



11219  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACION  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA  
HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA  
"DR. DANIEL MÉNDEZ HERNÁNDEZ"

Prevalencia de colonización nasofaríngea por  
*Streptococcus pneumoniae* resistente a  
penicilina en pacientes con mieloma múltiple

TESIS DE POSTGRADO  
PARA OBTENER EL TITULO DE:  
INFECTOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA  
DR. ELISEO ALEJANDRO AGUILLÓN GARCÍA

ASESOR  
DR. EDUARDO MATEOS GARCÍA



MEXICO, D. F.

FEBRERO 2005.

m341503



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALI  
DE LA BIBLIOTECA

**CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA  
HOSPITAL DE INMECTOLOGÍA  
"DANIEL MÉNDEZ HERNÁNDEZ"  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Eliseo Alejandro

Aguillón Carera

FECHA: 01 03 2005

FIRMA: 

---

**DR. MANUEL PACHECO RUELAS**  
**DIRECTOR**  
**HICMNR, IMSS**



---

**DRA. VERÓNICA GAONA FLORES**  
**Coordinadora de Enseñanza e Investigación**  
**HICMNR, IMSS**

---

**DR. JOSÉ LUIS FUENTES ALLEN**  
**Jefe de departamento clínico**  
**HICMNR, IMSS**

*Elena Urdez Hdz*

**DRA. ELENA URDEZ HERNÁNDEZ**  
**Profesora titular del curso de Infectología**  
**HICMNR, IMSS**

*Eduardo Mateos García*

**DR. EDUARDO MATEOS GARCÍA**  
**Asesor de tesis**  
**Médico adscrito al servicio de adultos**  
**HICMNR, IMSS**

*Eduardo Mateos García*

REGISTRACIÓN  
POSGRADO  
MEDICINA  
HICMNR, IMSS

**Colaboradores:**

**Dra. Ysabel Padilla González.**

**Médico adscrito al servicio de Hematología, HE CMNR.**

**QFB. Laura Angélica Javier González.**

**Químico adscrito al laboratorio de Microbiología, HI CMNR**

**M.C. Gabriela Echaniz Avilés**

**Jefe de Departamento en área clínica A. Departamento de diagnóstico epidemiológico. CISEI, INSP.**

**Biol. María Noemí Carnalla Barajas**

**Investigador en ciencias médicas. CISEI, INSP**

**Biol. Araceli Soto Noguero**

**Investigador en ciencias médicas. CISEI, INSP**

**Dr. Jesús Gaytán Martínez**

**Médico adscrito al servicio de adultos, HI CMNR**

## ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	19
OBJETIVOS	20
PLAN DE INVESTIGACIÓN	21
METODOLOGÍA	22
MÉTODOS DE VALORACIÓN	23
MATERIALES DE ESTUDIO	28
ESTADÍSTICA	31
RECURSOS	32
RESULTADOS	33
FÍGURAS	36
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	46
ANEXO A	50
ANEXO B	51
ANEXO C	52
ANEXO D	53
ANEXO E	54

## RESUMEN

### Introducción

*Streptococcus pneumoniae*, particularmente las cepas con resistencia a penicilina, es una causa frecuente de enfermedad invasiva, especialmente en sujetos con compromiso de la función inmune, tal es el caso de los pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple. En la mayoría de los casos, la colonización nasofaríngea precede a la enfermedad invasiva, por lo tanto es necesario conocer la prevalencia de colonización en esta población, para establecer medidas profilácticas y terapéuticas.

**Objetivos:** Determinar la prevalencia de portadores de *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina en adultos con mieloma múltiple que reciben atención médica en el servicio de Hematología del Hospital de Especialidades (HE) del Centro Médico Nacional La Raza (CMNR), e identificar los serotipos de las cepas de *S. pneumoniae* aisladas durante el estudio.

**Diseño:** Estudio transversal, descriptivo.

**Pacientes y métodos:** Del 1º de junio al 15 de diciembre del 2004, se incluyeron pacientes con mieloma múltiple,  $\geq 16$  años, con atención médica en consulta externa del servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del CMNR del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Sin tratamiento antibiótico en las dos semanas que precedían a su ingreso al estudio, ni candidosis orofaríngea o infección sintomática de las vías respiratorias superiores o inferiores. Se capturó: edad, género, fecha de diagnóstico de mieloma múltiple y tiempo de evolución hasta ese momento, etapa clínica de la enfermedad, quimioterapia, recaída de la enfermedad, hacinamiento, convivencia con menores de cinco años, antecedente de vacunación durante los cinco años previos, uso reciente de cualquier clase de antibiótico que no se catalogará como criterio de no inclusión, y hospitalización durante el mes precedente.

Después de su ingreso al estudio, se tomó una muestra de la nasofaringe con hisopo de alginato de calcio, que se transporto en 1ml de medio de Stuart al Laboratorio de Microbiología



del Hospital de Infectología, CMNR. Ahí se inoculó en agar sangre de carnero para después seleccionar dos a cinco colonias presuntivas que se inocularon en agar sangre con estría cerrada para identificación con disco de optoquina. El resto de la muestra se envió al Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública en un medio con base en agar sangre-chocolate para serotipificación mediante la reacción de Quellung y determinación de susceptibilidad a penicilina, previo escrutinio con disco de oxacilina de 1µg, con prueba de dilución en caldo Mueller-Hinton catión-ajustado suplementado con sangre de caballo lisada 3%, el reporte se hizo en MIC.

**Resultados:** Se captaron 91 pacientes con mieloma múltiple, de los cuales se incluyeron 55 sujetos; en seis (11%) se aisló *S. pneumoniae*. La mediana de edad fue 60 años (48-74 años), la mitad son hombres (3/6). La mediana del tiempo de evolución de la enfermedad a partir del diagnóstico fue 12 meses (8-35 meses). La mitad se encontraban con enfermedad en etapa III. Todos recibían quimioterapia, sin embargo, sólo en un paciente (16.7%) fue por recaída de la enfermedad. Tres refirieron convivencia con menores de cinco años. Sólo en un caso se manifestó uso reciente de antibióticos y otro había recibido vacuna de polisacárido capsular dos años antes. No hubo casos con hacinamiento u hospitalización. En la mitad de estos pacientes (n=3) se encontró colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* resistente a penicilina. Los serotipos encontrados fueron 3, 34 y 17, todos susceptibles a penicilina y 6B, 19A y 35B con resistencia de alto nivel a penicilina. Todos fueron susceptibles a cefotaxima.

**Conclusiones:** La prevalencia de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* en pacientes adultos con mieloma múltiple del HE del CMNR es semejante a la reportada en adultos inmunocompetentes, pero la frecuencia de resistencia de alto nivel a penicilina es superior a la encontrada en adultos y guarda alguna semejanza con la descrita en niños. Ninguna de las variables estudiadas aquí es más frecuente en la colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* en adultos con mieloma múltiple del HE del CMNR. Esta prevalencia aumenta la importancia de

la inmunización con vacuna de polisacárido capsular, la cual debe aplicarse a todos los pacientes con mieloma múltiple para protección contra enfermedad invasora.

**Palabras clave:** Prevalencia, *Streptococcus pneumoniae*, neumococo, colonización, estado de portador, mieloma múltiple.

## ABSTRACT

### Introduction

*Streptococcus pneumoniae*, particularly penicillin-resistant strains is a common cause of invasive disease, especially in immunocompromised host such as patient with diagnosis of multiple myeloma. In most cases nasopharyngeal colonization precedes invasive disease. For this reason the knowledge of the colonization rate is necessary for the establishment preventive and therapeutic measures.

**Aim:** To determine the prevalence rate of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* and the serotypes involved in adult with multiple myeloma, those receive medical care in the Hematology Department, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional La Raza.

**Design:** Cross-sectional study, descriptive.

**Patient and method:** Between June to December, 2004, were included patients with multiple myeloma,  $\geq 16$  years, with medical care in the hematological department of the Hospital de Especialidades of the Centro Médico Nacional La Raza, Instituto Mexicano del Seguro Social. Without antibiotic treatment in the preceding two weeks at this study, neither oropharyngeal candidiasis, symptomatic upper or lower respiratory infection. We analyzed age, gender, multiple myeloma diagnosis and its evolution time, clinical stage, chemotherapy, relapse, crowding, to have siblings of  $\leq 5$  years, vaccination history, recent use of antibiotic, and hospitalization during the preceding month. Nasopharyngeal samples were obtained with calcium alginate wire swab and were placed in 1 mL of Stuart transport medium and send to the Microbiology Laboratory of the Hospital de Infectología, CMNR. Swabs were streaked onto sheep blood agar. Two to five suspected colonies were isolated and inoculated newly onto sheep blood agar (closed streaked) for identification with optochin disk. The isolates were sent to the Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas of the Instituto Nacional de Salud Pública in blood-chocolate agar for

serotyping through the Quellung reaction and determination of susceptibility to penicillin, previous test with oxacillin disk, with Mueller-Hinton broth supplemented with 3% horse blood. The result was reported by MIC.

**Results:** Ninety one patient with multiple myeloma were captured. However, we were included 55 patient; in six (11%) *S. pneumoniae* was isolated. The age median was 60 years (48-74 years), fifty percent were male (3/6). The median of the evolution time of the disease from diagnostic was 12 months (8-35 months). Fifty percent suffer disease in clinical stage III. All have received chemotherapy, only one patient (16.7%) had relapse. Three have referred sibling  $\leq 5$ -year old. Only one patient was referred recent use of antibiotics and other had received polysaccharide capsular vaccine two years before. None expressed crowding or hospitalization. Fifty percent (n = 3) were nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. We were found the following serotypes: 3, 34 and 17 susceptible to penicillin; 6B, 19A and 35B with high level resistance to penicillin. All strains were susceptible to cefotaxime.

**Conclusions:** The prevalence rate of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in patient adult with multiple myeloma of the HE CMNR is similar to the reported in the immunocompetent adult, but the high level resistance to penicillin frequency is superior at the found in adult and has similarity to the described in children. None study variable it is more frequent in the nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in patient adult with multiple myeloma of the HE CMNR. Since the high prevalence of penicillin-resistant *S. pneumoniae* the polysaccharide capsular vaccine must be applied to all the patients with multiple myeloma for protection against invasive disease.

**Key words:** prevalence rate, *Streptococcus pneumoniae*, pneumococcus, colonization, carriage state, multiple myeloma.

## INTRODUCCIÓN

Sternberg y Pasteur aislaron por primera vez a *S. pneumoniae* en 1880. En la misma década, Fraenkel y Weichselbaum lo identificaron como el agente etiológico más frecuente de la neumonía adquirida en la comunidad. En 1928, Griffith observó el "principio de transformación" que consiste en la adquisición de cápsula por una cepa de neumococo, con pérdida constitutiva de la cápsula, cuando se inyecta en un ratón junto con una cepa de neumococo capsulado muerto por calor; el primero adquiere el mismo tipo capsular que la cepa muerta por calor. Años después se demostró que este "principio de transformación" era intercambio de DNA.<sup>1,2</sup>

*Streptococcus pneumoniae* es una de las especies del género *Streptococcus*, perteneciente a la familia *Streptococcaceae*, que tiene como característica la ausencia de citocromos y catalasa. La carencia de catalasa impide la degradación del peróxido de hidrógeno formado por las células, haciendo necesario una fuente exógena, como los eritrocitos intactos, para prevenir la muerte de las cepas en los cultivos. Son cocos Gram positivos que crecen como célula única, diplococos o en cadenas de longitud variable. Presenta un crecimiento difuso en los caldos, y en agar tiene el aspecto de colonias pequeñas grisáceas y mucoides, rodeadas de una zona verde de hemólisis parcial (hemólisis alfa) en el agar sangre de carnero al 5%. Las colonias jóvenes de neumococos son abultadas, pero después de 24 a 48 horas de cultivo, se achatan y puede formarse una depresión en el centro de cada colonia (apariencia umbilicada). Eso no ocurre con los estreptococos viridans.

Sus requerimientos nutricionales son complejos e incluyen colina, que se incorpora con el ácido teicoico de la pared celular. Es un microorganismo difícil de cultivar, por lo que requiere de medios enriquecidos para su aislamiento primario, como agar tripticasa soya, agar columbia, agar infusión cerebro corazón o agar sangre, enriquecido con 5% de sangre de carnero, sangre

de caballo o sangre de conejo. Para un óptimo crecimiento de *S. pneumoniae* en medio líquido, es importante que los medios utilizados sean caldos suplementados con carbohidratos fermentados como: infusión cerebro corazón y Todd Hewitt.

