

Dr. Eulogio Valentín Gómez

Influencia de la vacunación antineumocócica en la enfermedad neumocócica invasiva y desarrollo de nuevos procedimientos para evaluar la efectividad vacunal de las vacunas antineumocócicas

TESIS DOCTORAL



Autora:

MARTA GARRIDO JAREÑO

Directores:

Dr. Javier Pemán García
Dr. Antonio Pineda Lucena
Dr. Eulogio Valentín Gómez

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

El **Dr. Javier Pemán García**, doctor en Medicina, profesor asociado asistencial de Microbiología del Departamento de Microbiología y Ecología en la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València y jefe de sección del servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe el **Dr. Eulogio Valentín Gómez**, doctor en Farmacia y Catedrático de Universidad en la Sección Departamental de Microbiología en la Facultad de Farmacia de la Universitat de València y el **Dr. Antonio Pineda Lucena**, doctor en ciencias químicas y Director del Programa de Innovación Terapéutica y Director científico del CIMA en la Universidad de Navarra.

Directores de la tesis doctoral titulada: **“Influencia de la vacunación antineumocócica en la enfermedad neumocócica invasiva y nuevos procedimientos para evaluar la efectividad vacunal de las vacunas antineumocócicas”**

de **Marta Garrido Jareño**,

estudiante del Programa de **Doctorado en Biomedicina y Biotecnología 03102** (RD99/2011) de la Universitat de València, emiten informe FAVORABLE para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Los estudios que forman parte de esta tesis doctoral pertenecen a una misma línea de investigación y se han recogido en tres artículos originales, publicados en revistas de alto impacto y alta difusión: *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* (Factor de impacto 2023: 2,1 y Q2 en la categoría Infectious Diseases del JCR); *Medical Microbiology and Immunology* (Factor de impacto 2023: 5,5 y Q1 en la categoría Microbiology del JCR); y *Scientific Reports* (Factor de impacto 2023: 3,8 y Q1 en la categoría Multidisciplinary del JCR). Dichos artículos no han sido utilizados para la realización de otra tesis doctoral.

Y para que conste y obre a los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Valencia a 7 de enero.



Fdo:
Dr. Javier Pemán García



Fdo:
Dr. Eulogio Valentín Gómez



Fdo:
Dr. Antonio Pineda Lucena

AGRADECIMIENTOS

Al concluir este trabajo, no puedo dejar de reconocer y expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que me han acompañado y apoyado en esta etapa fundamental de mi vida.

En primer lugar, quiero agradecer sinceramente a mis directores, Javier, Antonio y Eulogio, por su orientación, paciencia y apoyo continuo. Especialmente a Javier, ya que su experiencia y sabiduría han sido cruciales para guiarme en cada paso de este proceso, y sus consejos no solo han enriquecido esta investigación, sino que han sido una inspiración constante para mi desarrollo académico y personal.

Al Servicio de Microbiología del Hospital La Fe, quienes han compartido conmigo jornadas de trabajo, ideas, y momentos que hicieron de esta experiencia algo memorable.

A mis compañeras de residencia con las que he compartido días de duro trabajo, lloros y también muchas risas. Por ayudarme siempre que lo he necesitado y darme ánimos cuando me sentí sin fuerzas.

A mi familia, quienes han sido mi pilar y mi mayor fuente de motivación. A mis padres y a mi hermana, que con su amor, sacrificio y confianza en mí me permitieron llegar hasta aquí.

A mis amigas, por no soltarme nunca de la mano y apoyarme en cada decisión que he tomado.

A Toni, por ser todo.

RESUMEN

Pese a la extensa utilización de las vacunas antineumocócicas, la Enfermedad Neumocócica Invasiva (ENI) continúa siendo una de las primeras causas de morbi-mortalidad en niños pequeños y adultos con patología de base. En este contexto surge la necesidad de realizar el presente trabajo, estudiando la ENI desde tres enfoques distintos: i) epidemiológico, a nivel de uso y eficacia de las vacunas, ii) clínico, al centrarse en niños con inmunodeficiencia, los cuales presentan un riesgo aún más elevado de padecer episodios de ENI con peor curso clínico y pronóstico, y iii) experimental, al validar la Resonancia de Plasmón Superficial (RPS) como técnica novedosa para medir los niveles de anti-PnPs IgGs en el suero de pacientes vacunados.

