguieron estrictamente las recomendaciones realizadas por el CIE-UPCH.

Cálculo de potencia estadística

En una exploración previa de la base de datos proporcionada por el estudio principal, se determinó que 750 niños que habían recibido al menos una dosis de la PCV13 y 89 que no habían recibido dosis. Con estos datos, se consideró realizar el cálculo de potencia estadística para cada una de las categorías de la variable dependiente:

Colonizados por *Streptococcus pneumoniae*

Considerando que el estudio principal reportó 89 niños que no habían recibido la PCV13 (con un 6.7% de colonización por *S. pneumoniae* en este grupo), 750 niños que habían recibido al menos una dosis de la PCV13 y 156 niños colonizados por *S. pneumoniae* (17,4%); y asumiendo que hubo una disminución

de 16,1% en la frecuencia de colonización por *S. pneumoniae* luego de la introducción de la PCV7 (48,75), se obtuvo una potencia estadística de 0,94 (94%) con un $p < 0.05$.

Colonizados por *Staphylococcus aureus*

Considerando que el estudio principal reportó 89 niños que no habían recibido la PCV13 (con un 34.8% de colonización por *S. aureus* en este grupo), 750 niños que habían recibido al menos una dosis de la PCV13 y 150 niños colonizados por *S. aureus* (16,8%); y asumiendo que hubo un aumento de 9,0% en la frecuencia de colonización por *S. aureus* luego de la introducción de la PCV7 (22), se obtuvo una potencia estadística de 0,73 (73%) con un $p < 0.05$.

Co-colonizados

Considerando que el estudio principal reportó 89 niños que no habían recibido la PCV13 (con un 2.9% de co-colonización en este grupo), 750 niños que habían recibido al menos una dosis de la PCV13 y 26 niños colonizados co-colonización por *S. pneumoniae* y *S. aureus* (2,9%); y asumiendo que hubo un aumento de 11,2% en la frecuencia de co-colonización por *S. pneumoniae* y *S. aureus* luego de la introducción de la PCV7 (11,49), se obtuvo una potencia estadística de 0,90 (90%) con un $p < 0.05$.

Análisis estadístico

Los datos demográficos, clínicos y de laboratorio fueron digitalizados por el estudio principal en una base de datos. Las hojas de datos de los niños fueron

resguardas en la oficina del laboratorio principal del estudio. Además, todo el equipo de investigación se preocupó por preservar la privacidad de la información de cada niño.

Esta tesis construyó una base de datos que contiene información clínica, demográfica y de laboratorio sobre los participantes del estudio principal. Se describieron las características demográficas y clínicas de los niños estudiados según las variables propuestas y registradas en la ficha de recolección de datos. Posteriormente, los resultados se presentaron en tablas y gráficos. Además, se determinaron las frecuencias de inmunización con PCV13, la colonización por *S. pneumoniae*, *S. aureus* y co-colonización nasofaríngea entre ambos patógenos y de otras co-variables en los niños en estudio utilizando intervalos de confianza al 95%. Se realizaron análisis bivariados para determinar las asociaciones entre la variable dependiente (estado de colonización), la variable independientes y co-variables de interés utilizando pruebas paramétricas y no paramétricas como χ^2 , la prueba exacta de Fisher, ANOVA y Kruskal-Wallis.

Se realizaron regresiones multinomiales para determinar las asociaciones con el estado de colonización de *S. pneumoniae*, *S. aureus*, y co-colonizados. Adicionalmente, se realizó regresión de Poisson con varianzas robustas para explorar la asociación entre los niños colonizados por *S. pneumoniae* y *S. aureus*.

En el análisis multivariado se incluyeron solo los 839 participantes que tuvieron información sobre la vacunación con la PCV13. Asimismo, las co-variables según fueron identificadas en la literatura y por la experiencia clínica de estudios anteriores que resultaron con significancia estadística en nuestros análisis

bivariados, identificadas en el DAG. Se consideró como grupo comparador a la categoría “No colonizado”. La medida de asociación fue Razón de prevalencia (RP) debido al diseño del estudio. Todas las pruebas estadísticas fueron de dos colas y se utilizó el programa Stata/SE versión 17.0 (StataCorp LP, College Station, TX, USA) considerando un nivel de significancia estadística de 0,05.

Se realizó el análisis de sensibilidad para determinar si el cambio de grupo comparador en la variable dependiente (estado de colonización) y el número de dosis de la PCV13 generaba un cambio en los estimados de asociación (Tabla 7, Anexo 4 - 5).

III. RESULTADOS

Características demográficas y clínicas de los participantes

Como parte del estudio principal se enrolaron un total de 1000 niños menores de dos años (24 meses), de los cuales solo 894 niños fueron incluidos en este análisis secundario al brindar su consentimiento para utilizar sus datos y muestras colectadas para estudios futuros. Se incluyeron en este análisis entre 167 a 191 niños por cada hospital participante en el estudio. La media de la edad fue de 11,1 meses (D.E: 6,4), aproximadamente el 51,3% fueron mujeres y el 94,0% no asistían a guarderías, el 60,4% de los niños vivía con otros niños <6 años de edad en el mismo hogar, el 38,2% fue enrolado y muestreado en verano, así como el 18,7% fue enrolado y muestreado en invierno. La mediana de la duración de la lactancia materna exclusiva fue de cuatro meses (RIC: 0 - 6), la cual fue completada (al menos 6 meses de alimentación exclusiva con leche materna) por 37,2% de los niños enrolados. (Tabla 1).

Tabla 1. Características sociodemográficas de los niños participantes del estudio realizado en cinco hospitales de Lima entre los años 2018 y 2019 (N=894) ^a

Características	n (%)
Sexo	
Femenino	458 (51,3)
Masculino	435 (48,7)
Edad (meses) ^b	11,1 ± 6,4
Edad (meses) ^c	11 (5 – 16)
Hospital	
H. Daniel A. Carrión	191 (21,4)
H. Cayetano Heredia	179 (20,0)
H. San Bartolomé	167 (18,7)
I. N. Salud del niño	180 (20,1)
H. N. Rebagliati	177 (19,8)
Lactancia materna (meses) ^b	9,39 ± 6,10
Lactancia materna exclusiva (meses) ^c	4 (0 - 6)
Completó lactancia materna exclusiva	
No	555 (62,8)
Si	329 (37,2)
Asistencia a guardería	
No	834 (94,0)
Si	53 (6,0)
Vive con otros niños (<6 años) en casa	
No	531 (60,4)
Si	348 (39,6)
Estación de toma de muestra	
Verano	342 (38,2)
Otoño	244 (27,3)
Invierno	167 (18,7)
Primavera	141 (15,8)

^a Algunos variables pueden sumar menos de 894 por datos faltantes.

^b Media ± desviación estándar.

^c Mediana (RIC o Rango intercuartílico).

Por otra parte, 20,9% había tenido un nacimiento pretérmino, el 36,3% (n=322) de los niños presentaron al menos un síntoma respiratorio, siendo la rinorrea, la más frecuente (67,3%) y fiebre entre 38,0 a 38,5 °C la menos frecuente (7,5%). 27,8% había recibido antibióticos y 6,4% estuvo hospitalizados dentro de los tres meses previos a la toma de muestra. Con respecto a los patrones de

vacunación con la PCV13, el 89,4% de los niños habían recibido al menos una dosis. De los cuales, el 36,0% había recibido tres dosis de la PCV13.

Tabla 2. Características clínicas de los niños participantes del estudio realizado en cinco hospitales de Lima entre los años 2018 y 2019 (N=894) ^a

Características	n (%)
Recibió al menos una dosis de PCV13	
No recibió PCV13	89 (10,6)
Recibió al menos una dosis	750 (89,4)
Estado de colonización	
No colonizado	562 (62,9)
Solo por <i>S. pneumoniae</i>	156 (17,4)
Solo por <i>S. aureus</i>	150 (16,8)
Co-colonizado	26 (2,9)
Prematuro	
No	688 (79,1)
Si	182 (20,9)
Síntoma respiratorio	
No	566 (63,7)
Si	322 (36,3)
Tos leve	
No	189 (58,9)
Si	132 (41,1)
Estornudo	
No	192 (59,8)
Si	129 (40,2)
Rinorrea	
No	105 (32,7)
Si	216 (67,3)
Fiebre (38,0 - 38,5°C)	
No	297 (92,5)
Si	24 (7,5)
Uso de antibióticos previo (<3 meses)	
No	643 (72,2)
Si	247 (27,8)
Hospitalización previa (<3 meses)	
No	835 (93,6)
Si	57 (6,4)
Número de dosis de la PCV13	
No recibió PCV13	89 (10,7)
1 dosis	122 (14,7)

2 dosis	321 (38,6)
3 dosis	300 (36,0)

^a Algunos variables pueden sumar menos de 894 por datos faltantes.

Asimismo, se obtuvieron aislamientos de *S. pneumoniae* y *S. aureus* en 156 (17,4%) y 150 (16,8%) de los participantes, mientras que 26 (2,9%) se encontraron co-colonizados por ambas bacterias (Figura 2). De los 26 niños co-colonizados, 21 presentaron aislamientos de *S. pneumoniae* con serotipos no cubierto por la PCV13 (no vacunal) (Tabla 3). No se encontraron diferencias significativas en la distribución de las frecuencias de la co-colonización bacteriana en los hospitales (p=0.224; Figura 3).

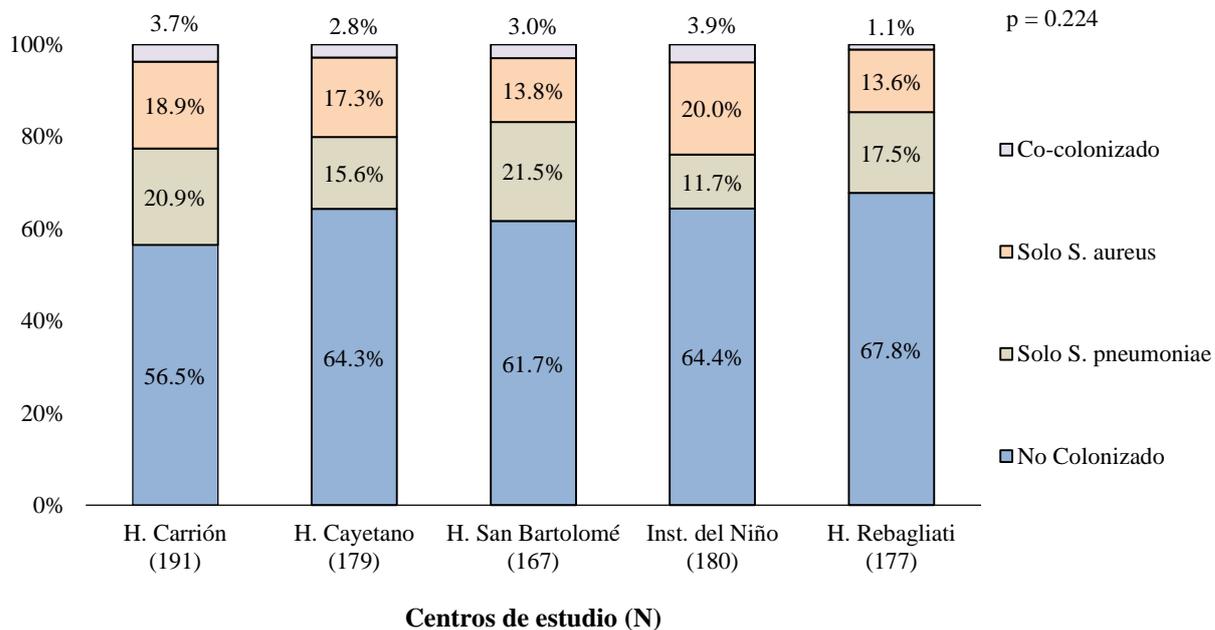


Figura 3. Distribución del estado de colonización en los hospitales participantes