*S. pneumoniae* es anaerobio facultativo, algunas cepas son dependientes de CO<sub>2</sub> (5 a 7%) atmósfera que en general favorece un mejor crecimiento de las cepas. La gran mayoría de las cepas se pueden cultivar en forma aeróbica, presentando un crecimiento relativamente bueno, ocasionalmente se observan colonias pequeñas. Cuando se cultiva en forma aeróbica *S. pneumoniae* acumula gran cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que puede inhibir su desarrollo. El rango de temperatura a la cual se debe incubar *S. pneumoniae* es de 35 a 37°C.

Producen una enzima autolítica, L-alanin-muramyl amidasa, que hidroliza la pared celular y se activa por detergentes, incluyendo bilis, que resulta en lisis celular. El crecimiento es inhibido por hidrocloreuro de etilhidropcupreína (optoquina), sin embargo, hay cepas resistentes. Estas características en conjunto permiten la identificación de las cepas.<sup>1,3</sup> Las pruebas fisiológicas fenotípicas lo colocan en el grupo mitis de los estreptococos viridans.<sup>3</sup>

Se han caracterizado varios antígenos de superficie: el polisacárido C de la pared celular; las proteínas M específicas, con propiedades químicas similares a las de *Streptococcus pyogenes*, relacionadas con otras proteínas de superficie específicas de tipo, conocidas como PspA (adhesina A de superficie neumocócica)<sup>1</sup> y los polisacáridos capsulares específicos de tipo (oligosacáridos en repetición, con dos a ocho monosacáridos). La cápsula aunque no es tóxica, ejerce un efecto antifagocítico esencial para la virulencia y la capacidad de producir infección. Con base en las diferencias inmunohistoquímicas de la estructura capsular, el neumococo se divide en aproximadamente 40 serogrupos y 90 serotipos. Los serogrupos son grupos de serotipos que poseen reacción cruzada de sus anticuerpos en modelos animales (reacción inmune cruzada).

La nomenclatura danesa clasifica los serotipos de acuerdo a sus características estructurales y antigénicas. Esta subclasificación es la más importante por su influencia fundamental sobre la inmunidad del hospedero humano.<sup>1, 3, 4</sup>

La relevancia clínica de esta agrupación depende específicamente del serogrupo/serotipo.

En algún momento durante el encuentro entre el hospedero y el neumococo, este último puede ganar acceso al oído, pulmón o torrente sanguíneo, pero no necesariamente provoca síntomas. Algunos casos desarrollarán síntomas de otitis media, neumonía, bacteremia o meningitis. Los factores responsables para la transición de portador a enfermedad son poco claros. Se consideran tres niveles de encuentro: 1) colonización *per se*, todos los neumococos tienen la capacidad de colonización, variable para cada serotipo, lo que favorece que algunos sean más frecuentes que otros; 2) entrada a otro sitio corporal por las capacidades propias de cada serotipo, en ocasiones favorecido por la disrupción de las barreras naturales, por ejemplo, el daño del epitelio bronquial después de la infección por el virus influenza. Algunos virus y citocinas también incrementan la adherencia bacteriana *in vitro* y pueden tener un efecto similar *in vivo*; 3) factores del hospedero (respuesta inmune) que contribuyen al desarrollo de síntomas en el sitio infectado.<sup>4, 5</sup>

La cápsula de polisacárido es el factor de virulencia más importante del neumococo, ya que lo protege de fagocitosis. La pared celular, inmediatamente debajo de la cápsula, esta compuesta de polisacárido, ácido teicoico y varias proteínas de superficie asociadas a pared celular, es la responsable de la respuesta inflamatoria intensa que acompaña a la infección neumocócica por ser quimio-atrayente, activar la cascada del complemento e inducir la producción de citocinas. Es así que la protección contra infección neumocócica esta mediada por fagocitosis dependiente de opsoninas. Se cree que la opsonización dependiente de complemento e iniciada por anticuerpos, que activa la vía clásica del complemento, es el mecanismo inmune principal que protege contra las infecciones por neumococo. Los mecanismos de depuración

dependen de la interacción anticuerpos específicos de tipo (IgG1 e IgG2, IgM, IgA), complemento, y neutrófilos o células fagocíticas del pulmón, hígado o bazo. Cualquier situación que condicione la ausencia de anticuerpos específicos favorecerá la entrada al hospedero a través del intersticio pulmonar que resulta en diseminación linfática y la subsiguiente bacteremia.<sup>6</sup> Es por eso que las situaciones de inmunocompromiso, como el caso de mieloma múltiple, se hace evidente la predisposición a infección y enfermedad invasora por neumococo. La colonización nasofaríngea es un evento constante y siempre precede a enfermedad. En el estado de colonización, la asociación hospedero-microbio, puede resultar en alteración de la homeostasis del hospedero, como estimulación del sistema inmune, pero no resulta en daño de suficiente cantidad o calidad para causar enfermedad clínica.<sup>7</sup>

El neumococo es transitorio en la microflora de la nasofaringe, particularmente en niños, en un estado de portador altamente dinámico que puede persistir por varias semanas o incluso meses. La variabilidad en tiempo dependerá del grupo de edad afectado y el serotipo implicado en la colonización, en general, los niños portan al neumococo por más tiempo que los adultos. Se considera que existen dos patrones de colonización nasofaríngea: en el primero, hay adquisición universal en los primeros meses de vida; mientras que el segundo, ocurre en grupos donde el tiempo de la primera colonización es más común en los segundos seis meses de vida o a mayor edad. Es probable que ocurra en personas de todas las edades al menos una vez en la vida; las circunstancias que cursan con mayor colonización son las que favorecen hacinamiento como guarderías, asilos, hospitales y cárceles. También, se ha demostrado que tanto niños como adultos pueden portar más de un serotipo de neumococo en un mismo momento.<sup>8</sup>

Aunque hay diferencias en la epidemiología de los serotipos que colonizan nasofaringe en niños y adultos, por la mayor diversidad notada en los últimos, se reconoce que 6B, 19F y 23F son los más comunes y se considera que poseen menor capacidad invasora. Los serotipos que no están en la vacuna conjugada 8, 38, 33F (aunque el serotipo 38 tampoco se encuentra en la



vacuna de polisacárido capsular) no son colonizantes frecuentes pero son más invasores, una situación que también ocurre con los serotipos 5, 7F y 1.<sup>6</sup>

La colonización con neumococo resistente a antibióticos tiene un papel crucial en la diseminación en niños, más entre los que mantienen contacto estrecho, particularmente en guarderías. La transmisión es fácil, por medio de gotas de secreciones de persona a persona, y se incrementa durante el curso de otra infección respiratoria cuando la diseminación de las secreciones por tos y estornudos aumentan. Diversos estudios han documentado que la adquisición del neumococo ocurre en las primeras etapas de la vida y es más prevalente en niños de países en desarrollo y poblaciones indígenas de algunos países desarrollados.<sup>5, 8</sup>

Dagan<sup>9</sup> observó los cambios de la colonización nasofaríngea en los tres a cuatro días que siguieron al tratamiento antibiótico con diversas clases de otitis media aguda (OMA), en niños menores de dos años, mediante cultivo nasofaríngeo, antes y después de dicho tratamiento. Encontró que ocurría selección de flora hacia organismos resistentes en un período de tiempo corto, con emergencia inmediata de nuevas cepas de *S. pneumoniae* no detectadas inicialmente (con cultivo inicial negativo) y frecuentemente resistentes al fármaco utilizado. Consistente con adquisición *de novo* de material genético en poco tiempo.

El estado de portador (o colonización) nasofaríngeo, así como la enfermedad neumocócica son menos frecuentes en adultos que en niños; diferencia no explorada suficientemente y que se fundamenta en estudios con población infantil, por lo que se ha atribuido a la adquisición de anticuerpos contra el polisacárido capsular bacteriano.<sup>5,8</sup>

Borer,<sup>10</sup> realizó un estudio transversal en una comunidad israelí mediante cultivo nasofaríngeo de niños, adolescentes y adultos, los aislamientos se caracterizaron por electrofóresis en gel por campos pulsados (PFGE, por sus siglas en inglés); al comparar los aislamientos encontró que la misma cepa no coloniza frecuentemente niños o adultos de la misma familia, los factores de riesgo para colonización por neumococo difieren en la población adulta y no incluyen

contacto estrecho con niños (hogar o sitio de trabajo). Estos autores concluyeron que existe una barrera inmune efectiva para la transmisión del neumococo de niños hacia los adultos.

En casi todos los ensayos clínicos, con pacientes pediátricos, se advierte reducción del estado de portador con los serotipos encontrados en las vacunas conjugadas e incremento del estado de portador con los serotipos que no están en las vacunas. La extensión, duración y significado clínico de este reemplazo de serotipos no se conoce del todo. Los serotipos no encontrados en las vacunas se consideran menos virulentos que los que se encuentran en las vacunas, por lo que, aún este reemplazo de serotipos, después de la vacunación en masa, se considera que tendrá una repercusión mínima sobre la prevalencia de enfermedad invasora por neumococo. El efecto del reemplazo puede ser más significativo en la otitis media, ya que se ha notado un aumento significativo de los casos causados por serotipos no encontrados en la vacuna. Una consecuencia del reemplazo de serotipos después de la vacunación en masa es la mayor presión selectiva para la emergencia de resistencia a la penicilina y otros múltiples antibióticos entre estos serotipos no encontrados en las vacunas, que se hará más prevalente en la nasofaringe de los niños. Actualmente todas las clonas resistentes a antibióticos de *S. pneumoniae* son de los serotipos encontrados en las vacunas o serotipos para los cuáles las vacunas proporcionan protección cruzada, notablemente los serotipos 6B, 6A, 9V, 14, 19F y, 23F.<sup>11, 12, 13, 14, 15, 16</sup>

Aunque el cambio de serotipo pareciera relativamente común, con base en el análisis de las poblaciones de neumococo y los múltiples orígenes de las variantes de serotipos, de las principales clonas resistentes a antibióticos, se ha encontrado que estos eventos no son frecuentes, y no pueden ser observados fácilmente con el monitoreo frecuente del portador de neumococo. Esto no implica que estos eventos son insignificantes en la evolución del neumococo, ya que los aislados que se someten a cambio de serotipo pueden incrementar en frecuencia dentro de la nasofaringe, por azar o por selección que favorezca al serotipo variante,

lo que favorece la posibilidad de transmisión a nuevos hospederos. No está claro si el cambio de serotipo tiene una consecuencia importante, pero la posibilidad de selección por antibióticos lleva a la emergencia de las variantes de serotipos de las clonas resistentes a antibióticos en la población vacunada.<sup>11, 12, 13, 14, 15, 16</sup>

Brueggemann<sup>17</sup> comparó los aislamientos de niños pequeños con enfermedad invasora con los obtenidos en la nasofaringe (colonización) de niños del mismo grupo de edad en la misma comunidad y el mismo período de tiempo. Encontró que los aislamientos invasores son genéticamente menos diversos que los colonizantes y algunas secuencias tipo (ST) parecen estar asociadas significativamente con enfermedad invasora o colonización; no hubo diferencia significativa entre las clonas dentro de los serotipos. Esto sugiere que la cápsula es un marcador de invasión más importante que el genotipo definido por ST.