Las vacunas neumocócicas han demostrado ser inmunogénicas, eficaces y seguras y constituyen la principal herramienta para prevenir la ENI por serotipos vacunales. Además, se ha observado el llamado “efecto indirecto o de inmunidad de grupo” con una disminución de la incidencia de ENI en niños y adultos no vacunados, al disminuir la colonización nasofaríngea en los inmunizados y, por tanto, la transmisión y circulación de serotipos vacunales. No obstante, a pesar de la disminución significativa de la ENI debido especialmente a las vacunas conjugadas, se ha observado un incremento de casos a expensas del aumento de serotipos no vacunales lo que se conoce como remplazo vacunal. Al desaparecer los serotipos vacunales del nicho ecológico de la nasofaringe humana, el resto de los serotipos, adquieren una ventaja ecológica y, en consecuencia, aumenta su prevalencia como colonizantes, pudiendo producir enfermedad. En este contexto surge el interés de realizar un estudio sobre la ENI en la población pediátrica de la Comunidad Valenciana. Este trabajo recoge los casos de ENI notificados en un amplio periodo de tiempo con la finalidad de conocer la casuística, así como la repercusión que ha tenido la implantación de la vacuna neumocócica conjugada trecevalente (VNC13) en el calendario de vacunación infantil.

Por otra parte, se evaluó la respuesta vacunal a la VNC13 (pauta completa) en niños con algún tipo de inmunodeficiencia diagnosticada, puesto que estos pacientes sufren con mayor frecuencia infecciones recurrentes y graves, que afectan negativamente a su salud y calidad de vida. En este sentido se realizó una monitorización de los niveles plasmáticos de componentes implicados en la respuesta inmune (poblaciones linfocitarias, inmunoglobulinas, etc.), así como del título de anti-PnPs IgGs alcanzado en el suero de estos pacientes tras la administración de la pauta completa de VNC13. El objetivo de la recopilación de todos estos datos sería establecer asociaciones entre hiporrespuesta vacunal y concentración plasmática de los mismos. Se demostró que existía una asociación estadísticamente significativa entre un título protector de anti-PnPs IgGs tras la administración de la VNC13 con niveles elevados de TCD4+/TCD8+ y CD56+/CD16.

Finalmente, validamos la técnica de RPS para la medición en suero de IgG anti-PnPs con la finalidad de incorporar esta novedosa metodología en la práctica clínica habitual, reemplazando al método de ELISA, puesto que la RPS puede presentar ventajas interesantes respecto a los kits de ELISA comerciales. En nuestro trabajo encontramos una correlación robusta entre la concentración de IgG anti-PnPs medidas por ELISA y la señal de UR obtenidas mediante RPS, con buena sensibilidad y niveles óptimos de reproducibilidad. Hasta donde sabemos, nuestro estudio demuestra por primera vez que los métodos basados en RPS proporcionan mediciones fiables y precisas de los niveles séricos de IgG anti-PnPs en un tiempo experimental muy corto.

ABSTRACT

Despite the widespread use of pneumococcal vaccines, invasive pneumococcal disease (IPD) remains one of the leading causes of morbidity and mortality in young children and adults with underlying conditions. Within this context, the present study is warranted, analyzing IPD through three distinct approaches: i) epidemiological, focusing on the use and effectiveness of vaccines; ii) clinical, by focusing on children with immunodeficiency, who are at an even higher risk of experiencing episodes of IPD with more severe clinical outcomes and prognosis; and iii) experimental, by validating Surface Plasmon Resonance (SPR) as a novel technique to measure anti-PnPs IgG levels in the serum of vaccinated patients.