Tabla 3. Distribución de serotipos de neumococo en los niños colonizados solo *S. pneumoniae* y co-colonizados (N=181)

Serotipo	Estado de colonización	
	Solo <i>S. pneumoniae</i>	Co-colonizado
	N=155 n (%)	N=26 n (%)
Serotipos no vacunales [147 (81,2%)]		
15C	16 (10,3)	4 (15,4)
6C	14 (9,0)	2 (7,7)
15B	12 (7,7)	1 (3,9)
23A	12 (7,7)	2 (7,7)
11A	9 (5,8)	0
15A	10 (6,6)	1 (3,9)
16F	8 (5,2)	1 (3,9)
23B	6 (3,9)	1 (3,9)
35B	5 (3,2)	0
10A	4 (2,6)	2 (7,7)
34	4 (2,6)	1 (3,9)
13	3 (1,9)	1 (3,9)
24F	3 (1,9)	1 (3,9)
38	3 (1,9)	1 (3,9)
35F	2 (1,3)	0
7C	1 (0,7)	0
15A/15B	1 (0,7)	0
31	1 (0,7)	0
33F	1 (0,7)	0
35A	1 (0,7)	0
19B	0	1 (3,9)
39	0	1 (3,9)
Serogrupo 6 ^a	1 (0,7)	0
NT ^b	10 (6,6)	1 (3,9)
Serotipos vacunales [34 (18,8%)]		
19A	15 (9,7)	4 (15,4)
19F	3 (1,9)	1 (3,9)
6A	3 (1,9)	0
6B	3 (1,9)	0
3	2 (1,3)	0
23F	2 (1,3)	0
9V	1 (0,7)	0

^a Serogrupo que incluye serotipos vacunales y no vacunales.

^b NT: Serotipo no tipificable por WGS.

No se pudo recuperar un aislamiento de *S. pneumoniae* para la serotipificación.

De las características sociodemográficas evaluadas, completar la lactancia materna exclusiva de seis meses y vivir con otros niños <6 años de edad se encontró asociada al estado de colonización nasofaríngea (Tabla 4). Por otro lado, de las características clínicas evaluadas, presentar por lo menos un síntoma respiratorio, el número de dosis de la PCV13 y haber recibido al menos una dosis de la PCV13 se encontró asociada al estado de colonización nasofaríngea (Tabla 4).

Tabla 4. Características de los niños participantes del estudio realizado en cinco hospitales de Lima entre los años 2018 y 2019 (N=894) ^a

Características	Estado de colonización				p
	No colonizado N=562 n (%)	Solo <i>S. pneumoniae</i> N=156 n (%)	Solo <i>S. aureus</i> N=150 n (%)	Co-colonizado N=26 n (%)	
Recibió al menos una dosis de PCV13					<0.001
No recibió PCV13	50 (9,5)	6 (4,1)	31 (22,0)	2 (8,3)	
Recibió al menos una dosis	479 (90,6)	139 (95,9)	110 (78,0)	22 (91,7)	
Número de dosis de la PCV13					<0.001
No recibió PCV13	50 (9,5)	6 (4,1)	31 (22,6)	2 (8,3)	
1 dosis	71 (13,5)	21 (14,5)	25 (18,3)	5 (20,8)	
2 dosis	205 (39,0)	71 (49,0)	38 (27,7)	7 (29,2)	
3 dosis	200 (38,0)	47 (32,4)	43 (31,4)	10 (41,7)	
Sexo					0.153
Femenino	295 (52,6)	82 (52,6)	73 (48,7)	8 (30,8)	
Masculino	266 (47,4)	74 (47,4)	77 (51,3)	18 (69,2)	
Edad (meses) ^b	11,3 ± 6,3	11,6 ± 6,0	9,9 ± 7,0	11 ± 6,7	0.089
Lactancia materna exclusiva completa					0.001
No	338 (61,0)	87 (56,1)	114 (76,5)	16 (61,5)	
Si	216 (39,0)	68 (43,9)	35 (23,5)	10 (38,5)	

Lactancia materna (meses) ^c	8,0 (5 - 14)	9,5 (5 - 14)	6,0 (3 - 13)	7,5 (4 - 15)	0.059
Asistencia a guardería					0.977
No	523 (93,9)	147 (94,2)	140 (94,0)	24 (96,0)	
Si	34 (6,1)	9 (5,8)	9 (6,0)	1 (4,0)	
Vive con otros niños en casa					0.002
No	359 (64,8)	73 (48,3)	85 (57,4)	14 (53,9)	
Si	195 (35,2)	78 (51,7)	63 (42,6)	12 (46,2)	
Estación de toma de muestra					0.773
Verano	209 (37,2)	64 (41,0)	58 (38,7)	11 (42,3)	
Otoño	151 (26,9)	46 (29,5)	39 (26,0)	8 (30,8)	
Invierno	107 (19,0)	29 (18,6)	26 (17,3)	5 (19,2)	
Primavera	95 (16,9)	17 (10,9)	27 (18,0)	2 (7,7)	
Prematuro					0.189
No	425 (78,0)	125 (82,8)	114 (77,0)	24 (92,3)	
Si	120 (22,0)	26 (17,2)	34 (23,0)	2 (7,7)	
Uso de antibióticos previo					0.205
No	392 (70,1)	115 (74,2)	114 (76,0)	22 (84,6)	
Si	167 (29,9)	40 (25,8)	36 (24,0)	4 (15,4)	
Hospitalización previa					0.162
No	519 (92,7)	152 (97,4)	139 (92,7)	25 (96,2)	
Si	41 (7,3)	4 (2,6)	11 (7,3)	1 (3,9)	
Síntoma respiratorio					<0.001
No	369 (66,1)	76 (49,4)	105 (70,0)	16 (61,5)	
Si	189 (33,9)	78 (50,7)	45 (30,0)	10 (38,5)	
Serotipo PCV13 vacunal					0.962
No vacunal	-	125 (81,2)	-	21 (80,8)	
Vacunal	-	29 (18,8)	-	5 (19,2)	

^a Algunas variables pueden sumar menos de 894 por datos faltantes.

^b Media \pm desviación estándar.

^c Mediana (RIC)

Factores asociados a la co-colonización por *S. pneumoniae* y *S. aureus*

Utilizando regresión logística multinomial, no se encontró asociación significativa entre la co-colonización por *S. pneumoniae* y *S. aureus* y la

inmunización con la PCV13 ($p=0.854$) u otras de las covariables evaluadas a excepción de sexo en el cual la prevalencia de estar co-colonizado es 2,50 (IC95%: 1,07 - 5,83; $p=0.035$) veces en varones que en mujeres (Tabla 5).

Por otro lado, la prevalencia de estar colonizado solo por *S. pneumoniae* fue 2,00 (IC95%: 1,40 - 2,88; $p<0,001$) y 1,97 (IC95%: 1,37 - 2,83; $p<0.001$) veces en los que presentaron síntoma respiratorio y los que vivían con otros niños en casa, respectivamente. Escenario distinto en la prevalencia de estar colonizado solo por *S. pneumoniae* que fue 0,33 (IC95%: 0,12 - 0,94; $p=0.039$) veces en quienes estuvieron hospitalizados previamente que en los que no lo estuvieron. Además, estos niños presentaron 2,89 (IC95%: 1,19 - 7,02; $p=0.028$) veces la prevalencia de portar solo *S. pneumoniae* en quienes tenían dos dosis de la PCV13 que en los que no habían recibido al menos una dosis de PCV13. Del mismo modo, los niños presentaron 2,42 (IC95%: 1,02 - 5,76; $p=0.046$) veces la prevalencia de portar solo *S. pneumoniae* en quienes tenían al menos una dosis de la PCV13 que en los que no habían recibido PCV13 (Tabla 5).

En la categoría de colonizados solo por *S. aureus* encontramos que, por cada incremento de un mes en la edad, la prevalencia de estar colonizado solo por *S. aureus* es 0,96 (IC95%: 0,94 - 0,99; $p=0.015$) veces. También, los niños colonizados solo por *S. aureus* fue 0,48 (IC95%: 0,32 - 0,73; $p=0.001$) veces en quienes completaron la lactancia materna exclusiva que en los que no la completaban. Del mismo modo, por cada incremento de un mes en la duración de la lactancia materna, la prevalencia de estar colonizado solo por *S. aureus* es 0,96 (IC95%: 0,93 - 0,99; $p=0.009$) veces menor. Adicionalmente, estos niños

presentaban 0,30 (IC95%: 0,17 - 0,53; $p < 0.001$) y 0,35 (IC95%: 0,20 - 0,60; $p < 0.001$) veces la prevalencia de portar solo *S. aureus* en quienes habían recibido dos y tres dosis de la PCV13 en contraste con los que no habían recibido PCV13. En el caso de los que habían recibido al menos una dosis de la PCV13, la prevalencia de estar colonizado solo por *S. aureus* fue 0,37 (IC95%: 0,23 - 0,61; $p < 0.001$) veces que en los que no habían recibido PCV13 (Tabla 5).

Adicionalmente, aquellos niños colonizados por *S. pneumoniae*, presentaron RP:0,68 (IC95%: 0,46 - 0,99; $p = 0.047$) de estar colonizado por *S. aureus*, sugiriendo una asociación inversa entre ambas bacterias comensales. Al estratificar por serotipos cubiertos por la PCV13, similar tendencia fue encontrada con serotipos no vacunales (RP: 0,69; IC95%: 0,44 - 1,06; $p = 0.087$). Sin embargo, no se encontró asociación con serotipos vacunales (RP: 0,70; IC95%: 0,28 - 1,79; $p = 0.461$).

Tabla 5. Factores asociados entre la PCV13 y la co-colonización por *S. pneumoniae* y *S. aureus* en el análisis bivariado.