*Streptococcus pneumoniae* es agente etiológico común en infecciones respiratorias (otitis media, sinusitis y neumonía), así como de enfermedad invasora (EIN), por diseminación hematogena, siendo una de las más importantes por su gravedad, meningitis; afecta principalmente a niños menores de 5 años, adultos mayores a 60 años de edad, individuos con enfermedad cardiopulmonar crónica, ancianos e, inmunocomprometidos de todas las edades. La incidencia anual de EIN varía según la región geográfica a que se refiera y tiene predilección evidente sobre estos grupos de riesgo, así, en los Estados Unidos de Norteamérica la incidencia de bacteremia se estima de 15-30 casos por 100,000 habitantes cada año; la tasa es más alta para personas  $\geq 65$  años (50-83 casos por 100, habitantes cada año) y niños  $\leq 2$  años (160 casos por 100,000 habitantes cada año); si a esto se agrega que la mitad de los 2.6 millones de casos de niños menores de 5 años que mueren por neumonía cada año, principalmente en el mundo en desarrollo, se atribuyen a *S. pneumoniae* como causa única o en conjunto con una infección respiratoria viral, malnutrición ó, infección por VIH, es entendible el gran impacto económico y social que lo coloca como un problema de salud en el mundo. La mortalidad atribuible a la bacteremia por neumococo es 15% a 20% entre adultos; en ancianos,

la tasa aproximada es de 30% a 40%. También se reconoce como responsable del 25% a 40% de casos de meningitis bacteriana, 30% a 50% de otitis media. Otra vez son los ancianos, entre adultos de países desarrollados, el grupo más afectado, ya que neumococo causa 25% a 50% de los casos de neumonía comunitaria que requiere de hospitalización.<sup>18, 19</sup>

Las diferencias geográficas en la incidencia de enfermedad invasora no han sido del todo exploradas en adultos que viven en países en desarrollo, sin embargo, en una revisión de estudios<sup>20</sup> que buscan evaluar eficacia de la vacuna de polisacárido revela que el comportamiento de la enfermedad tiene una distribución que semeja a la observada en países desarrollados, la incidencia es menor que en los niños menores de 5 años para incrementar nuevamente en adultos que superan los 40 años; también sobresalen los otros grupos de riesgo no relacionados con la edad, como en mineros de África y el inmunocompromiso de la infección por VIH donde la incidencia es superior en todos los estratos de edad.

La vacuna de polisacárido capsular confiere protección contra enfermedad invasora en los grupos de riesgo y contiene los serotipos 23V 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F que ocasionan el 80% a 90% de los casos de enfermedad invasora en niños y adultos. Es necesario comentar, sin embargo, los resultados controversiales de los estudios que evalúan la eficacia de la vacuna en los ancianos, particularmente en la prevención de neumonía bacterémica, aunque otros reportes avalan una disminución de la mortalidad por cualquier causa en co-morbilidad con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Tal parece que la principal limitación de la vacuna de polisacárido, en este grupo de pacientes y posiblemente en quienes cursan con inmunocompromiso, es la ausencia de memoria inmunológica que se nota por la caída de los niveles de anticuerpos a niveles semejantes a los encontrados antes de vacunación en un período que varía entre tres y siete años. Más aún, la respuesta inmune no es semejante entre individuos y serotipos; como en el caso del serotipo 6B, se ha encontrado que la efectividad de la vacunación es de 46% con niveles de anticuerpos que persisten durante tres años, contrario a lo encontrado con el serotipo

14, donde la efectividad de la vacunación es de 62% y los niveles de anticuerpos persisten por 7.7 años. Esta situación ha propiciado que se plantee el uso de vacuna conjugada en ciertos adultos en riesgo en base a la epidemiología de los serotipos por región geográfica y frecuencia de enfermedad invasora<sup>21</sup>.

La variación temporal en la sero-epidemiología del neumococo en un período o décadas, así como en la distribución geográfica y por edades demostrada durante los estudios de vigilancia, ha llevado a proponer que cada serotipo debe considerarse como un patógeno por separado en una visión epidemiológica; los diferentes serotipos varían en prevalencia de enfermedad invasora.<sup>4, 22</sup>

Varios estudios epidemiológicos se han realizado en diversas áreas geográficas con niños y adultos (principalmente en el primer grupo de edad) para entender las tendencias de los serogrupos más comunes como causa de enfermedad. Estos estudios han establecido la epidemiología específica de serogrupo, al analizar por separado los diferentes sitios clínicos de aislamiento. Al menos 40 serogrupos son potencialmente patógenos y aproximadamente son 15 serotipos los que están implicados directamente como causa de enfermedad invasora. Invariablemente de forma global los serogrupos más frecuentes son: el 14, 6, 19, 3, 23, 1, 9, 4, 8, 18, 7 y, 5; y representan el 80.9% de todos los aislamientos.<sup>4, 12, 13, 14, 15, 16, 22, 23, 24, 25, 26</sup>

Aunque se ha notado una predilección por algunos serotipos hacia la invasión de sitios estériles específicos, esta asociación parece reflejar más la verdadera incidencia por grupo de edad y su distribución geográfica, además de la selección favorecida por el uso de antibióticos, como se ha demostrado en Latinoamérica, donde los serotipos más frecuentes (14, 6A/6B, 5, 1, 23F, 19F, 18C, 19A, 9V, 7F, 3, 9N y, 4) también ocupan un gran porcentaje (serotipos 14, 23F y 6B en 78%) de cepas resistentes. Y de forma contundente, también se demostró proliferación clonal de las cepas con resistencia a antibióticos. Por lo tanto es probable que la distribución

geográfica de un serotipo sea reflejo de las características medio ambientales que favorezcan su transmisión.<sup>12, 13, 14, 15, 16, 24, 25, 26</sup>

Nuevamente sobresalen los grupos de riesgo, particularmente las situaciones clínicas que imponen inmunocompromiso, por su predisposición particular a enfermedad invasora así como pobre respuesta a la vacuna de polisacárido capsular. Sin embargo, es necesario destacar que hasta el momento la mayoría de los estudios incluyen pacientes con infección por VIH como entidad más estudiada, y en quienes se ha demostrado la predisposición de hasta 40 veces en la tasa de ataque de enfermedad invasora.

Los pacientes con mieloma múltiple (enfermedad poco frecuente que contribuye con el 1% de las neoplasias hematológicas) tienen anomalías graves en la inmunidad humoral, que consiste en la formación deficiente de anticuerpos después del estímulo antigénico y niveles séricos deficientes de inmunoglobulina policlonal. Si a esto se agrega la edad de presentación, habitualmente  $\geq 60$  años, y el uso de terapia con agentes citotóxicos, alquilantes y esteroides para el control de la enfermedad, encontramos entonces, al menos tres situaciones que avalan la mayor predisposición a infección y enfermedad invasora. Situación poco estudiada hasta el momento. Se sabe que la frecuencia de infecciones varía de 1.29 a 2.22 episodios por paciente-año. Esta susceptibilidad modifica con la fase y progresión de la enfermedad, es en la fase de inducción (primeros dos meses de terapia) cuando la incidencia incrementa a 4.68 infecciones por paciente-año. Los factores de riesgo que se asocian a esto son: niveles de creatinina sérica en  $\geq 2$  mg/dL, deficiencia de inmunoglobulinas policlonales, etapa clínica III y mieloma de cadenas ligeras.<sup>27</sup>

El aumento en la prevalencia de neumococo resistente a penicilina y otros antimicrobianos ha comprometido la efectividad del tratamiento antibiótico con impacto clínico que varía acorde al sitio de infección, el grado de penetración del antibiótico a este sitio; y la capacidad de la

respuesta inmune para depurar la infección. La resistencia del neumococo puede llevar a falla de tratamiento en pacientes con meningitis y otitis media aguda.<sup>2, 28, 29</sup>

*Streptococcus pneumoniae* desarrolla resistencia a la penicilina por modificación de las proteínas fijadoras de penicilina (PBPs, por sus siglas en inglés). La resistencia *de novo* rara vez es resultado de mutaciones puntuales únicas o por plásmidos, excepto para resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol (TMP/SMZ) y resistencia de bajo nivel a fluoroquinolonas. Los mecanismos principales son: transformación (captación de DNA libre de cepas o especies estrechamente relacionadas e incorporado por recombinación homóloga) o transferencia por medio de transposones (segmentos grandes de DNA que codifican resistencia a antibióticos y funciones de auto-transferencia). El hecho que tanto el neumococo susceptible como el neumococo resistente a antibióticos sea portado asintóticamente en la nasofaringe influyen en la dinámica de resistencia neumocócica; reducir el número de individuos infectados en una población no necesariamente reduce el potencial para la transmisión de cepas resistentes dentro de la comunidad.<sup>28</sup> Sobresale entonces, la importancia que existe para el análisis de la población de *S. pneumoniae* que coloniza la nasofaringe de forma asintomática. Diferentes estudios resaltan los factores que se asocian con colonización nasofaríngea por neumococo resistente a antibióticos, es destacable la asociación con uso previo de antibióticos.

Regev<sup>30</sup> y otros autores,<sup>31, 32</sup> encontraron asociación a colonización por neumococo resistente a antibióticos en niños con: estancia en guardería, edad menor de seis años y, contacto estrecho con otro niño que este colonizado con neumococo resistente a penicilina.

En Latinoamérica, a través del grupo SIREVA-Vigía, que monitorea la EIN en niños menores de 6 años,<sup>26</sup> reporta 28.6% de aislamiento con susceptibilidad disminuida a penicilina (17.3% de nivel intermedio; 11.3% de alto nivel), con variación geográfica. En general, los serogrupos 14 y 23F ocupan el 66.6% de la resistencia. México, durante 6 años de vigilancia, no ha mostrado

cambios significativos en su tendencia y tiene la tasa más alta de resistencia (25.8% de nivel intermedio; 21.1% de alto nivel); 62% pertenecen al tipo 23F, 36% al tipo 14.

La mayoría de los estudios se han realizados en niños como población predominante, poco se conoce acerca de la dinámica y los factores que favorecen la colonización por neumococo resistente en adultos, aún más en adultos con situaciones específicas, como el inmunocompromiso.

Nava,<sup>33</sup> en un estudio retrospectivo, investigó los factores asociados a infección por neumococo resistente a penicilina en todos los grupos de edad. Encontró asociación entre infección con neumococo resistente a penicilina de nivel intermedio y edad de cero a cuatro años, la presencia de inmunocompromiso subyacente y, el uso previo de beta-lactámicos. La infección con neumococo resistente a penicilina de alto nivel se asoció sólo con el uso de beta-lactámicos.

A pesar de la predisposición ya comentada que tienen las personas con inmunocompromiso, específicamente en el subgrupo con mieloma múltiple, no hay estudios que avalen una mayor colonización o infección por *Streptococcus pneumoniae*, sólo hay reportes de caso que evidencian enfermedad invasora, incluso a pesar de vacunación,<sup>34</sup> recurrencia,<sup>35</sup> o, disminución no significativa en los títulos de anticuerpos con quimioterapia agresiva.<sup>36</sup> Por lo tanto, es importante conocer y entender la epidemiología local del neumococo en grupos específicos, donde el impacto de la enfermedad invasora es mayor.



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones bacterianas son la principal causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes con mieloma múltiple.<sup>27</sup> La mayoría de las infecciones graves (79%) como bacteremia y neumonía son causadas por *Streptococcus pneumoniae*. La susceptibilidad a las infecciones se atribuye a que los pacientes con mieloma múltiple cursan con deterioro de la inmunidad humoral, por formación deficiente de anticuerpos después de la estimulación antigénica y niveles bajos de inmunoglobulinas policlonales en suero. El origen de esta deficiencia es multifactorial, ya que participan factores dependientes de las células B, depresión del sistema reticuloendotelial y migración deficiente de los neutrófilos.<sup>27</sup>

Existe relación directa entre la colonización nasofaríngea y la presencia de enfermedad.<sup>6, 17, 37</sup>

Estudios realizados en poblaciones heterogéneas (inmunocompetentes, inmunocomprometidos, adultos, niños, etc.), han observado que los pacientes con mieloma múltiple tienen una frecuencia mayor de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* resistente a penicilina, que se relaciona directamente con el riesgo de desarrollar enfermedad grave. Sin embargo, estos estudios adolecen de problemas de diseño, entre otras razones porque no incluyen un grupo homogéneo de pacientes con mieloma múltiple. Así, se requiere conocer la prevalencia en un grupo de pacientes con características específicas, para a partir de éste estudio llevar a cabo las acciones necesarias para reducir el riesgo.

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la prevalencia de portadores de *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina entre los adultos con mieloma múltiple que se atienden en el servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional La Raza?

## OBJETIVOS

### Objetivo primario

Determinar la prevalencia de portadores de *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina en adultos con mieloma múltiple que reciben atención médica en el servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional La Raza.

### Objetivo secundario

Conocer los serotipos de las cepas de *S. pneumoniae* identificadas durante el estudio.

## PLAN DE INVESTIGACIÓN

### Resumen del diseño del estudio

Se trató de un estudio de prevalencia en el que se ingresó adultos con mieloma múltiple para muestra de nasofaringe con hisopo de alginato de calcio; a las cepas de *S. pneumoniae* identificadas se les realizaron escrutinio con disco de oxacilina en agar y pruebas de susceptibilidad a antibióticos, particularmente penicilina, mediante la prueba de dilución en placa. Los estudios se practicaron en el Laboratorio de Microbiología del Hospital de Infectología, del Centro Médico Nacional La Raza (identificación y escrutinio con disco de oxacilina) y el Centro de Investigación Sobre Enfermedades del Instituto Nacional de Salud Pública (susceptibilidad a antibióticos por microdilución en placa y serotipificación mediante reacción de Quellung, previa confirmación de identificación de la cepa y resultado del escrutinio con disco de oxacilina).

### Fase de selección:

La fase de selección inició después que el paciente aceptó su ingreso al estudio mediante la firma del consentimiento informado.

## **METODOLOGÍA**

### ***Criterios de inclusión***

- a. Mayores de 16 años.
- b. Masculinos o femeninos.
- c. Con atención médica en el servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional La Raza.
- d. Estén o no recibiendo plan quimioterapéutico.
- e. Vacunados y no vacunados contra neumococo.
- f. Que deseen participar en el estudio mediante consentimiento informado.

### ***Criterios de no inclusión***

- a. Pacientes que hayan recibido tratamiento antibiótico dos semanas previas a su ingreso al estudio.
- b. Sospecha de candidosis orofaríngea.
- c. Infección establecida y sintomática de vías respiratorias, superiores o inferiores.

### ***Criterios de exclusión***

- d. Pródromos de enfermedad infecciosa al momento de su inclusión.
- e. Imposibilidad para la toma de una muestra adecuada.
- f. Pérdida del aislamiento obtenido después de toma de espécimen con hisopo.

## MÉTODOS DE VALORACIÓN

### DEFINICIÓN DE VARIABLES

#### Colonización nasofaríngea por neumococo

**Conceptual:** Identificación de *Streptococcus pneumoniae* en una muestra obtenida de nasofaringe, con un hisopo, en un sujeto sin manifestaciones clínicas de infección.

**Operacional:** Detección de estreptococos con hemólisis alfa y resultado positivo a la prueba de optoquina y/o aglutinación en látex, de una muestra obtenida de nasofaringe con un hisopos, en un sujeto sin manifestaciones clínicas de infección.

#### Parámetros de medición e indicadores

**Escala:** Cualitativa nominal.

**Categoría:** Presente / ausente.

#### *Streptococcus pneumoniae* no susceptible a penicilina

**Conceptual:** *Streptococcus pneumoniae* que muestra susceptibilidad intermedia o resistencia a penicilina en pruebas estándar.

**Operacional:** *Streptococcus pneumoniae* con un diámetro  $\leq 20$  mm con disco de oxacilina (1 $\mu$ g), confirmado en un paso subsiguiente por microdilución en placa.

#### Parámetros de medición e indicadores

**Escala:** Cualitativa ordinal.

**Categoría:** Sensible o resistente; de acuerdo a los valores referidos por el comité para los estándares del laboratorio clínico (NCCLS, por sus siglas en inglés).

### **Vacunación anti-neumocócica**

**Conceptual:** Aplicación de la vacunación de polisacárido capsular polivalente en algún momento de la vida de una persona.

**Operacional:** Respuesta afirmativa por el paciente, a la pregunta directa de antecedente de vacunación neumocócica en algún momento de los últimos cinco años, durante el interrogatorio.

#### **Parámetros de medición e indicadores**

**Escala:** Cualitativa nominal.

**Categoría:** Si / no.

### **Hospitalización previa**

**Conceptual:** Antecedente de estancia en hospital.

**Operacional:** Respuesta afirmativa del paciente durante el interrogatorio, a la pregunta directa de hospitalización en un servicio médico o quirúrgico por un mínimo de 24 horas; se considerará hasta un mes como tiempo máximo.

#### **Parámetros de medición e indicadores**

**Escala:** Cualitativa nominal

**Categoría:** Si / no

### **Uso previo de antimicrobianos**

**Conceptual:** Antecedente de uso de algún antibacteriano.

**Operacional:** La utilización de algún antibacteriano, perteneciente a cualquiera de los grupos, más allá de los 14 días que preceden a su inclusión en el estudio, determinado mediante interrogatorio directo.

#### **Parámetros de medición e indicadores**

**Escala:** Cualitativa nominal

⊙

**Categoría:** Si / no

### **Quimioterapia**

**Conceptual:** Tratamiento con agentes químicos: alquilantes, citotóxicos, antimetabolitos, etc.

**Operacional:** Uso de algún fármaco, en el momento del ingreso al estudio, que pertenezca a este grupo y acorde a lo referido en el expediente clínico.

### **Parámetros de medición e indicadores**

**Escala:** Cualitativa nominal

**Categoría:** Si / no

### **Hacinamiento**

**Conceptual:** Exceso de población en un área habitacional.

**Operacional:** Cohabitación de  $\leq 5.5$  persona/m<sup>2</sup>. La estimación aproximada se realizará durante el interrogatorio, acorde a las dimensiones de la vivienda (área de superficie; uno o dos pisos; número de habitaciones) y el número de personas que la ocupan, según lo refiera el interrogado.

### **Parámetros de medición e indicadores**

**Escala:** Cualitativa nominal

**Categoría:** Si / no

### **Convivencia con menores de 5 años.**

**Conceptual:** Contacto con niños menores de 5 años de edad.

**Operacional:** Contacto directo con niños menores de 5 años al menos tres días por semana.

### **Parámetros de medición e indicadores**

**Escala:** Cualitativa nominal

**Categoría:** Si / no

### **Edad**

**Conceptual:** Tiempo en años que una persona ha vivido, a contar desde que nació.

**Operacional:** Número de años según lo referido por el paciente al momento del interrogatorio.

### **Parámetros de medición e indicadores**

**Escala:** Cuantitativa discreta

**Categoría:** 18, 19, 25, 40, etcétera.

### **Género**

**Conceptual:** Sexo biológico que proporciona las características que distinguen a los seres humanos.

**Operacional:** Características físicas externas que distinguen ambos géneros.

### **Parámetros de medición e indicadores**

**Escala:** Cualitativa nominal

**Categoría:** Masculino / femenino

### **Otras definiciones**

**Estreptococo:** Género bacteriano que se caracteriza al examen microscópico como cocos gram positivos y no productores de catalasa, esta última detectada mediante la reacción con peróxido de hidrógeno.



**Serotipo:** Sistema de clasificación numérica, tiene como fundamento la detección de los polisacáridos capsulares, con propiedades antigénicas, de *Streptococcus pneumoniae*.

**Serogrupo:** Agrupación de serogrupos, se estima por reacción antigénica cruzada de diversos serotipos, comparten la misma clasificación numérica y se agrega una letra a este sistema de clasificación.

**Mieloma múltiple:** Neoplasia de células plasmáticas que se caracteriza por proliferación monoclonal en médula ósea e infiltración a hueso adyacente; puede o no secretar proteínas monoclonales.

**Prevalencia:** Número de casos de una entidad que están presentes en un momento dado del tiempo de una población establecida.

**Nasofaringe:** Parte posterior de la fosa nasal, aproximadamente a la mitad o dos terceras partes de la distancia entre la narina y el oído

## **MATERIALES DE ESTUDIO**

### **Análisis de muestras de laboratorio**

Las muestras de exudado nasofaríngeo se tomaron en ayuno.

#### **Método de toma de muestras**

Se captaron todos los pacientes con mieloma múltiple que se atienden en el servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional La Raza durante el 1° de junio hasta el 15 de diciembre del 2004. A estos pacientes se les realizó los siguientes procedimientos:

- a. Captura de datos por interrogatorio.
- b. Tomado de muestras por hisopado nasofaríngeo

La toma de muestras se hizo en un lugar perfectamente iluminado y con el paciente cómodamente sentado. Al paciente, con la cabeza ligeramente hacia atrás, se le introdujo el hisopo (flexible, tamaño pediátrico, de aluminio con punta de alginato de calcio) paralelo al piso de la nasofaringe, que al pasar sin resistencia y alcanzar la faringe posterior, se rotó 180° para saturar la punta antes de retirarlo lentamente. Después se sumergió en 1ml de medio de transporte (Stuart),<sup>8, 38</sup> y con tijera estéril se cortó el exceso del hisopo para luego cerrar el tubo.

#### **Cantidad de la muestra**

Fue la obtenida a través de la técnica antes descrita con el hisopo de alginato de calcio.

#### **Métodos de procesamiento**

Una vez que llegó al laboratorio, el espécimen se inoculó en placa (agar sangre de carnero al 5%) y se incubó a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 12 a 24 horas al cabo de lo que se registró el crecimiento semicuantitativo de colonias sin beta hemólisis. Se seleccionaron dos a cinco colonias presuntivas (colonias pequeñas, transparentes, umbilicadas, sin beta hemólisis) y se inocularon de nuevo en agar sangre con estría cerrada; se colocó un disco de optoquina para

incubar nuevamente a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 18 a 24 horas. Una zona de inhibición >14 mm indicó susceptibilidad, 7 a 13 mm se consideró indeterminado y <7 mm resistente. Los aislamientos susceptibles a optoquina correspondieron a neumococo, los que manifestaron susceptibilidad intermedia se probaron con solubilidad en bilis o aglutinación.<sup>39</sup> El resto del espécimen se almacenó en agar sangre-chocolate para enviarse después a identificación definitiva de *S. pneumoniae* que se realiza empleando el suero Omni (pool concentrado de sueros polivalentes producido en conejos). Este suero se emplea en la reacción de hinchazón capsular de Neufeld. El suero contiene anticuerpos contra 84 serotipos y es producido en el Statens Serum Institut en Dinamarca. La reacción de Neufeld o de hinchamiento capsular es una reacción del suero específico que contiene los anticuerpos que reaccionan con los polisacáridos capsulares de los neumococos, haciendo evidente o visible la cápsula, cuando se observa con el microscopio, por modificación del índice refractario de la cápsula que aparece entonces "hinchada" y más visible; la luz transmitida a través de la cápsula aparece más brillante que célula neumocócica o el fondo. Para el procedimiento se requiere de un aislamiento previamente identificado de *S. pneumoniae* con desarrollo reciente (primeras 18-24 horas de incubación); entonces, con un asa estéril se agregan en una laminilla porta-objetos, en el siguiente orden, una gota de buffer de fosfatos pH 7.2, 1-3 colonias del neumococo y 3-5 µL del suero Omni. Finalmente, se cubre la laminilla con un cubre-objetos y se mantienen a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos, evitando que no se seque, para después analizar al microscopio y leer la reacción de Quellung.<sup>40</sup>

Para evaluar la susceptibilidad a penicilina se realizó escrutinio con las mismas dos a cinco colonias de *Streptococcus pneumoniae*, con disco de oxacilina de 1µg en prueba en medio de cultivo sólido (agar Mueller-Hinton suplementado con sangre de cordero al 5%, incubado a 35°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 20 a 24 horas), se reportó como no susceptible a penicilina cuando el diámetro en derredor fue ≤20 mm. Para establecer las MIC de acuerdo a los NCCLS (Sensible

(S)  $\leq 0.06$   $\mu\text{g/mL}$ ; resistente de nivel intermedio (I)  $0.12-1$   $\mu\text{g/mL}$ ; resistente de alto nivel (R)  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$ ) se hizo la prueba de microdilución en placa; las placas de microdilución son preparadas en lotes y congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  para el uso de rutina. Cada pozo contiene  $50\mu\text{l}$  de las diferentes concentraciones, de penicilina preparada en caldo Mueller-Hinton suplementado con sangre de caballo lisada al 3%, el último pozo sólo contuvo medio de cultivo. Se puede probar seis cepas y un control en cada placa. Una placa de microdilución contuvo diluciones de penicilina de  $16.0$  a  $0.015$   $\text{mg/L}$  (Siete hileras de 11 diluciones y un pozo control). Para la prueba, se preparó el inóculo de un cultivo de *S. pneumoniae* de 18-24hrs en una placa de agar sangre. La cepa a "prueba" y la cepa "control" se prepararon por emulsificación del organismo en una pequeña cantidad de solución salina estéril a una densidad igual a una turbidez estándar de  $0.5$  McFarland. Que se diluyó en caldo Mueller-Hinton suplementado con sangre de caballo. La dilución fue como sigue: a la suspensión  $0.5$  MacFarland  $1/100$  se agregó  $0.1$  ml de MacFarland a  $9.9$ ml de caldo Mueller Hinton suplementado con sangre de caballo. Con una micropipeta, se agregó  $50\mu\text{l}$  del organismo a "prueba" a cada uno de los 12 pozos, el último pozo solo contuvo organismo y diluyente para control de crecimiento. Se incubó entre 10 y 24hrs a  $35^{\circ}\text{C}$  en presencia de  $\text{O}_2$  y se determinó la MIC..<sup>41,42</sup>

#### **Laboratorio responsable del análisis de las muestras**

La detección y aislamiento inicial se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza del IMSS; la confirmación del aislamiento y susceptibilidad a penicilina así como la identificación del serotipo se realizó en el Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto de Salud Pública de la Secretaría de Salud.