Características	Estado de colonización								
	Solo <i>S. pneumoniae</i>			Solo <i>S. aureus</i>			Co-colonizado		
	RP	IC 95%	p	RP	IC 95%	p	RP	IC 95%	p
Recibió al menos una dosis de PCV13									
No recibió PCV13	Ref.			Ref.			Ref.		
Recibió al menos una dosis	2,42	1,02 - 5,76	0,046	0,37	0,23 - 0,61	<0,001	1,15	0,26 - 5,03	0,854
Número de dosis de la PCV13									
No recibió PCV13	Ref.			Ref.			Ref.		
1 dosis	2,46	0,93 - 6,55	0,070	0,57	0,30 - 1,08	0,083	1,76	0,33 - 9,44	0,509
2 dosis	2,89	1,19 - 7,02	0,019	0,30	0,17 - 0,53	<0,001	0,85	0,17 - 4,23	0,846
3 dosis	1,96	0,79 - 4,84	0,145	0,35	0,20 - 0,60	<0,001	1,25	0,27 - 5,89	0,778
Sexo									
Femenino	Ref.			Ref.			Ref.		
Masculino	1,00	0,70 - 1,42	0,996	1,17	0,82 - 1,68	0,394	2,50	1,07 - 5,83	0,035
Edad (meses)	1,00	0,98 - 1,03	0,820	0,96	0,94 - 0,99	0,015	0,99	0,93 - 1,06	0,803
Lactancia materna exclusiva completa									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	1,22	0,85 - 1,75	0,273	0,48	0,32 - 0,73	0,001	0,98	0,44 - 2,19	0,957
Duración de lactancia materna (meses)	1,00	0,97 - 1,03	0,969	0,96	0,93 - 0,99	0,009	0,98	0,92 - 1,05	0,641
Síntoma respiratorio									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	2,00	1,40 - 2,88	<0,001	0,84	0,57 - 1,23	0,371	1,22	0,54 - 2,74	0,630
Asistencia a guardería									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	0,94	0,44 - 2,00	0,877	0,99	0,46 - 2,11	0,977	0,64	0,08 - 4,88	0,668

Vive con otros niños (<6 años) en casa									
No	Ref.				Ref.			Ref.	
Si	1,97	1,37 - 2,83	<0.001		1,36	0,94 - 1,97	0.099	1,58	0,72 - 3,48 0.258
Estación de toma de muestra									
Verano	Ref.				Ref.			Ref.	
Otoño	0,99	0,65 - 1,53	0.981		0,93	0,59 - 1,47	0.758	1,01	0,40 - 2,56 0.989
Invierno	0,89	0,54 - 1,45	0.630		0,88	0,52 - 1,47	0.615	0,89	0,30 - 2,62 0.829
Primavera	0,58	0,32 - 1,05	0.073		1,02	0,61 - 1,72	0.928	0,40	0,09 - 1,84 0.239
Prematuro									
No	Ref.				Ref.			Ref.	
Si	0,74	0,46 - 1,18	0.201		1,06	0,68 - 1,63	0.804	0,30	0,07 - 1,27 0.101
Uso de antibióticos previo (<3 meses)									
No	Ref.				Ref.			Ref.	
Si	0,82	0,55 - 1,22	0.324		0,74	0,49 - 1,12	0.159	0,43	0,14 - 1,26 0.123
Hospitalización previa (<3 meses)									
No	Ref.				Ref.			Ref.	
Si	0,33	0,12 - 0,94	0.039		1,00	0,50 - 2,00	0.996	0,51	0,07 - 3,83 0.510
Serotipo PCV13 vacunal									
No vacunal	-				-			Ref.	
Vacunal	-	-	-		-	-	-	1,03	0,36 - 2,95 0.962

Análisis bivariado utilizando Regresión logística multinomial. RP: Razón de prevalencias. IC 95%: Intervalo de confianza al 95%.

Ref: Categoría de referencia. -: Categoría sin observaciones.

Todas las comparaciones fueron realizadas con el grupo "No colonizado" excepto la variable "Serotipo PCV13 vacunal" fue comparada con el grupo "Estado de colonización por *S. pneumoniae*"

El análisis multivariado se realizó excluyendo 55 participantes (6%) que no presentaban información sobre la vacunación con la PCV13. Los estados de colonización no se vieron asociados a la presencia o ausencia de información de vacunación con la PCV13 (Participantes con información de vacunación con la PCV13: no colonizados [529; 94%], solo Spn [145; 93%], solo Sa [141; 94%] y co-colonizados [24; 92%]; $p=0.939$).

En el modelo multivariado, se incluyó a las variables sexo, edad (en meses), lactancia materna exclusiva completa, síntoma respiratorio, asistencia a guardería, vivir con otros niños en casa, estación de toma de muestra, uso de antibióticos previo, hospitalización previa e inmunización con al menos una dosis de PCV13 como variables de ajuste (de acuerdo con el DAG propuesto) y se excluyó la variable número de dosis de la vacuna por ser otra categorización de la principal variable de exposición (PCV13).

En resumen, las asociaciones estadísticamente significativas con el estado de colonización ($p<0.05$) se mantuvieron en:

En los niños colonizados solo por *S. pneumoniae*, presentar síntoma respiratorio (RPa: 1,96; IC95%: 1,31 - 2,93), vivir con otros niños (Rpa: 2,01; IC95%: 1,36 - 3,00), hospitalización previa (Rpa: 0,29; IC95%: 0,09 - 1,00) y haber recibido al menos una dosis de la PCV13 (Rpa: 3,09; IC95%: 1,20 - 7,97) (Tabla 6).

En los niños colonizados solo por *S. aureus*, completar lactancia materna exclusiva (Rpa: 0,59; IC95%: 0,37 - 0,95) y haber recibido al menos una dosis de la PCV13 (Rpa: 0,48; IC95%: 0,26 - 0,87) (Tabla 6).

Asimismo, se comparó los estimados de asociación entre los modelos que incluyeron como principal exposición el número de dosis de la PCV13 (Tabla 7) y el modelo incluyendo haber recibido al menos una dosis de PCV13 con al menos una dosis de la PCV13 (Tabla 6), en el cual evidenciamos que: comparando ambos modelos de regresión, los estimados de asociación a la colonización solo por *S. pneumoniae* no se modifican considerablemente (1 dosis [Rpa: 2,66; IC95%: 0,96 - 7,37], 2 dosis [Rpa: 2,97; IC95%: 1,08 - 8,16] o 3 dosis [Rpa: 1,75; IC95%: 0,46 - 6,62] y al menos una dosis [Rpa: 3,09; IC95%: 1,20 - 7,97]). Lo mismo ocurre con los colonizados solo por *S. aureus* (1 dosis [Rpa: 0,58; IC95%: 0,29 - 1,14], 2 dosis [Rpa: 0,32; IC95%: 0,15 - 0,66] o 3 dosis [Rpa: 0,29; IC95%: 0,10 - 0,91] y al menos una dosis [Rpa: 0,48; IC95%: 0,26 - 0,87]) y con los co-colonizados (1 dosis [Rpa: 2,83; IC95%: 0,49 - 16,19], 2 dosis [Rpa: 1,64; IC95%: 0,25 - 10,76] o 3 dosis [Rpa: 4,21; IC95%: 0,28 - 64,04] y al menos una dosis [Rpa: 1,85; IC95%: 0,35 - 9,67]) entre ambos modelos respectivamente.

Tabla 6. Factores asociados entre la PCV13 y colonización por *S. pneumoniae*, *S. aureus* y co-colonización en el análisis múltiple.

Características	Estado de colonización								
	Solo <i>S. pneumoniae</i>			Solo <i>S. aureus</i>			Co-colonizado		
	Rpa	IC 95%	p	Rpa	IC 95%	p	Rpa	IC 95%	p
Recibió al menos una dosis de PCV13									
No recibió PCV13	Ref.			Ref.			Ref.		
Recibió al menos una dosis	3,09	1,20 - 7,97	0.019	0,48	0,26 - 0,87	0.016	1,85	0,35 - 9,67	0.466
Sexo									
Femenino	Ref.			Ref.			Ref.		
Masculino	1,03	0,70 - 1,52	0.806	1,08	0,73 - 1,59	0.697	2,40	0,96 - 6,01	0.060
Edad (meses)	0,98	0,95 - 1,02	0.364	1,00	0,97 - 1,04	0.810	0,98	0,90 - 1,06	0.600
Lactancia materna exclusiva completa									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	1,22	0,80 - 1,86	0.369	0,59	0,37 - 0,95	0.029	0,96	0,37 - 2,53	0.939
Síntoma respiratorio									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	1,96	1,31 - 2,93	0.001	0,83	0,54 - 1,27	0.394	1,36	0,56 - 3,31	0.499
Asistencia a guardería									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	0,51	0,19 - 1,40	0.188	0,99	0,41 - 2,39	0.975	0,69	0,08 - 5,66	0.726
Vive con otros niños (<6 años) en casa									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	2,01	1,36 - 3,00	<0.001	1,35	0,91 - 1,99	0.134	1,50	0,63 - 3,53	0.358
Estación de toma de muestra									
Verano	Ref.			Ref.			Ref.		

Otoño	0,89	0,54 – 1,44	0.626	0,99	0,61 – 1,61	0.977	0,92	0,34 – 2,49	0.876
Invierno	0,77	0,45 – 1,32	0.348	1,03	0,59 – 1,80	0.907	0,74	0,22 – 2,49	0.629
Primavera	0,58	0.31 – 1,11	0.101	1,05	0,60 – 1,84	0.860	0,23	0,03 – 1,81	0.162
Uso de antibióticos previo (<3 meses)									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	0,64	0,40 - 1,02	0.061	0,83	0,52 - 1,32	0.432	0,43	0,12 - 1,50	0.183
Hospitalización previa (<3 meses)									
No	Ref.			Ref.			-		
Si	0,29	0,09 - 1,00	0.051	0,76	0,34 - 1,70	0.500	-	-	-

Análisis multivariado utilizando Regresión multinomial ajustado por sexo, edad (meses), lactancia materna exclusiva completa, síntoma respiratorio, asistencia a guardería, estación de toma de muestra, uso de antibióticos previo, hospitalización previa y haber recibido al menos una dosis de PCV13.

Rpa: Razón de prevalencias ajustada. IC 95%: Intervalo de confianza al 95%. Ref: Categoría de referencia.

-: Categoría sin observaciones. Todas las comparaciones fueron realizadas con el grupo "No colonizado"

Tabla 7. Factores asociados entre el número de dosis de la PCV13 y colonización por *S. pneumoniae*, *S. aureus* y co-colonización en el análisis múltiple.

Características	Estado de colonización								
	Solo <i>S. pneumoniae</i>			Solo <i>S. aureus</i>			Co-colonizado		
	Rpa	IC 95%	p	Rpa	IC 95%	p	Rpa	IC 95%	p
Número de dosis de la PCV13									
No recibió PCV13	Ref.			Ref.			Ref.		
1 dosis	2,66	0,96 - 7,37	0.060	0,58	0,29 - 1,14	0.112	2,83	0,49 - 16,19	0.243
2 dosis	2,97	1,08 - 8,16	0.035	0,32	0,15 - 0,66	0.002	1,64	0,25 - 10,76	0.604
3 dosis	1,75	0,46 - 6,62	0.409	0,29	0,10 - 0,91	0.033	4,21	0,28 - 64,04	0.301
Sexo									
Femenino	Ref.			Ref.			Ref.		
Masculino	1,03	0,69 - 1,52	0.898	0,98	0,66 - 1,44	0.902	2,29	0,91 - 5,75	0.077
Edad (meses)	1,01	0,95 - 1,08	0.671	1,03	0,97 - 1,10	0.318	0,93	0,81 - 1,08	0.373
Lactancia materna exclusiva completa									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	1,15	0,75 - 1,78	0.526	0,59	0,36 - 0,97	0.036	1,09	0,40 - 3,03	0.862
Síntoma respiratorio									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	1,99	1,33 - 3,00	0.001	0,84	0,55 - 1,30	0.437	1,31	0,53 - 3,21	0.557
Asistencia a guardería									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	0,54	0,20 - 1,48	0.228	0,98	0,40 - 2,40	0.970	0,61	0,07 - 5,07	0.645

Vive con otros niños (<6 años) en casa									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	2,05	1,38 - 3,04	<0.001	1,30	0,87 - 1,93	0.203	1,52	0,64 - 3,61	0.340
Estación de toma de muestra									
Verano	Ref.			Ref.			Ref.		
Otoño	0,91	0,56 - 1,49	0.715	0,95	0,58 - 1,56	0.849	0,90	0,33 - 2,44	0.840
Invierno	0,77	0,45 - 1,33	0.353	0,92	0,52 - 1,63	0.769	0,74	0,22 - 2,50	0.629
Primavera	0,61	0,32 - 1,16	0.134	0,97	0,55 - 1,72	0.919	0,23	0,03 - 1,82	0.163
Uso de antibióticos previo (<3 meses)									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	0,63	0,39 - 1,02	0.058	0,86	0,54 - 1,37	0.524	0,43	0,12 - 1,50	0.183
Hospitalización previa (<3 meses)									
No	Ref.			Ref.			-		
Si	0,29	0,09 - 1,02	0.053	0,62	0,27 - 1,44	0.264	-	-	-

Análisis multivariado utilizando Regresión multinomial ajustado por sexo, edad (meses), lactancia materna exclusiva completa, síntoma respiratorio, asistencia a guardería, vive con otros niños en casa, estación de toma de muestra, uso de antibióticos previo, hospitalización previa y número de dosis de la PCV13.