# ESTADÍSTICA

## **Estimación del tamaño de la muestra**

La toma de muestras con hisopo nasofaríngeo se efectuó a toda la población con diagnóstico confirmado de mieloma múltiple y cautiva en la consulta externa del servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional La Raza, que no tenga criterios de no inclusión o exclusión.

## **Plan estadístico y análisis**

Se realizó un análisis exploratorio de datos para ver la normalidad de las variables y se aplicaron medidas de tendencia central y dispersión, así como frecuencias simples.

## **RECURSOS**

### **Recursos humanos**

El HECMNR es un hospital de tercer nivel que cuenta con el personal especializado en la atención de pacientes con neoplasias hematológicas.

### **Recursos materiales**

El servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional La Raza dispone de un consultorio para la vigilancia y seguimiento de los pacientes durante el periodo de estudio.

Los exámenes de laboratorio para el aislamiento e identificación del microorganismo se realizaron en el laboratorio del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza. Los exámenes para la susceptibilidad a antibióticos por microdilución en placa e identificación del serotipo se realizaron en el Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública, con recursos propios.

### **Recursos Financieros**

Propios de los servicios participantes (Hospital de Especialidades, Hospital de Infectología, y Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública).

## RESULTADOS

Se capturaron 91 pacientes con mieloma múltiple para participar en el estudio. Dos no aceptaron y cinco nunca acudieron a la consulta en el período de estudio, por lo que no hubo oportunidad para invitarlos a participar; de los 29 restantes, 22 habían recibido algún tratamiento antibiótico en las dos semanas precedentes y 7 manifestaban datos clínicos de enfermedad respiratoria (figura 1). En total, se incluyeron 55 pacientes, de estos 31 fueron hombres (56.4%) y 24 mujeres (43.6%), la mediana de edad es de 66 años (33 a 85 años). El tiempo de evolución a partir del diagnóstico de la enfermedad tiene una mediana de 18 meses con un rango de 2 meses hasta 184 meses. (tabla 1) La mayoría de los pacientes están en etapa clínica III (78%, 43/55); Diez pacientes (18%) están en etapa II y dos pacientes (4%) en etapa I. El 72.7% reciben algún esquema de quimioterapia (40/55), pero sólo en el 18% es por recaída de la enfermedad (10/55). (figura 2) Aproximadamente la mitad de los pacientes refirió la convivencia con menores de 5 años (51%, 28/55). Son pocos los pacientes que han recibido la vacuna de polisacárido capsular en los últimos 5 años (4/55; 7%). Las otras variables, que se consideraron de interés por su relación con la presencia del estado de portador, fueron eventos poco frecuentes: hacinamiento, 22% (12/45); uso reciente de antibióticos, 11% (6/55) y; hospitalización reciente, 5.5% (3/55). (figura 3) En seis pacientes se aisló *S. pneumoniae*, la prevalencia de colonización nasofaríngea es de 11%. (figura 1) La mediana de edad y del tiempo de evolución de la enfermedad a partir del diagnóstico se parece al resto de la población (edad: 60 años, 48-74 años; tiempo de evolución: 12 meses, 8-35 meses). La mitad son hombres (3/6). (tabla 1) La mitad padecen enfermedad en etapa III y el resto esta en etapa II. En el resto de variables, las proporciones tienden a diferir con el total de la población de estudio, seguramente por el número de pacientes analizados. Todos reciben algún tipo de quimioterapia, sólo en un paciente (16.7%) es por recaída de la enfermedad. Tres pacientes

refieren convivencia con menores de 5 años. Sólo un paciente manifestó uso reciente de antibióticos y otro había recibido vacuna de polisacárido capsular dos años antes. Ninguno manifestó hacinamiento u hospitalización. (figuras 2 y 3) En la mitad de estos pacientes (n = 3) se encontró colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* resistente a penicilina con una prevalencia de 5.5%. (figura 1) La mediana de edad fue 70 años (50-74 años). El tiempo de evolución es igual al de la población total con colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* (12 meses; rango de 8 a 35 meses). (tabla 1) Un paciente padece enfermedad en etapa clínica III y los otros dos están en etapa clínica II. Los tres pacientes reciben quimioterapia, pero en ninguno fue por recaída de la enfermedad. Un paciente refirió la convivencia con menores de 5 años y ninguno manifestó hacinamiento, uso previo de antibióticos, hospitalización reciente o haber recibido vacuna de polisacárido capsular. (figuras 2 y 3) Los resultados del análisis bacteriológico de las cepas de *S. pneumoniae* obtenidas en los seis pacientes fueron los siguientes: De los tres pacientes con colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* susceptible a penicilina sólo se encontró una cepa, en cada uno, para pruebas de susceptibilidad y serotipificación; todas compartieron susceptibilidad a penicilina y cefotaxima. tablas 2 y 3 Ningún serotipo se identificó en más de un paciente. Esta última situación (un serotipo exclusivo para cada paciente) se repitió en los tres pacientes con *S. pneumoniae* resistente a penicilina, en quienes se aisló de dos a cinco cepas y cada una se clasificó por iniciales del paciente y un número sucesivo (ETL, ELM y MAA). Los patrones de susceptibilidad fueron iguales en ETL 1 y ETL 2 (serotipo 6B); Los MIC para penicilina corresponde a resistencia de alto nivel, y susceptible a cefotaxima. figura 4 En los siguientes aislamientos (ELM y MAA) hubo diversidad en los MIC encontrados dentro de un mismo serotipo; figuras 5 y 6 ELM 1 y ELM 3 fueron susceptibles a penicilina, contrario a ELM 2 y ELM 4 (serotipo 19A) que mostraron resistencia de alto nivel (4µg/mL), sin embargo, todas fueron susceptibles a cefalosporinas figura 5. Al considerar todas estas cepas parte de un mismo serotipo, se eligió a aquellas con MIC a penicilina en rango de resistente como representativas del aislamiento. En el caso de MAA



(serotipo 35B), a pesar de que también se encontró diversidad de MIC, todos correspondían a resistencia de alto nivel a penicilina y susceptible a cefotaxima. Figura 6

## TABLAS Y FIGURAS

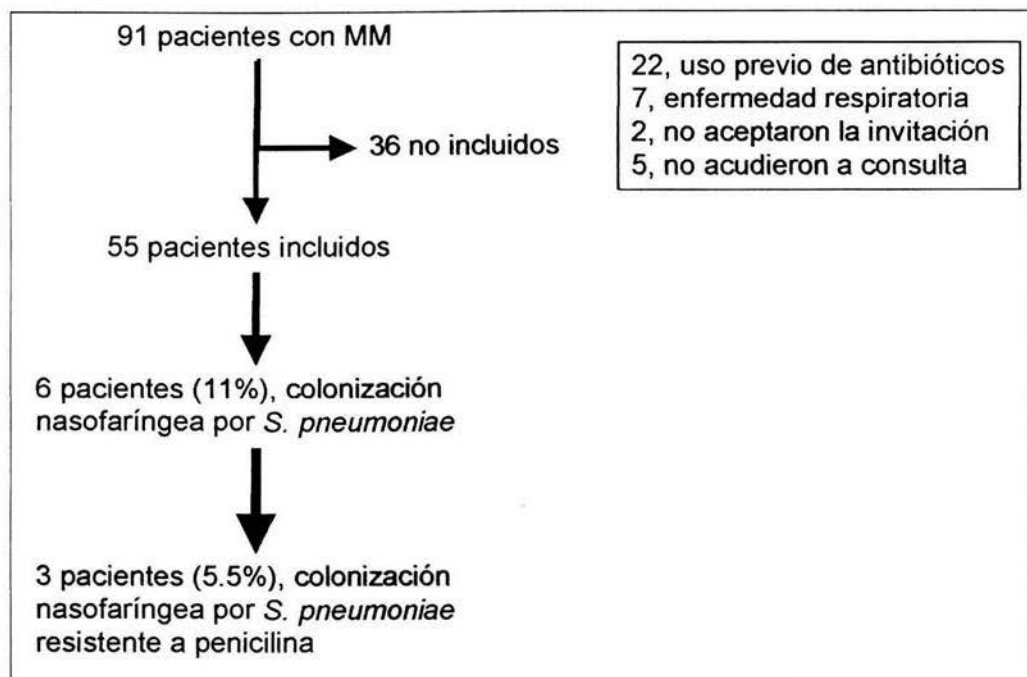


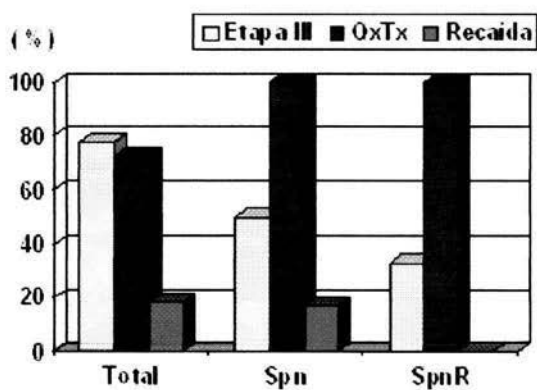
Figura 1. Población en vigilancia con mieloma múltiple; epidemiología del estado de portador de *S. pneumoniae*

Tabla 1. Características demográficas de la población con mieloma múltiple.

	Total de pacientes	Portadores Spn*	Portadores SpnR <sup>¶</sup>
Edad en años (rango)	66 (33-85)	60 (48-74)	70 (50-74)
Sexo (M/F)	31/24	3/3	2/1
Tiempo de evolución	18 (2-184)	12 (8-35)	12 (8-35)

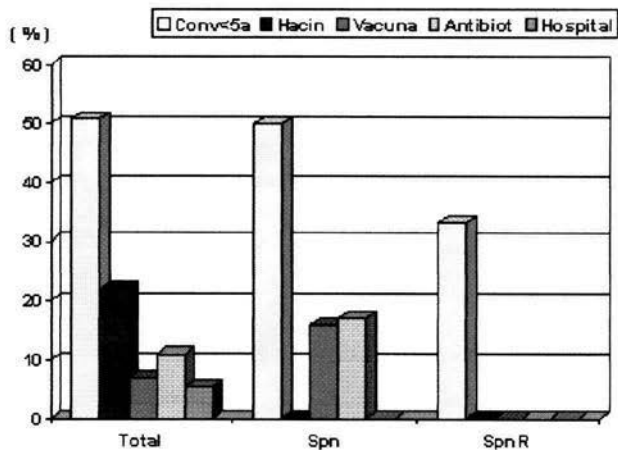
\* Portadores de *S. pneumoniae*; <sup>¶</sup> Portadores de *S. pneumoniae* resistente a penicilina

Figura 2. Características demográficas, en proporciones, relacionadas a la enfermedad (mieloma múltiple).



\* Portadores de *S. pneumoniae*; ¶ Portadores de *S. pneumoniae* resistente a penicilina

Figura 3. Características demográficas, en proporciones, de interés en el paciente.