Rpa: Razón de prevalencias ajustado

Patrones de susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos de co-colonizados por *S. pneumoniae* y *S. aureus*

Al evaluar los patrones de resistencia de ambas bacterias que colonizaban a un mismo niño en el mismo momento, evidenciamos que el fenotipo resistente para ambos aislamientos solo se presentó con penicilina y macrólidos (azitromicina para aislamientos de *S. pneumoniae* y eritromicina para aislamientos *S. aureus*), representando el 11,5% y 26,9% respectivamente. No se determinaron bacterias con el mismo patrón de resistencia en los co-colonizados al evaluar clindamicina, trimetoprima/sulfametoxazol y cefalosporinas de 3era generación (ceftriaxona para aislamientos de *S. pneumoniae* y cefoxitina para aislamientos *S. aureus*) (Tabla 8).

Tabla 8. Patrones de susceptibilidad de los aislamientos en niños co-colonización por *S. pneumoniae* y *S. aureus*.

Antibiótico	Aislamientos con fenotipo resistente				
	Solo <i>S. pneumoniae</i> N=156 n (%)	Solo <i>S. aureus</i> N=150 n (%)	Co-colonizados N=26		Co-colonizados ambos resistentes N=26 n (%)
			<i>S. pneumoniae</i> n (%)	<i>S. aureus</i> n (%)	
Penicilina	10 (6,4)	133 (89,3)	3 (11,5)	25 (96,2)	3 (11,5)
Macrólidos	75 (48,1)	49 (32,9)	14 (53,9)	11 (42,3)	7 (26,9)
TMP/SMX	116 (74,4)	0	20 (76,9)	0	0
Clindamicina	41 (26,3)	2 (1,3)	11 (42,3)	0	0
Cefalosporinas 3era gen.	0	2 (1,3)	0	1 (3,9)	0

Macrólidos: azitromicina evaluada para aislamientos de *S. pneumoniae* y eritromicina testada para aislamientos *S. aureus*.

TMP/SMX: Trimetoprima/sulfametoxazol.

Cefalosporinas 3era generación: Ceftriaxona para aislamientos de *S. pneumoniae* y cefoxitina para aislamientos *S. aureus*.

Todos los antibióticos fueron testados mediante el método de Kirby Bauer a excepción de ceftriaxona y penicilina, los cuales fueron testados mediante el método de concentración mínima inhibitoria (MIC).

De los 26 aislamientos provenientes de co-colonizados analizados, 7 fueron de H. Nacional Daniel Alcides Carrión e Instituto de Salud del Niño, 5 fueron de H. Nacional Cayetano Heredia y H. Docente Madre-Niño San Bartolomé y 2 del H. Nacional Edgardo Rebagliati Martins. Los datos presentados en esta tabla no son generalizables a los hospitales participantes en conjunto.

IV. DISCUSIÓN

Hallazgos generales

El presente estudio determinó una frecuencia de colonización solo por *S. pneumoniae* de 17,4%; colonizados solo por *S. aureus* de 16,8% y de co-colonización por ambas bacterias de 2,9%.

La presentar síntoma respiratorio [RPa: 1,96 (IC95%: 1,31 - 2,93; p=0.001)] y vivir con otros niños en casa [RPa: 2,01 (IC95%: 1,36 - 3,00; p<0.001)] se encontró asociada al aumento en la prevalencia de la colonización solo por *S. pneumoniae*. Haber estado hospitalizado dentro de los últimos 3 meses [RPa: 0,29 (IC95%: 0,09 - 1,00; p=0.051)] mostró una tendencia a la disminución en la prevalencia de la colonización solo por *S. pneumoniae*.

Con respecto a los niños colonizados solo por *S. aureus*, completar con la lactancia materna exclusiva de 6 meses [RPa: 0,59 (IC95%: 0,37 - 0,95; p=0.029)] y haber recibido al menos una dosis de la PCV13 [RPa: 0,48 (IC95%: 0,26 - 0,87; p=0.016)] se encontraron asociadas con la reducción de la colonización solo por este patógeno.

Por otro lado, los aislamientos provenientes de los niños co-colonizados presentaron el mismo fenotipo resistente a penicilina y macrólidos en el 69,2% (18/26) y 26,9% (7/26) de los casos.

Finalmente, las comparaciones de los estimados entre los modelos que consideran inmunización con al menos una dosis de la PCV13 (Tabla 6) y el modelo

considerando el número de dosis (Tabla 7) sugiere que no hay una diferencia sustancial de los estimados considerando el número de dosis o al menos una dosis de la PCV13 que favorezca al incremento de la prevalencia de colonización por *S. pneumoniae* ni la disminución de la prevalencia de colonización por *S. aureus*. Asimismo, en ambos modelos de regresión, la inmunización según el número de dosis o al menos una dosis de la PCV13 no se encontró asociado a la co-colonización.

Factores asociados a la colonización de *Streptococcus pneumoniae*

La portación total de *S. pneumoniae* fue de 20,2% (niños colonizados solo por *S. pneumoniae* y co-colonizados). Esta frecuencia está dentro del rango reportado para la portación neumocócica en países de medianos y bajos ingresos (24). Esta frecuencia fue ligeramente menor en contraste a la reportada en Perú (31%), Venezuela (27%) y México (21%) antes de la introducción de las PCVs (48,76,77). Del mismo modo, esta frecuencia es similar a la de España (19,7%) (78), Chipre (25,3%) (79) e Italia (27,0%) (38) luego de la introducción de las PCV13. Asimismo, la frecuencia de portación neumocócica determinada en nuestro estudio es menor a la observada en Salvador, Brasil (55,0%) antes de la introducción de la PCV10 (80). Además, luego de la introducción de la PCV13, la prevalencia de portación neumocócica fue de 32,0% en EE.UU (81), 33,0% en India (82) y Grecia (45,1%) (83). Las frecuencias de colonización podrían ser afectadas debido al método de detección de *S. pneumoniae*, por ejemplo la PCR es más sensible y específica (49) en comparación de los métodos microbiológicos estándares recomendados para los estudios en portadores nasofaríngeos del CDC

(84), el cual todos los estudios previamente nombrados utilizaron. Por otro lado, estas diferencias en las frecuencias de portación de neumococo podrían deberse a que la PCV13 confiere protección contra un mayor número de serotipos en comparación con la vacuna 7-valente o 10-valente (85,86), y por lo tanto esto sugiere que las PCVs contribuye a la disminución de la portación nasofaríngea de *S. pneumoniae*.

Por otro lado, el presente estudio reporta que no haber recibido al menos una dosis de PCV13 incrementó la frecuencia de colonización solo por *S. pneumoniae* (análisis bivariado, Tabla 5). Esto podría ser debido potencialmente a que se ha encontrado una alta frecuencia de serotipos de *S. pneumoniae* no cubiertos por la PCV13 (81,2%). Adicionalmente, el estudio primario (del cual esta tesis realizó el análisis secundario de datos) reportó que el incremento (Rpa: 2,49; IC95%: 1,08 - 5,73) en la colonización neumocócica asociada a la inmunización con al menos una dosis de la PCV13 solo se evidenció en los niños colonizados por serotipos no cubiertos por la PCV13 (70). Esto sugiere que las PCVs estarían generando una presión selectiva en las frecuencias de serotipos pocos comunes en Perú, especialmente en los niños que no completan con el esquema recomendado de vacunación, y consecuentemente provocando un incremento en la portación por serotipos no vacunales (65).

Además, la presencia de síntoma respiratorio, vivir con otro niños en casa y hospitalización previa son factores asociados comúnmente reportados en estudios que evalúan la portación nasofaríngea en neumococo además del grupo etario, localización geográfica y asistencia a guardería (48,87,88).

Los niños que vivieron con otros niños en el mismo hogar se asociaron al incremento de la prevalencia de colonización por *S. pneumoniae* (RPa: 2,01; IC95%: 1,36 - 3,00) debido a que esta bacteria se transmite principalmente a través de pequeñas gotas producidas por personas portadoras al toser o estornudar, los niños (principalmente los que asisten a guarderías y escolares) tienden a tener un mayor contacto con otros y por lo tanto se exponen más a menudo a patógenos respiratorios como *S. pneumoniae* (71).

La frecuencia de presentar algún síntoma respiratorio fue de 36,3% en la población en estudio, alrededor de 10% más que en el estudio realizado antes de la introducción de la PCV7 en Lima, Perú (48). Además, la presencia de síntoma respiratorio se asoció al incremento de la prevalencia de colonización por *S. pneumoniae* (RPa: 1,96; IC95%: 1,31 - 2,93). Similar a lo reportado en Indonesia, donde el presentar algún síntoma respiratorio incrementó el riesgo de portación neumocócica (RPa: 2,17; IC95%: 1,13 - 4,12) (89); así como también en Laos (Rpa: 2,64; IC95%: 1,97 - 3,53) (90). Cuando una persona es colonizada por un nuevo serotipo o ocurre una nueva colonización, puede desarrollar o presentar algún tipo de síntoma leve a nivel de tracto respiratorio superior, como por ejemplo rinitis o rinorrea. Uno de los mecanismos de invasividad de esta bacteria es la capacidad de producción de la neumolisina, esta toxina produce forados en los tejidos y células promoviendo la inflamación de los sitios afectados. En el caso de la nasofaringe, estimula la sobreproducción de moco (14,91). Asimismo, una variable que puede afectar a la colonización nasofaríngea y no fue considerada por el estudio principal fueron los casos de infección virales respiratorias (asociadas también a síntomas respiratorios) en las últimas semanas. Contemplar esta variable en el análisis e

importante debido a que diversos estudios han sugerido que las infecciones virales previas anteceden o predisponen a una infección bacteriana por *S. pneumoniae*, *H. influenzae* o *S. aureus* en corto plazo (92–95).

Haber estado hospitalizado durante los tres meses previos a la toma de muestra se asoció a la disminución de la prevalencia de colonización por *S. pneumoniae* (Rpa: 0,29; IC95%: 0,09 - 1,00). Esto podría ser debido a que, el niño al haber estado hospitalizado probablemente recibió tratamiento antibiótico empírico con penicilina o algún macrólido, los cuales son medicamentos de primera línea para tratar sospecha de infecciones respiratorias (65). Asimismo, en la actualidad la sensibilidad a penicilina sigue siendo alta, al menos en las cepas de *S. pneumoniae* circulantes en Perú (70), por lo que suministrar este antibiótico podría disminuir la portación de neumococo.

Factores asociados a la colonización de *Staphylococcus aureus*

La portación total de *S. aureus* fue de 19,7% (niños colonizados solo por *S. aureus* y co-colonizados). Esta frecuencia fue ligeramente mayor a lo reportado por un estudio realizado en población pediátrica de una comunidad en Cajamarca entre agosto y setiembre del 2009 (durante la introducción de la PCV7), en el que la colonización por *S. aureus* fue del 12,7%, utilizando pruebas microbiológicas estándares (49). Caso contrario a lo reportado en una población pediátrica de Paraguay en 2016, donde se reportó una frecuencia mayor de colonización, siendo esta 30,8% (96). Esto también fue similar a lo reportado en Japón (28,2%) (97). Del mismo modo con lo que ocurre en la colonización por *S. pneumoniae*, la colonización por otras bacterias comensales de la nasofaringe están sujetas a

diversos factores ambientales y sociodemográficos particulares de cada zona geográfica explicando de cierta manera las diferencias en la frecuencia de portación asintomática en países del mismo continente (96,98,99).

Adicionalmente, se observó que completar la lactancia materna exclusiva de seis meses y haber recibido al menos una dosis de la PCV13 estuvo asociada a la frecuencia de colonización por *S. aureus*. Esto concuerda con los reportes sobre los efectos que proporciona la alimentación exclusiva con leche materna en los niños de edades tempranas, mejorando el desarrollo óptimo de la microbiota benéfica y disminuyendo la población de Enterobacterales, *S. aureus* y *Moraxella catarrhalis* (100–102). Del mismo modo, la asociación con la inmunización con la PCV13 no queda esclarecida debido a que diversos estudios mencionan que la relación entre la PCVs y la colonización por *S. aureus* es debido a la relación inversa con los serotipos vacunales (7), sin embargo, no se encontró esta asociación significativa en los análisis realizados en el presente estudio.

Factores asociados a la co-colonización

La frecuencia de co-colonización fue de 2,9% y no se encontró asociada con la inmunización con la PCV13 ni otras covariables analizadas. Por el contrario, la presencia de *S. pneumoniae* se asoció con una menor frecuencia de *S. aureus*. La frecuencia de co-colonización observada fue similar a lo reportado por el estudio realizado en Cajamarca, Perú, donde fue de 4,8% utilizando diagnóstico microbiológico. Sin embargo, esta frecuencia aumentó a 28,2% al utilizar métodos moleculares para el diagnóstico (49). Utilizar metodologías que proporcionen principalmente una mayor sensibilidad sería lo recomendado debido a que la

evidencia sugiere que emplear técnicas microbiológicas para la detección de estos patógenos nasofaríngeos (que usualmente se encuentran en bajas densidades en la nasofaringe) en este tipo de muestras biológicas podría subestimar la medida de frecuencia real (debido a que el límite de detección es mayor en pruebas microbiológicas en comparación a técnicas moleculares), sin embargo se debería de tener mayor cuidado con características de consumo de antibióticos previos para evitar la detección de ADN que provengan de bacterias no viables que no implicarían colonización en ese momento (103). Del mismo, la colonización por *S. pneumoniae* se asoció inversamente con la colonización de *S. aureus* (49,64). Los resultados sugieren que las PCVs no estarían favoreciendo la co-existencia de ambos patógenos al menos en la población de niños menores de 2 años que acuden a los principales centros de salud de Lima, Perú luego de la introducción de la PCV13. Sin embargo, se recomienda que futuros estudios que busquen determinar las frecuencias de patógenos nasofaríngeos comensales sean realizados utilizando metodologías más sensibles y específicas como es la PCR convencional o en tiempo real.

A pesar de que hasta la fecha se han introducido tres distintas PCVs en el Plan Nacional de Inmunización en Perú, el Ministerio de Salud no ha realizado un análisis sobre potenciales efectos secundarios a nivel poblacional por la introducción de una nueva vacuna [como por ejemplo, lo ocurrido mundialmente luego de la introducción de la vacuna contra *Haemophilus influenzae* tipo b (104)] sobre la prevalencia de patógenos nasofaríngeos como *S. pneumoniae* o *S. aureus* cuya resistencia antimicrobiana está incrementado, generando que las infecciones pediátricas por este patógeno podrían considerarse un nuevo reto en los próximos

años. Finalmente, nuestros hallazgos sugieren que la colonización por *S. aureus* podría disminuir si los infantes completan el periodo de lactancia materna exclusiva. Debido a esto, se hace necesario la implementación de nuevas estrategias para fomentar la lactancia materna.

Limitaciones y fortalezas

Una de las limitaciones más importantes fue el diseño del estudio ya que al ser transversal, no permitió determinar causalidad, por lo que se recomienda la realización de futuros estudios probabilísticos con un diseño capaz de determinar el posible efecto causal de las PCVs en la frecuencia de colonización por patógenos nasofaríngeos, para los cuales este estudio puede servir como base ya que se reporta factores asociados que pueden ser incluidos en el diseño y recolección de datos. Del mismo modo, no se evaluó el tiempo desde la vacunación y no fue posible determinar tiempo de colonización hasta el momento de la toma de muestra.

Un potencial sesgo de selección realizado por el estudio principal fue la selección de los hospitales participantes, así como no considerar algunas variables confusoras importantes [tipo de establecimiento de salud (MINSA, EsSalud), nivel educativo o socio-económico de la población que acude, distintas actividades para la implementación de la vacunación y la promoción de la lactancia materna]. Sin embargo, con respecto a la frecuencia de vacunación total (89%), la frecuencia por centro de estudio fue similar (entre 88 – 92%).

A pesar de que nuestros resultados sugieren que no hay diferencias entre haber recibido 1, 2 o 3 dosis de la PCV13 (frente a los principales serotipos

circulantes en Perú) y al menos una dosis y que la edad vinculada al número de dosis no cambia la dirección o la magnitud de la asociación (Tabla 6 – 7), se sugeriría excluir a los niños de edades que no puedan aun haber recibido la segunda dosis (<4 meses de edad) para evitar una sobreestimación de la prevalencia de la colonización por este grupo de edad. Sin embargo, con respecto a este estudio, si excluimos a este grupo etario, perderíamos drásticamente potencia estadística en cada una de las categorías de colonización y se alejaría a la principal pregunta de investigación el cual fue evaluar el efecto de al menos una dosis de la PCV13 en la colonización nasofaríngea.

Por otro lado, debido a que la bibliografía consultada sugería que se podría encontrar un aumento en la co-colonización de hasta 11.2% luego de la introducción de la PCV7. Hemos encontrado que la co-colonización en nuestro estudio solamente incrementó un 5.4% con respecto al grupo no expuesto (de 2,9 a 8,3%), explicando de esta manera la falta de capacidad de detectar diferencias del 15% como cambios estadísticamente significativos como se muestran en la Tabla 3.

Asimismo, el estudio principal realizó un muestreo por conveniencia (no probabilístico) de los centros de estudio. Sin embargo, se aseguró que el personal encargado del enrolamiento esté presente a lo largo de toda la atención de los consultorios a los cuales asistían los posibles voluntarios de manera que el total de participantes represente a la mayoría de los niños que asistían a estos hospitales entre los años 2018 a 2019.

Finalmente, las conclusiones podrían ser son válidas para niños que se atienden normalmente en los hospitales en Lima y Callao y no se pretende

extrapolar conclusiones para todo el país ni a niños que se atienden en establecimientos de salud del sector privado (clínicas o laboratorios privados) debido a que las características sociodemográficas de esta población podrían ser distinto y afectar en la estimación de la asociación con la variable dependiente. No obstante, los niños menores de años que viven en Lima y Callao representan el 27,2% (105) de toda la población de este grupo etario que vive en Perú, así que la información podría ser representativa para una considerable proporción de niños que viven en Perú.

V. CONCLUSIONES

- La colonización solo por *S. pneumoniae* y solo por *S. aureus* ocurrió con una frecuencia similar (17,4 y 16,8% respectivamente) mientras que la co-colonización fue un evento poco frecuente (2,9%).
- La colonización por *S. pneumoniae* se vio asociada positivamente por la presencia de síntoma respiratorio, vivir con otros niños y haber recibido al menos una dosis de la vacuna PCV13. Por otro lado, haber estado hospitalizado en los últimos 3 meses se asoció con una disminución en la prevalencia de la colonización por este patógeno.
- La lactancia materna exclusiva durante seis meses y la inmunización con al menos una dosis de la PCV13 mostraron una asociación con una disminución en la colonización por *S. aureus*.
- Los resultados sugieren un posible efecto de PCV13 en la co-colonización (RPa: 1,85), pero el amplio intervalo de confianza (IC95%: 0,35 - 9,67) indica una falta de potencia estadística para afirmar con certeza la existencia de una potencial asociación..
- La resistencia a penicilina y macrólidos mostró un leve incremento en co-colonizados.

VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar una investigación para evaluar la potencial asociación entre la PCV13 y la co-colonización, en el cual se pueda medir las demás variables confusoras teóricas (nivel educativo y económico del padre o cuidador).

Además, teniendo en cuenta que según el número de dosis de la PCV13 con respecto a la edad aumenta la respuesta inmunológica del huésped, se debe establecer un punto de corte en las edades de los participantes para evitar sesgo de selección.

Por otro lado, debido a que los serotipos de *S. pneumoniae* difieren en su interacción con la flora bacteriana nasofaríngea natural, se sugiere realizar estos tipos de estudios cada vez que una nueva generación de las vacunas antineumocócicas sea acoplada a los planes nacionales de vacunación en los distintos países.

Finalmente, sugerimos utilizar técnicas de biología molecular como qPCR para la detección de estos patógenos colectadas de muestras de hisopados nasofaríngeos ya que han demostrado mayor sensibilidad y menor límite de detección, mejorando de esta manera la correcta medición de la frecuencia de patógenos colonizadores.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ebruke C, Dione MM, Walter B, Worwui A, Adegbola RA, Roca A, et al. High genetic diversity of *Staphylococcus aureus* strains colonising the nasopharynx of Gambian villagers before widespread use of pneumococcal conjugate vaccines. BMC Microbiol. 12 de marzo de 2016;16:38.
2. Brown AF, Leech JM, Rogers TR, McLoughlin RM. *Staphylococcus aureus* Colonization: Modulation of host immune response and impact on human vaccine design. Front Immunol. 8 de enero de 2014;4:507.
3. Varghese R, Jayaraman R, Veeraraghavan B. Current challenges in the accurate identification of *Streptococcus pneumoniae* and its serogroups/serotypes in the vaccine era. J Microbiol Methods. octubre de 2017;141:48-54.
4. Reiss-Mandel A, Regev-Yochay G. *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* interaction and response to pneumococcal vaccination: Myth or reality? Hum Vaccines Immunother. febrero de 2016;12(2):351.
5. Dagan R, Klugman KP. Impact of conjugate pneumococcal vaccines on antibiotic resistance. Lancet Infect Dis. diciembre de 2008;8(12):785-95.
6. Grall N, Hurmic O, Al Nakib M, Longo M, Poyart C, Ploy MC, et al. Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* in France before introduction of the PCV-13 vaccine. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. diciembre de 2011;30(12):1511-9.
7. van Gils EJM, Hak E, Veenhoven RH, Rodenburg GD, Bogaert D, Bruin JP, et al. Effect of seven-Vvalent pneumococcal conjugate vaccine on *Staphylococcus aureus* colonisation in a randomised controlled trial. PLOS ONE. 10 de junio de 2011;6(6):e20229.