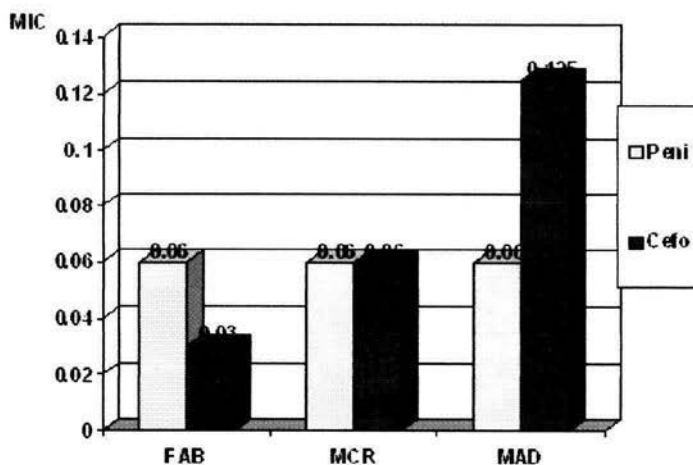
\* Portadores de *S. pneumoniae*; ¶ Portadores de *S. pneumoniae* resistente a penicilina

Tabla 2. Caracterización de las cepas obtenidas en los pacientes portadores de *S. pneumoniae*, asignadas según las iniciales de su nombre.

Paciente	Número de cepas	Patrón de susceptibilidad	Serotipo
FAB	1	SpnS*	3
MCR	1	SpnS	34
MAD	1	SpnS	17
ETL	2	SpnR¶	6B
ELM	5	SpnR	19A
MAA	5	SpnR	35B

\* *S. pneumoniae* sensible a penicilina; ¶ *S. pneumoniae* resistente a penicilina

Figura 4. Patrón de susceptibilidad, serotipos 3, 34 y 17. Portadores de una cepa de *S. pneumoniae* sensible a penicilina. Las letras indican las iniciales del nombre del paciente.



FAB, serotipo 3; MCR, serotipo 34; MAD, serotipo 17

Tabla 3. Caracterización de las cepas; patrón de susceptibilidad acorde al serotipo.

Cepa	Serotipo	MIC* Penicilina	MIC Cefotaxima
FAB	3	0.06	0.03
MCR	34	0.06	0.06
MAD	17	0.06	0.125
ETL 1	6B	2	1
ETL 2	6B	2	1
ELM 1	19A	1	0.5
ELM 2	19A	4	2
ELM 3	19A	1	1
ELM 4	19A	4	2
MAA 1	35B	4	1
MAA 2	35B	4	1
MAA 3	35B	2	2
MAA 4	35B	2	1
MAA 5	35B	2	1

\* Concentración mínima inhibitoria.

Figura 5. Patrón de susceptibilidad, serotipo 6B. Portador de dos cepas de *S. pneumoniae* resistente a penicilina. Las letras indican las iniciales del paciente.

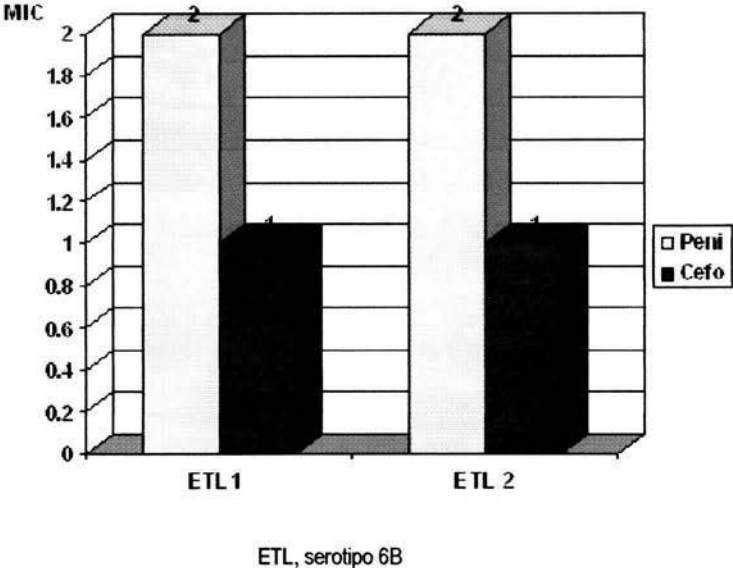


Figura 6. Patrón de susceptibilidad, serotipo 19A. Portador de cuatro cepas de *S. pneumoniae* resistente a penicilina. Las letras indican las iniciales del paciente.

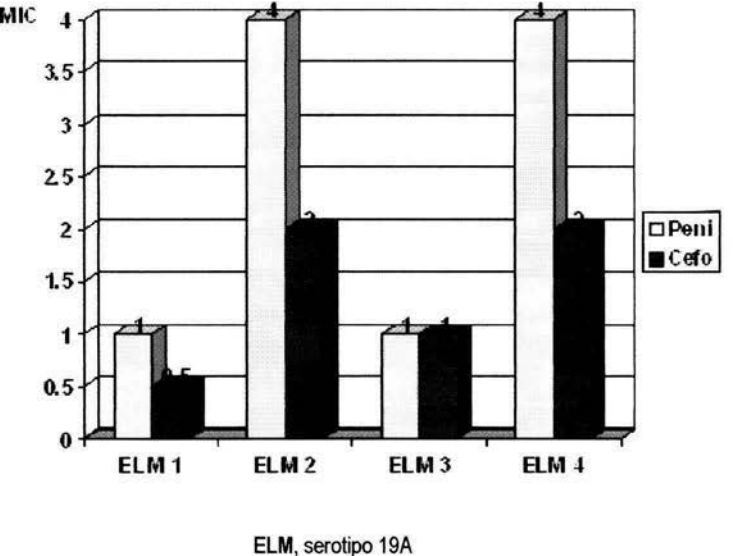
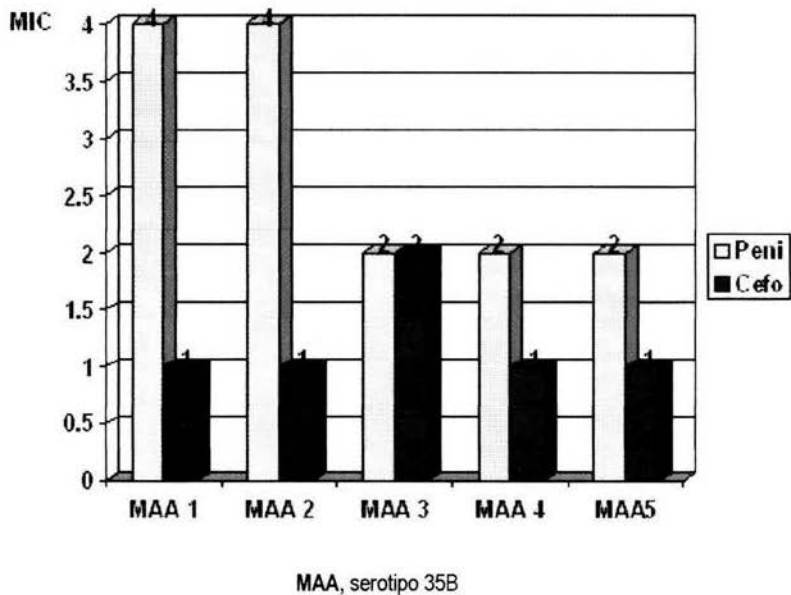


Figura 7. Patrón de susceptibilidad, serotipo 35B. Portador de cinco cepas de *S. pneumoniae* resistente a penicilina. Las letras indican las iniciales del paciente.



## DISCUSIÓN

Determinar la prevalencia de nasofaríngea por *S. pneumoniae*, en cualquier población, provee información que es crucial para: a) entender la epidemiología de la enfermedad; b) entender la dinámica de transmisión entre los distintos grupos de riesgo; c) sospechar la emergencia de resistencia en aislados clínicamente importantes y; d) evaluar, con estudios prospectivos, la protección que brinda la vacunación en masa.<sup>43</sup>

Considerando que la prevalencia de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* varía según la edad de la población evaluada, uso reciente de antibióticos y aparentemente estado neto de competencia inmune, nuestro estudio se enfocó a un subgrupo de individuos que tienen características de alto riesgo por ser adultos mayores con inmunocompromiso en quimioterapia. No se conoce con exactitud la prevalencia de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* en adultos, los datos son más escasos en condiciones específicas dentro de esta población, como en situaciones de inmunocompromiso; sin embargo, los reportes encontrados muestran una prevalencia que varía entre 4% y 15%. Las proporciones más bajas son de estudios que han demostrado coherentemente la pobre o nula transmisión clonal de *S. pneumoniae* de niños a adultos.<sup>10, 44</sup> Mientras que, las mayores proporciones están reportadas en estudios que han demostrado la transmisión, en ocasiones clonal, de niños a adultos y principalmente cuando la búsqueda intencionada se dirige a las madres de niños que portan *S. pneumoniae*, como lo demostraron Greenberg y cols.<sup>43</sup> en su estudio realizado en el sudoeste de Israel donde encontró que la prevalencia de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* en las madres de estos niños fue de 15%. Pero, en la mayoría de otros estudios, la población adulta corresponde a personas que están en los grupos de riesgo, tal es el caso de indios navajo y apaches de la montaña blanca que tuvieron una prevalencia del 17.7% para aquellos entre 18 y 29 años o 10.3% a quienes tienen entre 40-49 años.<sup>45</sup> Sin embargo, es necesario destacar que ninguna de



estas tasas se semeja a las reportadas en niños, incluso en la misma región y mismo período del tiempo; por otra parte, nosotros no tenemos conocimiento de algún estudio que determine la prevalencia de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* en algún grupo de riesgo por inmunocompromiso. En nuestro estudio, la prevalencia de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* es de 11%, equiparable a la reportada en adultos inmunocompetentes que pertenecen a grupos de riesgo, o tienen contacto estrecho con niños. Tal parece que en nuestra población adulta con mieloma múltiple no hay más posibilidad de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* que en otros, más aún, el hacinamiento y la convivencia con niños menores de 5 años fueron eventos poco reportados en estos individuos, que aunque no es suficiente para su descarte, hace menos posible la participación de estos eventos en la colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae*. Resaltamos también que de los seis pacientes con colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* la mitad son portadores de un serotipo con alto nivel de resistencia a penicilina (prevalencia: 5.5%). Esto implica una frecuencia que supera a la observada en otros adultos.<sup>10</sup> Sin embargo es necesario aclarar que todos los serotipos fueron susceptibles a cefotaxima a pesar de coexistir alto nivel de resistencia a penicilina, difiere con otros reportes, en donde es frecuente encontrar resistencia a cefalosporinas y otros antibióticos cuando concurre resistencia de alto nivel a penicilina.<sup>28</sup> Los serotipos encontrados en esta población, exceptuando a 17 y 34, son los frecuentemente encontrados como colonizantes, así mismo, el patrón de susceptibilidad es el esperado para cada uno de estos, con excepción nuevamente de 35B, ya que la emergencia de resistencia a penicilina en este se ha relacionado con el uso de vacuna conjugada en los niños; por lo tanto no tiene cabida en nuestro contexto y no encontramos justificación para este evento. Es posible que la frecuencia tan elevada de resistencia a penicilina pudiera ser un factor que contribuya al desarrollo de enfermedad, como es sabido, los serotipos que son resistentes a penicilina son aquellos que duran más tiempo como colonizantes en la nasofaringe. No encontramos más de un serotipo en un mismo paciente, contrario a lo reportado usualmente en niños y otros adultos inmunocompetentes.<sup>6, 8</sup>

También, detectamos que ningún serotipo se repite en más de un paciente, hecho que apoya la diversidad de serotipos comentada por otros autores en los adultos, dato generalizado a partir de cepas invasoras más que de colonizantes. Por lo tanto, la frecuencia elevada de resistencia a penicilina no parece explicarse por presión selectiva por antibióticos, ya que fue un evento relativamente infrecuente en la población general y no lo reportó algún paciente portador de *S. pneumoniae* resistente a penicilina, que podría explicarse mediante adquisición de serotipos de un medio en el que es común la resistencia a antibióticos, que se favorece por la supervivencia en la nasofaringe de estos serotipos, aunque, con las limitaciones de un estudio transversal, no podemos explicarlo estadísticamente con nuestros resultados. De los serotipos que identificamos, sólo dos (34 y 35B) no se encuentran en la vacuna de polisacárido; contrario a lo que ocurriría con la vacuna conjugada heptavalente, que confiere protección sólo para los serogrupos 6 y 19.