8. Bogaert D, van Belkum A, Sluijter M, Luijendijk A, de Groot R, Rümke HC, et al. Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. *Lancet Lond Engl.* 5 de junio de 2004;363(9424):1871-2.
9. Lebon A, Verkaik NJ, de Vogel CP, Hooijkaas H, Verbrugh HA, van Wamel WJB, et al. The inverse correlation between *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* colonization in infants is not explained by differences in serum antibody levels in the generation R study. *Clin Vaccine Immunol CVI.* enero de 2011;18(1):180-3.
10. Boada A, Almeda J, Grenzner E, Pons-Vigués M, Morros R, Juvé R, et al. [Prevalence of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* in Primary Care and factors associated with colonization]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* septiembre de 2015;33(7):451-7.
11. Quintero B, Araque M, van der Gaast-de Jongh C, Escalona F, Correa M, Morillo-Puente S, et al. Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* colonization in healthy Venezuelan children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30(1):7-19.
12. Bättig P, Mühlemann K. Capsule genes of *Streptococcus pneumoniae* influence growth in vitro. *FEMS Immunol Med Microbiol.* agosto de 2007;50(3):324-9.
13. Wu X, Gordon O, Jiang W, Antezana BS, Angulo-Zamudio UA, Del Rio C, et al. Interaction between *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* generates ·OH radicals that rapidly kill *Staphylococcus aureus* strains. *J Bacteriol.* 1 de noviembre de 2019;201(21):e00474-19.

14. Watson L, Eisenhut M. Role of intercellular adhesion molecule-1 and polymeric immunoglobulin receptor in co-colonization of airways with *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *Pediatr Infect Dis J*. octubre de 2013;32(10):1155.
15. Regev-Yochay G, Lipsitch M, Basset A, Rubinstein E, Dagan R, Raz M, et al. The pneumococcal pilus predicts the absence of *Staphylococcus aureus* co-colonization in pneumococcal carriers. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 de marzo de 2009;48(6):760-3.
16. Barocchi MA, Ries J, Zogaj X, Hemsley C, Albiger B, Kanth A, et al. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 21 de febrero de 2006;103(8):2857-62.
17. Nelson AL, Ries J, Bagnoli F, Dahlberg S, Fälker S, Rounioja S, et al. RrgA is a pilus-associated adhesin in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*. octubre de 2007;66(2):329-40.
18. Basset A, Trzcinski K, Hermos C, O'Brien KL, Reid R, Santosham M, et al. Association of the pneumococcal pilus with certain capsular serotypes but not with increased virulence. *J Clin Microbiol*. junio de 2007;45(6):1684-9.
19. Aguiar SI, Serrano I, Pinto FR, Melo-Cristino J, Ramirez M. The presence of the pilus locus is a clonal property among pneumococcal invasive isolates. *BMC Microbiol*. 28 de febrero de 2008;8:41.
20. Kuo CY, Hwang KP, Hsieh YC, Cheng CH, Huang FL, Shen YH, et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Taiwan before and after the introduction of a conjugate vaccine. *Vaccine*. 18 de julio de 2011;29(32):5171-7.

21. Regev-Yochay G, Dagan R, Raz M, Carmeli Y, Shainberg B, Derazne E, et al. Association between carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in children. JAMA. 11 de agosto de 2004;292(6):716-20.
22. Spijkerman J, Prevaes SMPJ, Gils EJM van, Veenhoven RH, Bruin JP, Bogaert D, et al. Long-term effects of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *H. influenzae* and *M. catarrhalis*. PLOS ONE. 25 de junio de 2012;7(6):e39730.
23. Davalos L, Terrazas Y, Quintana A, Egoavil M, Sedano K, Castillo ME, et al. Características epidemiológicas, clínicas y bacteriológicas de meningitis neumocócica en pacientes pediátricos de Lima, Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica. julio de 2016;33(3):425-31.
24. Adegbola RA, DeAntonio R, Hill PC, Roca A, Usuf E, Hoet B, et al. Carriage of *Streptococcus pneumoniae* and other respiratory bacterial pathogens in low and lower-middle income countries: a systematic review and meta-analysis. PloS One. 2014;9(8):e103293.
25. Dunne EM, Manning J, Russell FM, Robins-Browne RM, Mulholland EK, Satzke C. Effect of pneumococcal vaccination on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, and *Staphylococcus aureus* in Fijian children. J Clin Microbiol. marzo de 2012;50(3):1034-8.
26. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. Sultan Qaboos Univ Med J. diciembre de 2007;7(3):273-5.

27. Ministerio de Salud de Perú. Implementación de la vacuna contra el Neumococo en el Perú [Internet]. [citado 16 de agosto de 2021]. Disponible en: http://ftp2.minsa.gob.pe/download/esn/inmunizaciones/Neumococo_2009.pdf
28. Padilla J, Espíritu N, Rizo-Patrón E, Medina MC. Neumonías en niños en el Perú: Tendencias epidemiológicas, intervenciones y avances. Rev Médica Clínica Las Condes. 1 de enero de 2017;28(1):97-103.
29. Singleton RJ, Hennessy TW, Bulkow LR, Hammitt LL, Zulz T, Hurlburt DA, et al. Invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes among alaska native children with high levels of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine coverage. JAMA. 25 de abril de 2007;297(16):1784-92.
30. Hancock RE. Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. Lancet Infect Dis. abril de 2005;5(4):209-18.
31. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 21 de mayo de 1999;284(5418):1318-22.
32. Hauser C, Kronenberg A, Allemann A, Mühlemann K, Hilty M. Serotype/serogroup-specific antibiotic non-susceptibility of invasive and non-invasive *Streptococcus pneumoniae*, Switzerland, 2004 to 2014. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 26 de mayo de 2016;21(21).
33. Cornick JE, Bentley SD. *Streptococcus pneumoniae*: the evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides. Microbes Infect. julio de 2012;14(7-8):573-83.
34. Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. Lancet Lond Engl. 3 de diciembre de 2011;378(9807):1962-73.

35. Yadav MK, Chae SW, Song JJ. In vitro *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and in vivo middle ear mucosal biofilm in a rat model of acute otitis induced by *S. pneumoniae*. Clin Exp Otorhinolaryngol. septiembre de 2012;5(3):139-44.
36. Yadav MK, Chae SW, Go YY, Im GJ, Song JJ. In vitro multi-species biofilms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* and their host interaction during in vivo colonization of an otitis media Rat Model. Front Cell Infect Microbiol. 2017;7:125.
37. Kaur R, Casey JR, Pichichero ME. Emerging *Streptococcus pneumoniae* strains colonizing the nasopharynx in children after 13-valent pneumococcal conjugate vaccination in comparison to the 7-valent era, 2006-2015. Pediatr Infect Dis J. agosto de 2016;35(8):901-6.
38. Zuccotti G, Mameli C, Daprai L, Garlaschi ML, Dilillo D, Bedogni G, et al. Serotype distribution and antimicrobial susceptibilities of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* from healthy children in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine era. Vaccine. 23 de enero de 2014;32(5):527-34.
39. Lee GM, Kleinman K, Pelton SI, Hanage W, Huang SS, Lakoma M, et al. Impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccination on *Streptococcus pneumoniae* carriage in young children in Massachusetts. J Pediatr Infect Dis Soc. marzo de 2014;3(1):23-32.
40. Dunais B, Bruno P, Touboul P, Degand N, Sakarovitch C, Fontas E, et al. Impact of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* among children attending group daycare in southeastern France. Pediatr Infect Dis J. marzo de 2015;34(3):286-8.

41. Valente C, Hinds J, Gould KA, Pinto FR, de Lencastre H, Sá-Leão R. Impact of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on *Streptococcus pneumoniae* multiple serotype carriage. *Vaccine*. 25 de julio de 2016;34(34):4072-8.
42. Nakano S, Fujisawa T, Ito Y, Chang B, Suga S, Noguchi T, et al. Serotypes, antimicrobial susceptibility, and molecular epidemiology of invasive and non-invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in paediatric patients after the introduction of 13-valent conjugate vaccine in a nationwide surveillance study conducted in Japan in 2012-2014. *Vaccine*. 2 de enero de 2016;34(1):67-76.
43. Jiménez Quiceno JN, Correa Ochoa MM. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: Bases moleculares de la resistencia, epidemiología y tipificación. *Iatreia*. junio de 2009;22(2):147-58.
44. Organización Mundial de la Salud. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. [citado 14 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
45. Bogaert D, Groot R de, Hermans PWM. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*. 1 de marzo de 2004;4(3):144-54.
46. Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*. diciembre de 2005;5(12):751-62.
47. Verhagen LM, Luesink M, Warris A, de Groot R, Hermans PWM. Bacterial respiratory pathogens in children with inherited immune and airway disorders:

nasopharyngeal carriage and disease risk. *Pediatr Infect Dis J.* abril de 2013;32(4):399-404.

48. Mercado EH, Egoavil M, Horna SG, Torres N, Velásquez R, Castillo ME, et al. Serotipos de neumococo en niños portadores antes de la vacunación antineumocócica en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* marzo de 2012;29(1):53-60.

49. Chien YW, Vidal JE, Grijalva CG, Bozio C, Edwards KM, Williams JV, et al. Density interactions between *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* in the nasopharynx of young Peruvian children. *Pediatr Infect Dis J.* enero de 2013;32(1):72-7.

50. Shak JR, Ludewick HP, Howery KE, Sakai F, Yi H, Harvey RM, et al. Novel role for the *Streptococcus pneumoniae* toxin pneumolysin in the assembly of biofilms. *mBio.* 10 de septiembre de 2013;4(5):e00655-00613.

51. Shak JR, Cremers AJH, Gritzfeld JF, de Jonge MI, Hermans PWM, Vidal JE, et al. Impact of experimental human pneumococcal carriage on nasopharyngeal bacterial densities in healthy adults. *PloS One.* 2014;9(6):e98829.

52. Khan F, Wu X, Matzkin GL, Khan MA, Sakai F, Vidal JE. *Streptococcus pneumoniae* eradicates preformed *Staphylococcus aureus* biofilms through a mechanism requiring physical contact. *Front Cell Infect Microbiol.* 27 de septiembre de 2016;6:104.

53. Regev-Yochay G, Trzcinski K, Thompson CM, Malley R, Lipsitch M. Interference between *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: In vitro hydrogen peroxide-mediated killing by *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* julio de 2006;188(13):4996-5001.

54. Ministerio de Salud de Perú. Esquema regular de vacunación por etapas de vida en el Perú [Internet]. 2023. Disponible en: <https://www.gob.pe/22037-esquema-regular-de-vacunacion-por-etapas-de-vida-en-el-peru>)
55. Madhi SA, Mutsaerts EA, Izu A, Boyce W, Bhikha S, Ikulinda BT, et al. Immunogenicity of a single-dose compared with a two-dose primary series followed by a booster dose of ten-valent or 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in South African children: an open-label, randomised, non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis.* diciembre de 2020;20(12):1426-36.
56. Luna-Muschi A, Castillo-Tokumori F, Deza MP, Mercado EH, Egoavil M, Sedano K, et al. Invasive pneumococcal disease in hospitalised children from Lima, Peru before and after introduction of the 7-valent conjugated vaccine. *Epidemiol Infect.* enero de 2019;147:e91.
57. Ladhani SN, Collins S, Djennad A, Sheppard CL, Borrow R, Fry NK, et al. 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.* abril de 2018;18(4):441-51.
58. Southern J, Andrews N, Sandu P, Sheppard CL, Waight PA, Fry NK, et al. Pneumococcal carriage in children and their household contacts six years after introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in England. *PLoS ONE.* 25 de mayo de 2018;13(5):e0195799.
59. Goldblatt D, Southern J, Andrews NJ, Burbidge P, Partington J, Roalfe L, et al. Pneumococcal conjugate vaccine 13 delivered as one primary and one booster dose (1 + 1) compared with two primary doses and a booster (2 + 1) in UK infants:

a multicentre, parallel group randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. febrero de 2018;18(2):171-9.

60. Choi YH, Andrews N, Miller E. Estimated impact of revising the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine schedule from 2+1 to 1+1 in England and Wales: A modelling study. *PLOS Med*. 3 de julio de 2019;16(7):e1002845.

61. Choi EH, Kim KH, Kim YJ, Kim JH, Park SE, Lee HJ, et al. Recommendation for use of the newly introduced pneumococcal protein conjugate vaccines in Korea. *Korean J Pediatr*. abril de 2011;54(4):146-51.

62. Ministry of Health of Peru. Norma técnica de salud que establece el esquema nacional de vacunación - NTS N 080 - MINSA/DGIESP V.04 [Internet]. 2016. Disponible en: https://proyectos.inei.gob.pe/endes/2021/DOCUMENTOS/FICHA_TECNICA_ENDES_2021.pdf

63. Ministry of Health of Peru. Norma técnica que establece el esquema nacional de vacunación - NTS N141 – MINSA/2018/DGIESP [Internet]. 2018 [citado 9 de enero de 2023]. Disponible en: https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/300034/d177030_opt.PDF

64. Hanke CR, Grijalva CG, Chochua S, Pletz MW, Hornberg C, Edwards KM, et al. Bacterial density, serotype distribution and antibiotic resistance of pneumococcal strains from the nasopharynx of peruvian children before and after pneumococcal conjugate vaccine 7. *Pediatr Infect Dis J*. abril de 2016;35(4):432-9.

65. Gonzales BE, Mercado EH, Pinedo-Bardales M, Hinostroza N, Campos F, Chaparro E, et al. Increase of macrolide-resistance in *Streptococcus pneumoniae*

strains after the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in Lima, Peru. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:866186.

66. Takeuchi N, Ohkusu M, Wada N, Kurosawa S, Miyabe A, Yamaguchi M, et al. Molecular typing, antibiotic susceptibility, and biofilm production in nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in Japan. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother.* octubre de 2019;25(10):750-7.

67. Bisgaard H, Hermansen MN, Buchvald F, Loland L, Halkjaer LB, Bønnelykke K, et al. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. *N Engl J Med.* 11 de octubre de 2007;357(15):1487-95.

68. Lijek RS, Weiser JN. Co-infection subverts mucosal immunity in the upper respiratory tract. *Curr Opin Immunol.* agosto de 2012;24(4):417-23.

69. Nzenze SA, Shiri T, Nunes MC, Klugman KP, Kahn K, Twine R, et al. Temporal association of infant immunisation with pneumococcal conjugate vaccine on the ecology of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonisation in a rural South African community. *Vaccine.* 22 de septiembre de 2014;32(42):5520-30.

70. Gonzales BE, Mercado EH, Castillo-Tokumori F, Montero AE, Luna-Muschi A, Marcelo-Ragas M, et al. Pneumococcal serotypes and antibiotic resistance in healthy carriage children after introduction of PCV13 in Lima, Peru. *Vaccine.* 1 de junio de 2023;S0264-410X(23)00592-3.

71. Torres N, Velásquez R, Mercado EH, Egoavil M, Horna G, Mejía L, et al. Resistencia antibiótica de streptococcus pneumoniae en portadores nasofaríngeos sanos de siete regiones del Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* octubre de 2013;30(4):575-82.

72. Vidal JE, Ludewick HP, Kunkel RM, Zähler D, Klugman KP. The LuxS-dependent quorum-sensing system regulates early biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* strain D39 [▼]. *Infect Immun.* octubre de 2011;79(10):4050-60.
73. MacFaddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana; 2003. 864 p.
74. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing M100. 29th ed. Vol. 39. 2019.
75. Tvedskov ESF, Hovmand N, Benfield T, Tinggaard M. Pneumococcal carriage among children in low and lower-middle-income countries: A systematic review. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* febrero de 2022;115:1-7.
76. Rivera-Olivero IA, del Nogal B, Sisco MC, Bogaert D, Hermans PWM, de Waard JH. Carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Caracas, Venezuela: the relative invasiveness of serotypes and vaccine coverage. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* diciembre de 2011;30(12):1489-95.
77. Solórzano-Santos F, Ortiz-Ocampo LA, Miranda-Novales MG, Echániz-Avilés G, Soto-Noguerón A, Guiscafré-Gallardo H. [Prevalence of *Streptococcus pneumoniae* serotypes on nasopharyngeal colonization in children of Mexico City]. *Salud Publica Mex.* 2005;47(4):276-81.
78. Alfayate Miguélez S, Yague Guirao G, Menasalvas Ruíz AI, Sanchez-Solís M, Domenech Lucas M, González Camacho F, et al. Impact of pneumococcal vaccination in the nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children of the Murcia region in Spain. *Vaccines.* 28 de diciembre de 2020;9(1):14.

79. Hadjipanayis A, Efstathiou E, Alexandrou M, Panayiotou L, Zachariadou C, Petrou P, et al. Nasopharyngeal pneumococcal carriage among healthy children in Cyprus post widespread simultaneous implementation of PCV10 and PCV13 vaccines. *PloS One*. 2016;11(10):e0163269.
80. Menezes AP de O, Azevedo J, Leite MC, Campos LC, Cunha M, Carvalho M da GS, et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* among children in an urban setting in Brazil prior to PCV10 introduction. *Vaccine*. 3 de febrero de 2016;34(6):791-7.
81. Desai AP, Sharma D, Crispell EK, Baughman W, Thomas S, Tunali A, et al. Decline in pneumococcal nasopharyngeal carriage of vaccine serotypes after the introduction of the 13-Valent pneumococcal conjugate vaccine in children in Atlanta, Georgia. *Pediatr Infect Dis J*. noviembre de 2015;34(11):1168-74.
82. Swedan SF, Hayajneh WA, Bshara GN. Genotyping and serotyping of macrolide and multidrug resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated from carrier children. *Indian J Med Microbiol*. junio de 2016;34(2):159-65.
83. Grivea IN, Sourla A, Ntokou E, Chryssanthopoulou DC, Tsantouli AG, Syrogiannopoulos GA. Macrolide resistance determinants among *Streptococcus pneumoniae* isolates from carriers in Central Greece. *BMC Infect Dis*. 11 de octubre de 2012;12:255.
84. Satzke C, Turner P, Virolainen-Julkunen A, Adrian PV, Antonio M, Hare KM, et al. Standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*: updated recommendations from the World Health Organization Pneumococcal Carriage Working Group. *Vaccine*. 17 de diciembre de 2013;32(1):165-79.

85. Duggan ST. Pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine (13-valent, adsorbed) [prevenar 13®]. *Drugs*. 22 de octubre de 2010;70(15):1973-86.
86. Prymula R, Schuerman L. 10-valent pneumococcal nontypeable *Haemophilus influenzae* PD conjugate vaccine: Synflorix. *Expert Rev Vaccines*. noviembre de 2009;8(11):1479-500.
87. Dion SB, Major M, Gabriela Grajales A, Nepal RM, Cane A, Gessner B, et al. Invasive pneumococcal disease in Canada 2010-2017: The role of current and next-generation higher-valent pneumococcal conjugate vaccines. *Vaccine*. 21 de mayo de 2021;39(22):3007-17.
88. Narváez PO, Gomez-Duque S, Alarcon JE, Ramirez-Valbuena PC, Serrano-Mayorga CC, Lozada-Arcinegas J, et al. Invasive pneumococcal disease burden in hospitalized adults in Bogota, Colombia. *BMC Infect Dis*. 12 de octubre de 2021;21(1):1059.
89. Fadlyana E, Dunne EM, Rusmil K, Tarigan R, Sudigdoadi S, Murad C, et al. Risk factors associated with nasopharyngeal carriage and density of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, and *Staphylococcus aureus* in young children living in Indonesia. *Pneumonia Nathan Qld*. 2018;10:14.
90. Dunne EM, Choummanivong M, Neal EFG, Stanhope K, Nguyen CD, Xeuvatvongsa A, et al. Factors associated with pneumococcal carriage and density in infants and young children in Laos PDR. *PloS One*. 2019;14(10):e0224392.
91. Zepeda F G, Gvirtzman K C, Kreft V J, Inostroza V E, Díaz A P. *Streptococcus pneumoniae* e inmunidad innata. *Rev Chil Enfermedades Respir*. abril de 2013;29(2):89-95.

92. Palacios G, Hornig M, Cisterna D, Savji N, Bussetti AV, Kapoor V, et al. *Streptococcus pneumoniae* coinfection is correlated with the severity of H1N1 pandemic influenza. PloS One. 31 de diciembre de 2009;4(12):e8540.
93. Okada T, Morozumi M, Matsubara K, Komiyama O, Ubukata K, Takahashi T, et al. Characteristic findings of pediatric inpatients with pandemic (H1N1) 2009 virus infection among severe and nonsevere illnesses. J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother. abril de 2011;17(2):238-45.
94. Seki M, Kosai K, Yanagihara K, Higashiyama Y, Kurihara S, Izumikawa K, et al. Disease severity in patients with simultaneous influenza and bacterial pneumonia. Intern Med Tokyo Jpn. 2007;46(13):953-8.
95. Dawood FS, Chaves SS, Pérez A, Reingold A, Meek J, Farley MM, et al. Complications and associated bacterial coinfections among children hospitalized with seasonal or pandemic influenza, United States, 2003-2010. J Infect Dis. 1 de marzo de 2014;209(5):686-94.
96. Benítez I, Velázquez G, Alfonzo K, Giménez P, Ávila G, Martínez F, et al. Frecuencia de colonización y sensibilidad de *Staphylococcus aureus* en un grupo de niños sanos en Asunción. Pediatría Asunción. 2017;44(3):226-32.
97. Hisata K, Kuwahara-Arai K, Yamanoto M, Ito T, Nakatomi Y, Cui L, et al. Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children. J Clin Microbiol. julio de 2005;43(7):3364-72.
98. Lee GM, Huang SS, Rifas-Shiman SL, Hinrichsen VL, Pelton SI, Kleinman K, et al. Epidemiology and risk factors for *Staphylococcus aureus* colonization in children in the post-PCV7 era. BMC Infect Dis. 11 de julio de 2009;9:110.