## CONCLUSIONES

1. La prevalencia de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* en pacientes adultos con mieloma múltiple del HE CMNR es semejante a la reportada en adultos inmunocompetentes.
2. La frecuencia de resistencia a penicilina de alto nivel es superior a la encontrada en adultos y tiene semejanza a la descrita en niños.
3. Ninguna de las variables estudiadas aquí es más frecuente en la colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* en adultos con mieloma múltiple del HE CMNR.
4. La vacuna de polisacárido capsular debe aplicarse a todos los pacientes con mieloma múltiple para protección contra enfermedad invasora.
5. Aunque estos resultados pudieran apoyar el abordaje terapéutico en nuestra población, con sospecha de enfermedad invasora por *S. pneumoniae*, por la frecuencia elevada de resistencia a penicilina de alto nivel, se requiere de estudios prospectivos para:
  - a) Aclarar el papel de *S. pneumoniae* como causante de morbilidad y mortalidad.
  - b) Identificar los factores de riesgo para colonización, enfermedad invasora y resistencia a antibióticos.
  - c) Establecer la dinámica de colonización
  - d) Determinar la sero-prevalencia de enfermedad invasora y su relación con los serotipos que colonizan la nasofaringe.
  - e) Estimar la eficacia de la vacuna de polisacárido capsular y la efectividad de la vacunación.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Austrian N. *Streptococcus pneumoniae*. In: Gorbach, Bartlett, Blacklow *Infectious Disease 2<sup>nd</sup> ed*. Philadelphia: WB Saunders. 1999: 1719-23.
2. Echániz-Avilés G, Solórzano SF. Meeting the challenge: Prevention of pneumococcal disease with conjugate vaccines. *Salud Publica Mex* 2001; 43: 352-67.
3. Facklam R. What Happened to the Streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microb Rev* 2002; 15: 613-30.
4. Scott JAG, Hall AJ, Dagan R. Serogroup-specific epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*: Associations with age, sex, and geography in 7,000 episodes of invasive disease. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 973-81.
5. Tuomanen EI, Masure HR. Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. *Microb Drug Resist* 1997; 3: 297-308.
6. Bogaert D, de Groot R, Hermans PWM. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 144-54.
7. Pirofski LA, Casadevall A. The meaning of microbial exposure, infection, colonisation and disease in clinical practice. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 628-35
8. O'Brien KL, Nohynek H & the WHO pneumococcal vaccine trials carriage working group. Report from a WHO working group: Standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: e1-11.
9. Dagan R, Leibovitz E, Greenberg D. Dynamics of pneumococcal nasopharyngeal colonization during the first days of antibiotic treatment in pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17: 880-5.
10. Borer A, Meirson H, Peled N. Antibiotic-resistant pneumococci carried by young children not appear to disseminate to adult members of a closed community. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 436-44.
11. Metas E, Brueggemann AB, Enright MC. Stability of serotypes during nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 386-92.
12. Tomasz A, Corso A & members of the PAHO/Rockefeller University workshop. Molecular epidemiologic characterization of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* invasive pediatric isolates recovered in six Latin-American countries: An overview. *Microb Drug Resist* 1998; 4: 195-207.

13. Camou T, Hortal M, Tomasz A. The apparent importation of penicillin-resistant capsular type 14 Spanish/French clone of *Streptococcus pneumoniae* into Uruguay in the early 1990s. *Microb Drug Resist* 1998; 4: 219-24.
14. Rossi A, Corso A, Pace J. Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Argentina: Frequent occurrence of an internationally spread serotype 14 clone. *Microb Drug Resist* 1998; 4: 225-31.
15. The Colombian pneumococcal study group. Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Colombia: Presence of international epidemic clones. *Microb Drug Resist* 1998; 4: 233-9.
16. Echániz-Avilés G, Velázquez MME, Carnalla BMN. Predominance of the multiresistant 23F international clone of *Streptococcus pneumoniae* among isolates from Mexico. *Microb Drug Resist* 1998; 4: 241-6.
17. Brueggemann AB, Griffiths DT, Metas E. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone -specific differences in invasive disease potential. *J Infect Dis* 2003; 187: 1424-32.
18. Advisory Committee on Immunization Practices. Prevention of pneumococcal disease: Recommendations of the advisory committee on immunization practices. *Morb Mort Wkly Rep* 1997; 46 (RR-8): 1-24.
19. World Health Organization. Pneumococcal vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 1999; 74: 177-84.
20. Fedson DS, Anthony J, Scott G. The burden of pneumococcal disease among adults in developed and developing countries: what is and is not known. *Vaccine* 1999; 17: S11-7
21. Fedson DS. Pneumococcal conjugate vaccination for adults: why it's important for children. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: 183-6
22. Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: Implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 100-21.
23. Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR. The contribution of specific pneumococcal serogroup to different disease manifestations: Implications for conjugate vaccine formulation and use, part II. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 122-40.

24. Echániz-Avilés G, Velázquez ME, Cranalla MN. Antimicrobial susceptibilities and capsular types of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolated in children in Mexico city. *Microb Drug Resist* 1997; 3: 243-51.
25. Levine MM, Lagos R, Levine OS. Epidemiology of invasive pneumococcal infections in infants and young children in metropolitan Santiago, Chile, a newly industrializing country. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17: 287-93.
26. Di Fabio JL, Castañeda E, Agudelo CI. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, SIREVA-Vigía Group, 1993 to 1999. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20: 959-67.
27. Paradisi F, Corti G, Cinelli R. Infections in multiple myeloma. *Infect Dis Clin N Am* 2001; 15: 373-84.
28. Schrag SJ, Beall B, Dowell SF. Limiting the spread of resistant pneumococci: Biological and epidemiological evidence for the effectiveness of alternative interventions. *Clin Microb Rev* 2000; 13: 588-601.
29. Fiore AE, Moroney JF, Farley MM. Clinical outcomes of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* in the era of antibiotic resistance. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 71-7.
30. Regev-Yochay G, Raz M, Shainberg B. Independent risk factors for carriage of penicillin-non-susceptible *Streptococcus pneumoniae*. *Scand J Infect Dis* 2003; 35: 219-22.
31. Lipsitch M. Measuring and interpreting associations between antibiotic use and penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1044-54.
32. Chiu SS, Leung HP, Chow FKH. Nasopharyngeal carriage of antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* among young children attending 79 kindergartens and day care centers in Hong Kong. *Antimicrob Ag Chem* 2001; 45: 2765-70.
33. Nava JM, Bella F, Garau J. Predictive factors for invasive disease due to penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: A population-based study. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 884-90.
34. Abildgaard N, Nielsen JL. Pneumococcal septicaemia and meningitis in vaccinated splenectomized adult patients. *Scand J Infect Dis* 1994; 26: 615-7.
35. Kuhls TL, Viering TP, Leach CT. Relapsing pneumococcal bacteremia in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 1050-4.
36. Schmid GP, Smith RP, Baltch AL. Antibody response to pneumococcal vaccine in patients with multiple myeloma. *J Infect Dis* 1981; 143: 590-7.

37. Faden H, Duffy L, Wasielewski R. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *J Infect Dis* 1997; 175: 1440-5.
38. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. General Issues and role of laboratorians. In: Bailey & Scott's *Diagnostic microbiology 11<sup>th</sup> ed.* Mosby. 2002: 2-18.
39. Facklam R. *Streptococcus pneumoniae*. In: Manual for identification and antimicrobial susceptibility testing. WHO/CDS/CSR/RMD/2003.6. 2003: 45-62.
40. Facklam R. Serotyping and Quellung typing of *Streptococcus pneumoniae*. In: Manual for identification and antimicrobial susceptibility testing. WHO/CDS/CSR/RMD/2003.6. 2003: 255-8
41. Venglarcik JS. *Streptococcus pneumoniae* antimicrobial susceptibility testing. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: 329-31.
42. National committee for clinical laboratory standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth informational supplement. *NCCLS document M100-S12*. Wayne, PA: NCCLS, 2002.
43. Greenberg D, Broides A, Blancovich I. Relative importance of nasopharyngeal versus oropharyngeal sampling for isolation of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from healthy and sick individuals varies with age. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4604-9
44. Reyes-Yochav G, Raz M, Dagan R. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by adults and children in community and family settings. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 632-9
45. Watt JP, O'Brien KL, Katz S. Nasopharyngeal versus oropharyngeal sampling for detection of pneumococcal carriage in adults. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4974-6
46. Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 83-93.

## Anexo A

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Fecha: \_\_\_\_\_

**TITULO: Prevalencia de colonización nasofaríngea por *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina en pacientes con mieloma múltiple del servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional La Raza.**

El que suscribe \_\_\_\_\_ en pleno uso de mis facultades, manifiesto que se me ha invitado a participar en un estudio de investigación que el HIMCNR realiza sobre la colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* resistente a penicilina. Este estudio tendrá una duración aproximada de seis meses.

Los investigadores me han informado de manera detallada todos y cada uno de los pasos del estudio, el objetivo a cumplir y las implicaciones clínicas que pudieran presentarse. También se me ha informado que antes de entrar al estudio se me realizará una valoración clínica, para evaluar si soy candidato al estudio. Se me ha informado que si soy seleccionado, debo de cumplir con las indicaciones médicas. Estoy enterado que la toma de la muestra de nasofaringe podrá ocasionarme alguna molestia. Se me ha informado que para la toma de muestras en el laboratorio solo se utilizará material desechable y que toda la información recopilada durante este estudio es confidencial, en conformidad con la ley.

Tengo el conocimiento de que mi participación es voluntaria y que en el momento en que yo lo decida puedo retirarme del estudio sin que con esto me vea afectado en cuanto a la atención médica que recibiré.

He leído cuidadosamente éste documento y solicitado se me aclaren todas mis dudas, se que constantemente recibiré información sobre lo relacionado a los resultados del estudio. Si en el futuro tuviera alguna duda, los investigadores del HIMCNR está en la mejor disposición para aclararla.

Estoy de acuerdo en que el Dr. E. Alejandro Aguillón García, médico responsable del estudio y el HIMCNR, utilicen mi reporte de resultados de manera anónima, para futuras investigaciones médicas.

NOMBRE Y FIRMA DEL PARTICIPANTE \_\_\_\_\_

NOMBRE Y FIRMA DE TESTIGO 1 \_\_\_\_\_

NOMBRE Y FIRMA DE TESTIGO 2 \_\_\_\_\_

NOMBRE Y FIRMA DE QUIEN EXPLICA EL CONSENTIMIENTO INFORMADO \_\_\_\_\_



## Anexo B

### FORMATO PARA CAPTURA DE DATOS

DATOS GENERALES			
Nombre			
Número de afiliación			
Edad			
Género	Masculino	1	Femenino 2

CARACTERÍSTICAS DE ENFERMEDAD BASE			
Fecha de diagnóstico de mieloma múltiple			
Etapas de mieloma múltiple			
Quimioterapia	Si	1	No 2

CARACTERÍSTICAS DE INTERÉS EN EL PACIENTE			
Hacinamiento	Si	1	No 2
Vacunación anti-neumocócica	Si	1	No 2
Uso previo de antimicrobianos	Si	1	No 2
¿cuál?	beta-lactámicos	1	Macrólidos 2
	Quinolonas	3	
	Aminoglucósidos	4	lincosamidas 5
	oxazolidinonas	6	
Hospitalización previa	Si	1	No 2

CARACTERÍSTICAS DEL NEUMOCOCO			
Susceptibilidad a penicilina	Susceptible	1	Resistente de nivel intermedio 2
			Resistente de alto nivel 3
Serotipo / Serogrupo			

## Anexo C

### TIPIFICACION POR EL METODO LARGO

					20b				
				16c	6a				
				16b	33f				
				11g	33e	41b			
			24e	11f	33b	41a	43b	23d	
		7h	24d	11c	12e	32b	47a	23c	
		19f	24c	11b	12c	32a	42a	23b	
	18f	19c	7f	9g	12b	22c	29b	15h	
	18e	19b	7e	9e	10f	22b	35c	15e	
	18d	6c	7c	9d	10d	17c	35b	15c	25c
<i>Factores</i>	18c	6b	7b	9b	10b	17b	35a	15b	25b
									48
									46
	18*		40	37	39	41*	47*	28	45
	5	19*	31	36	33*	32*	42	23*	44
	4	8	24*	16*	21	27	35*	15*	43
	2	6*	20	11*	12*	22*	34	14	38
<b>Tipo/Grupo</b>	1	3	7*	9*	10*	17*	29	13	25*
<b>Pool</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>I</b>

### TIPIFICACION POR EL METODO CORTO

<b>Pool</b>	<b>P</b>	<b>Q</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>T</b>	<b>Non-vaccine types/groups</b>
<b>A</b>	1	18*	4	5	2	
<b>B</b>	19*	6*	3	8		
<b>C</b>	7*				20	24*,31,40
<b>D</b>			9*		11*	16*,36,37
<b>E</b>			12*	10*	33*	21,39
<b>F</b>				17*	22*	27,32,41
<b>G</b>						29,34,35*,42,47
<b>H</b>	14	23*		15*		13,28*
<b>I</b>						25*,38,43,44,45,46,48

## Anexo D

### CRITERIOS DE DURIE Y SALMON PARA ESTADIFICACIÓN EN MIELOMA MÚLTIPLE

#### Estadio I

Hemoglobina mayor a 10 g/dL.