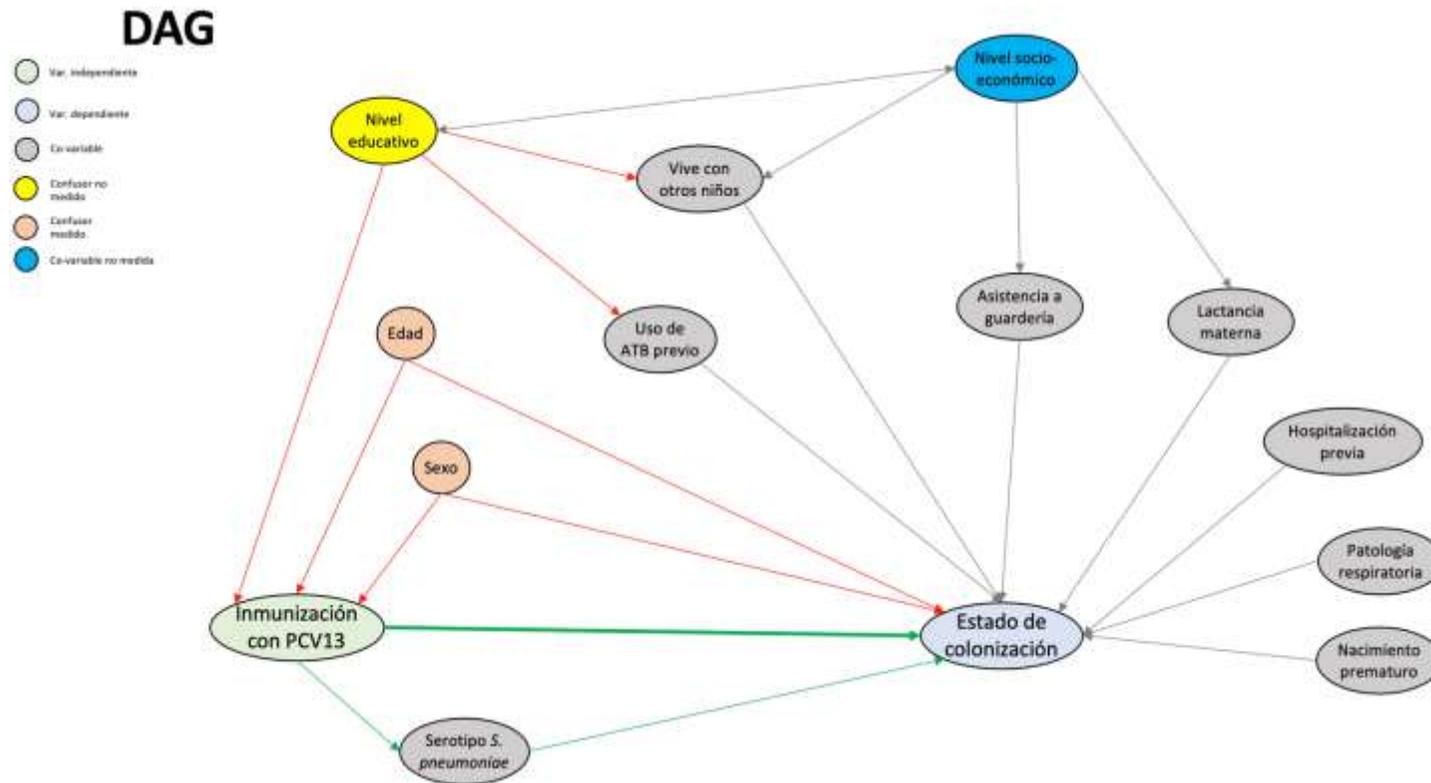
99. Margolis E, Yates A, Levin BR. The ecology of nasal colonization of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus*: the role of competition and interactions with host's immune response. BMC Microbiol. 23 de febrero de 2010;10:59.
100. Ho KT, Su KW, Liao SL, Chiu CY, Hua MC, Huang JL, et al. Longitudinal investigation of pathogenic bacterial colonization in early childhood: Emphasis on the determinants of *Moraxella catarrhalis* colonization. J Microbiol Immunol Infect Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi. 9 de septiembre de 2022;S1684-1182(22)00149-9.
101. Ding J, Ouyang R, Zheng S, Wang Y, Huang Y, Ma X, et al. Effect of breastmilk microbiota and sialylated oligosaccharides on the colonization of infant gut microbial community and fecal metabolome. Metabolites. 18 de noviembre de 2022;12(11):1136.
102. Heisel T, Johnson AJ, Gonia S, Dillon A, Skalla E, Haapala J, et al. Bacterial, fungal, and interkingdom microbiome features of exclusively breastfeeding dyads are associated with infant age, antibiotic exposure, and birth mode. Front Microbiol. 2022;13:1050574.
103. Carvalho M da GS, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee L, Mayer LW, et al. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. J Clin Microbiol. agosto de 2007;45(8):2460-6.
104. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Vigilancia de las neumonías y meningitis bacterianas en menores de 5 años [Internet]. 2009. Disponible en: https://www3.paho.org/spanish/ad/fch/im/GuiaPractica_NeumoMBacteriana.pdf

105. Ministerio de Salud de Perú. Estadística poblacional [Internet]. 2022 [citado 23 de enero de 2023]. Disponible en: https://www.minsa.gob.pe/reunis/data/poblacion_estimada.asp

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Instrumentos

Anexo 1.1. Diagrama acíclico dirigido (DAG)



Anexo 1.2. Ficha de recolección de datos del estudio principal

Ficha de Recolección de Datos

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

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

Anexo 1.3. Ficha de laboratorio del estudio principal

FICHA DE LABORATORIO

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

Anexo 2. Documento de autorización de acceso a la base de datos



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

50
AÑOS

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
ALEXANDER VON HUMBOLDT
1968 - 2018

AUTORIZACION

Quien suscribe, **Theresa Jean Ochoa Woodell, PhD.**, con [REDACTED] mediante la presente manifiesto que autorizo el uso de la base de datos del estudio: "**Distribución de serotipos y sensibilidad antibiotica de Neumococo en niños portadores nasofaríngeos luego de la introducción de la vacuna 13-valente en Lima, Perú**", para uso del tesista de posgrado **Brayan Enrique Gonzales Jaimes**, identificado con [REDACTED] estudiante de la **Maestría en Investigación Epidemiológica** de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, para optar el grado académico de **Maestro en Ciencias en Investigación Epidemiológica**. Doy esta autorización en mi calidad de investigadora principal del mencionado estudio.

Lima, 15 marzo del 2021



Theresa J. Ochoa Woodell, MD, PhD.

Directora

Instituto de Medicina Tropical "Alexander von Humboldt"

theresa.ochoa@upch.pe

Anexo 3. Factores asociados entre la inmunización con la PCV13 y el estado de colonización (Grupo comparador: Colonizados solo por *S. pneumoniae*) (Análisis de sensibilidad).

Características	Estado de colonización								
	No colonizado			Solo <i>S. aureus</i>			Co-colonizado		
	RPa	IC 95%	p	Rpa	IC 95%	p	Rpa	IC 95%	p
Recibió al menos una dosis de PCV13									
No recibió PCV13	Ref.			Ref.			Ref.		
Recibió al menos una dosis	0.32	0.13 - 0.83	0.019	0.15	0.06 - 0.42	<0.001	0.60	0.10 - 3.73	0.582
Sexo									
Femenino	Ref.			Ref.			Ref.		
Masculino	0.97	0.66 - 1.44	0.886	1.05	0.64 - 1.71	0.849	2.34	0.90 - 6.09	0.082
Edad (meses)	1.02	0.98 - 1.05	0.364	1.02	0.98 - 1.07	0.362	1.00	0.92 - 1.08	0.915
Lactancia materna exclusiva completa									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	0.82	0.54 - 1.26	0.369	0.49	0.28 - 0.86	0.014	0.79	0.29 - 2.18	0.652
Síntoma respiratorio									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	0.51	0.34 - 0.77	0.001	0.42	0.25 - 0.72	0.001	0.70	0.27 - 1.77	0.445
Asistencia a guardería									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	1.97	0.72 - 5.39	0.188	1.94	0.57 - 6.66	0.292	1.35	0.14 - 13.01	0.795
Vive con otros niños (<6 años) en casa									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	0.49	0.34 - 0.73	<0.001	0.67	0.41 - 1.10	0.109	0.74	0.30 - 1.83	0.518

Estación de toma de muestra									
Verano	Ref.			Ref.			Ref.		
Otoño	1,13	0,69 - 1,84	0.626	1,12	0,61 - 2,07	0.714	1,04	0,36 - 2,99	0.936
Invierno	1,30	0,75 - 2,23	0.348	1,34	0,67 - 2,69	0.408	0,96	0,27 - 3,43	0.953
Primavera	1,71	0,90 - 3,25	0.101	1,80	0,83 - 3,89	0.136	0,39	0,05 - 3,30	0.387
Uso de antibióticos previo (<3 meses)									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	1.57	0.98 - 2.51	0.061	1.30	0.72 - 2.37	0.387	0.67	0.18 - 2.46	0.546
Hospitalización previa (<3 meses)									
No	Ref.			Ref.			-		
Si	3.40	1.00 - 11.61	0.051	2.58	0.64 - 10.38	0.182	-	-	-

Análisis multivariado utilizando Regresión multinomial ajustado por sexo, edad (meses), lactancia materna exclusiva completa, síntoma respiratorio, asistencia a guardería, vive con otros niños en casa, estación de toma de muestra, uso de antibióticos previo, hospitalización previa y número de dosis de la PCV13.

RP: Razón de prevalencias ajustada. IC 95%: Intervalo de confianza al 95%. Ref: Categoría de referencia.

-: Categoría sin observaciones

Anexo 4. Factores asociados entre la inmunización con la PCV13 y el estado de colonización (Grupo comparador: Colonizados solo *por S. aureus*) (Análisis de sensibilidad).

Características	Estado de colonización								
	No colonizado			Solo <i>S. pneumoniae</i>			Co-colonizado		
	RPa	IC 95%	p	RPa	IC 95%	p	RPa	IC 95%	p
Recibió al menos una dosis de PCV13									
No recibió PCV13	Ref.			Ref.			Ref.		
Recibió al menos una dosis	2.11	1.15 - 3.86	0.016	6.51	2.35 - 18.03	<0.001	3.89	0.72 - 21.20	0.116
Sexo									
Femenino	Ref.			Ref.			Ref.		
Masculino	0.93	0.63 - 1.36	0.697	0.95	0.58 - 1.56	0.849	2.23	0.85 - 5.82	0.102
Edad (meses)	1.00	0.96 - 1.03	0.810	0.98	0.94 - 1.02	0.362	0.97	0.90 - 1.06	0.549
Lactancia materna exclusiva completa									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	1.68	1.06 - 2.69	0.029	2.05	1.16 - 3.62	0.014	1.62	0.57 - 4.56	0.361
Síntoma respiratorio									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	1.20	0.79 - 1.84	0.394	2.35	1.40 - 3.97	0.001	1.64	0.63 - 4.22	0.309
Asistencia a guardería									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	1.01	0.42 - 2.46	0.975	0.52	0.15 - 1.77	0.292	0.70	0.08 - 6.42	0.749

Vive con otros niños (<6 años) en casa									
No	Ref.								
Si	0.74	0.50 - 1.10	0.135	1.50	0.91 - 2.45	0.109	1.11	0.45 - 2.75	0.820
Estación de toma de muestra									
Verano	Ref.			Ref.			Ref.		
Otoño	1,01	0,62 - 1,63	0,977	0,89	0,48 - 1,64	0,714	0,93	0,32 - 2,67	0,894
Invierno	0,97	0,55 - 1,69	0,907	0,75	0,37 - 1,49	0,408	0,72	0,20 - 2,59	0,613
Primavera	0,95	0,54 - 1,66	0,860	0,56	0,26 - 1,20	0,136	0,22	0,03 - 1,80	0,157
Uso de antibióticos previo (<3 meses)									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	1.20	0.76 - 1.90	0.432	0.77	0.42 - 1.40	0.397	0.51	0.14 - 1.90	0.318
Hospitalización previa (<3 meses)									
No	Ref.			Ref.			-		
Si	1.32	0.59 - 2.94	0.500	0.39	0.10 - 1.56	0.182	-	-	-

Análisis multivariado utilizando Regresión multinomial ajustado por sexo, edad (meses), lactancia materna exclusiva completa, síntoma respiratorio, asistencia a guardería, vive con otros niños en casa, estación de toma de muestra, uso de antibióticos previo, hospitalización previa y número de dosis de la PCV13.

RPa: Razón de prevalencias ajustada. IC 95%: Intervalo de confianza al 95%. Ref: Categoría de referencia.

-: Categoría sin observaciones