Calcio sérico menor o igual a 12 mg/dL.

Rayos X: 0-1 lesiones en hueso.

Proteína monoclonal: IgG <5 g/dL; IgA <3 g/dL; excreción de cadenas ligeras en orina <4 g/24 horas

#### Estadio II

Ningún criterio de los estadio I y III.

#### Estadio III

Hemoglobina menor de 8.5 g/dL.

Calcio sérico mayor a 12 mg/dL.

Lesiones líticas en hueso extensas: dispersas con fracturas.

Proteína monoclonal: IgG mayor a 7 g/dL; IgA >5 g/dL; excreción de cadenas ligeras en orina >12 g/24 horas.

### SUBCLASIFICACIÓN DENTRO DE CADA ESTADIO

- A. Creatinina sérica menor de 2 mg/dL.
- B. Creatinina sérica igual o mayor a 2 mg/dL.

## **Anexo E**

### **DECLARACIÓN DE HELSINKI**

#### **PRINCIPIOS ÉTICOS PARA LAS INVESTIGACIONES MÉDICAS EN SERES HUMANOS**

Adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial Helsinki, Finlandia, Junio 1964 y enmendada por la 29ª Asamblea Médica Mundial Tokio, Japón, Octubre 1975

35ª Asamblea Médica Mundial Venecia, Italia, Octubre 1983.

41ª Asamblea Médica Mundial

Hong Kong, Septiembre 1989

48ª Asamblea General

Somerset West, Sudáfrica, Octubre 1996 y la

52ª Asamblea General

Edimburgo, Escocia, Octubre 2000

#### **A. INTRODUCCION**

1. La Asociación Médica Mundial ha promulgado la Declaración de Helsinki como una propuesta de principios éticos que sirvan para orientar a los médicos y a otras personas que realizan investigación médica en seres humanos. La investigación médica en seres humanos incluye la investigación del material humano o de información identificables.

2. El deber del médico es promover y velar por la salud de las personas. Los conocimientos y la conciencia del médico han de subordinarse al cumplimiento de ese deber.

3. La Declaración de Ginebra de la Asociación Médica Mundial vincula al médico con la fórmula "velar solícitamente y ante todo por la salud de mi paciente", y el Código Internacional de Ética Médica afirma que: "El médico debe actuar solamente en el interés del paciente al proporcionar atención médica que pueda tener el efecto de debilitar la condición mental y física del paciente".

4. El progreso de la medicina se basa en la investigación, la cual, en último término, tiene que recurrir muchas veces a la experimentación en seres humanos.
5. En investigación médica en seres humanos, la preocupación por el bienestar de los seres humanos debe tener siempre primacía sobre los intereses de la ciencia y de la sociedad.
6. El propósito principal de la investigación médica en seres humanos es mejorar los procedimientos preventivos, diagnósticos y terapéuticos, y también comprender la etiología y patogenia de las enfermedades. Incluso, los mejores métodos preventivos, diagnósticos y terapéuticos disponibles deben ponerse a prueba continuamente a través de la investigación para que sean eficaces, efectivos, accesibles y de calidad.
7. En la práctica de la medicina y de la investigación médica del presente, la mayoría de los procedimientos preventivos, diagnósticos y terapéuticos implican algunos riesgos y costos.
8. La investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales. Algunas poblaciones sometidas a la investigación son vulnerables y necesitan protección especial. Se deben reconocer las necesidades particulares de los que tienen desventajas económicas y médicas. También se debe prestar atención especial a los que no pueden otorgar o rechazar el consentimiento por sí mismos, a los que pueden otorgar el consentimiento bajo presión, a los que no se beneficiarán personalmente con la investigación y a los que tienen la investigación combinada con la atención médica.
9. Los investigadores deben conocer los requisitos éticos, legales y jurídicos para la investigación en seres humanos en sus propios países, al igual que los requisitos internacionales vigentes. No se debe permitir que un requisito ético, legal o jurídico disminuya o elimine cualquiera medida de protección para los seres humanos establecida en esta Declaración.

## **B. PRINCIPIOS BASICOS PARA TODA INVESTIGACION MEDICA**

10. En la investigación médica, es deber del médico proteger la vida, la salud, la intimidad y la dignidad del ser humano.

11. La investigación médica en seres humanos debe conformarse con los principios científicos generalmente aceptados, y debe apoyarse en un profundo conocimiento de la bibliografía científica, en otras fuentes de información pertinentes, así como en experimentos de laboratorio correctamente realizados y en animales, cuando sea oportuno.

12. Al investigar, hay que prestar atención adecuada a los factores que puedan perjudicar el medio ambiente. Se debe cuidar también del bienestar de los animales utilizados en los experimentos.

13. El proyecto y el método de todo procedimiento experimental en seres humanos debe formularse claramente en un protocolo experimental. Este debe enviarse, para consideración, comentario, consejo, y cuando sea oportuno, aprobación, a un comité de evaluación ética especialmente designado, que debe ser independiente del investigador, del patrocinador o de cualquier otro tipo de influencia indebida. Se sobreentiende que ese comité independiente debe actuar en conformidad con las leyes y reglamentos vigentes en el país donde se realiza la investigación experimental. El comité tiene el derecho de controlar los ensayos en curso. El investigador tiene la obligación de proporcionar información del control al comité, en especial sobre todo incidente adverso grave. El investigador también debe presentar al comité, para que la revise, la información sobre financiamiento, patrocinadores, afiliaciones institucionales, otros posibles conflictos de interés e incentivos para las personas del estudio.

14. El protocolo de la investigación debe hacer referencia siempre a las consideraciones éticas que fueran del caso, y debe indicar que se han observado los principios enunciados en esta Declaración.

15. La investigación médica en seres humanos debe ser llevada a cabo sólo por personas científicamente calificadas y bajo la supervisión de un médico clínicamente competente. La responsabilidad de los seres humanos debe recaer siempre en una persona con capacitación médica, y nunca en los participantes en la investigación, aunque hayan otorgado su consentimiento.

16. Todo proyecto de investigación médica en seres humanos debe ser precedido de una cuidadosa comparación de los riesgos calculados con los beneficios previsibles para el individuo o para otros. Esto no impide la participación de voluntarios sanos en la investigación médica. El diseño de todos los estudios debe estar disponible para el público.

17. Los médicos deben abstenerse de participar en proyectos de investigación en seres humanos a menos de que estén seguros de que los riesgos inherentes han sido adecuadamente evaluados y de que es posible hacerles frente de manera satisfactoria. Deben suspender el experimento en marcha si observan que los riesgos que implican son más importantes que los beneficios esperados o si existen pruebas concluyentes de resultados positivos o beneficiosos.
18. La investigación médica en seres humanos sólo debe realizarse cuando la importancia de su objetivo es mayor que el riesgo inherente y los costos para el individuo. Esto es especialmente importante cuando los seres humanos son voluntarios sanos.
19. La investigación médica sólo se justifica si existen posibilidades razonables de que la población, sobre la que la investigación se realiza, podrá beneficiarse de sus resultados.
20. Para tomar parte en un proyecto de investigación, los individuos deben ser participantes voluntarios e informados.
21. Siempre debe respetarse el derecho de los participantes en la investigación a proteger su integridad. Deben tomarse toda clase de precauciones para resguardar la intimidad de los individuos, la confidencialidad de la información del paciente y para reducir al mínimo las consecuencias de la investigación sobre su integridad física y mental y su personalidad.
22. En toda investigación en seres humanos, cada individuo potencial debe recibir informaciones adecuadas acerca de los objetivos, métodos, fuentes de financiamiento, posibles conflictos de intereses, afiliaciones institucionales del investigador, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas del experimento. La persona debe ser informada del derecho de participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier momento, sin exponerse a represalias. Después de asegurarse de que el individuo ha comprendido la información, el médico debe obtener entonces, preferiblemente por escrito, el consentimiento informado y voluntario de la persona. Si el consentimiento no se puede obtener por escrito, el proceso para obtenerlo debe ser documentado formalmente ante testigos.
23. Al obtener el consentimiento informado para el proyecto de investigación, el médico debe poner especial cuidado cuando el individuo está vinculado con él por una relación de dependencia o si consiente

bajo presión. En un caso así, el consentimiento informado debe ser obtenido por un médico bien informado que no participe en la investigación y que nada tenga que ver con aquella relación.

24. Cuando la persona sea legalmente incapaz, o inhábil física o mentalmente de otorgar consentimiento, o menor de edad, el investigador debe obtener el consentimiento informado del representante legal y de acuerdo con la ley vigente. Estos grupos no deben ser incluidos en la investigación a menos que ésta sea necesaria para promover la salud de la población representada y esta investigación no pueda realizarse en personas legalmente capaces.

25. Si una persona considerada incompetente por la ley, como es el caso de un menor de edad, es capaz de dar su asentimiento a participar o no en la investigación, el investigador debe obtenerlo, además del consentimiento del representante legal.

26. La investigación en individuos de los que no se puede obtener consentimiento, incluso por representante o con anterioridad, se debe realizar sólo si la condición física/mental que impide obtener el consentimiento informado es una característica necesaria de la población investigada. Las razones específicas por las que se utilizan participantes en la investigación que no pueden otorgar su consentimiento informado deben ser estipuladas en el protocolo experimental que se presenta para consideración y aprobación del comité de evaluación. El protocolo debe establecer que el consentimiento para mantenerse en la investigación debe obtenerse a la brevedad posible del individuo o de un representante legal.

27. Tanto los autores como los editores tienen obligaciones éticas. Al publicar los resultados de su investigación, el médico está obligado a mantener la exactitud de los datos y resultados. Se deben publicar tanto los resultados negativos como los positivos o de lo contrario deben estar a la disposición del público. En la publicación se debe citar la fuente de financiamiento, afiliaciones institucionales y cualquier posible conflicto de intereses. Los informes sobre investigaciones que no se ciñan a los principios descritos en esta Declaración no deben ser aceptados para su publicación.



### **C. PRINCIPIOS APLICABLES CUANDO LA INVESTIGACION MEDICA SE COMBINA CON LA ATENCION MEDICA**

28. El médico puede combinar la investigación médica con la atención médica, sólo en la medida en que tal investigación acredite un justificado valor potencial preventivo, diagnóstico o terapéutico. Cuando la investigación médica se combina con la atención médica, las normas adicionales se aplican para proteger a los pacientes que participan en la investigación.

29. Los posibles beneficios, riesgos, costos y eficacia de todo procedimiento nuevo deben ser evaluados mediante su comparación con los mejores métodos preventivos, diagnósticos y terapéuticos existentes. Ello no excluye que pueda usarse un placebo, o ningún tratamiento, en estudios para los que no hay procedimientos preventivos, diagnósticos o terapéuticos probados.

30. Al final de la investigación, todos los pacientes que participan en el estudio deben tener la certeza de que contarán con los mejores métodos preventivos, diagnósticos y terapéuticos probados y existentes, identificados por el estudio.

31. El médico debe informar cabalmente al paciente los aspectos de la atención que tienen relación con la investigación. La negativa del paciente a participar en una investigación nunca debe perturbar la relación médico-paciente.

32. Cuando los métodos preventivos, diagnósticos o terapéuticos disponibles han resultado ineficaces en la atención de un enfermo, el médico, con el consentimiento informado del paciente, puede permitirse usar procedimientos preventivos, diagnósticos y terapéuticos nuevos o no probados, si, a su juicio, ello da alguna esperanza de salvar la vida, restituir la salud o aliviar el sufrimiento. Siempre que sea posible, tales medidas deben ser investigadas a fin de evaluar su seguridad y eficacia. En todos los casos, esa información nueva debe ser registrada y, cuando sea oportuno, publicada. Se deben seguir todas las otras normas pertinentes de esta Declaración.