Pneumococcal vaccines have demonstrated immunogenicity, efficacy, and safety, and remain the primary strategy for preventing IPD caused by vaccine serotypes. Additionally, the so-called 'indirect effect' or 'herd immunity' has been observed, resulting in a reduction in the incidence of IPD among both vaccinated and unvaccinated individuals. This reduction is attributed to decreased nasopharyngeal colonization in vaccinated individuals, which subsequently reduces the transmission and circulation of vaccine serotypes. However, despite the substantial decline in IPD, particularly following the introduction of conjugate vaccines, an increase in cases has been noted, largely due to the emergence of non-vaccine serotypes, a phenomenon referred to as vaccine replacement. As vaccine serotypes are eliminated from the ecological niche of the human nasopharynx, non-vaccine serotypes acquire an ecological advantage, leading to an increase in their prevalence as colonizers and, consequently, their potential to cause disease. For this reason, we decided to conduct a study on IPD in the pediatric population of the Valencian Community. This research compiles reported cases of IPD over an extended period, with the aim of analyzing the epidemiological patterns and assessing the impact of the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) into the childhood vaccination schedule.

Furthermore, the vaccine response to the complete schedule of PCV13 was evaluated in children with immunodeficiency, as these patients are more prone to recurrent and severe infections, which negatively impact their health and quality of life. In this context, plasma levels of immune response components (such as lymphocyte populations, immunoglobulins, etc.) were monitored, as well as the anti-PnPs IgG titers in the serum of these patients following the complete administration of the PCV13 vaccination schedule. The aim of collecting these data was to establish associations between vaccine hyporesponsiveness and the plasma concentration of these markers. A statistically significant association was demonstrated between protective anti-PnPs IgG titers following PCV13 administration and elevated levels of CD4+/CD8+T and CD56+/CD16+ NK cells.

Finally, we validated the Surface Plasmon Resonance (SPR) technique for measuring anti-PnPs IgG in serum, with the aim of incorporating this novel methodology into routine clinical practice, replacing the conventional ELISA method. SPR offers several potential advantages over commercially available ELISA kits. In our study, we found a strong correlation between the anti-PnPs IgG concentrations measured by ELISA and the UR signal obtained through SPR, demonstrating good sensitivity and optimal reproducibility. As of current knowledge, this is the first study to demonstrate that SPR-based methods provide reliable and accurate measurements of serum anti-PnPs IgG levels in a very short experimental timeframe.

INDICE

1. Introducción	20
1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>.....	22
1.1.1 Marco histórico y características microbiológicas.....	22
1.1.2 Factores de virulencia.....	23
1.1.3 Sensibilidad antibiótica	26
1.1.4 Sintomatología y manifestaciones clínicas	27
1.1.5 Vacunas neumocócicas	30
1.1.6 Epidemiología de la ENI en la Comunidad Valenciana	33
1.2 Métodos de medición de la respuesta vacunal a las vacunas antineumocócicas	35
1.2.1 Radioinmunoensayo	35
1.2.2 Hemaglutinación	36
1.2.3 ELISA.....	37
1.2.4 Ensayos multiplexados (micromatrices)	40
1.2.5 Ensayos de opsonofagocitosis (OPA)	41
1.2.6 Diagnóstico de inmunodeficiencias mediante inmunoensayos.....	43
1.3 Resonancia de Plasmón Superficial (RPS) como nueva metodología para la medición de IgG anti-PnPs (polisacáridos de neumococo)	45
1.3.1 Principios de la metodología de RPS	45
1.3.2 Aplicaciones tecnológicas de la RPS en la práctica clínica	47
1.3.3 Utilización de RPS en el desarrollo y evaluación de vacunas	48
2. Justificación y objetivos de las publicaciones	50
3. Metodología.....	58
3.1 Study of Paediatric Invasive Pneumococcal Disease in the 13-pneumococcal conjugated vaccine era	60
3.1.1 Diseño del estudio	60
3.1.2 Definición de los casos	60
3.1.3 Serotipado de las cepas	60
3.1.4 Cobertura vacunal y definición de fallo vacunal.....	61
3.1.5 Sujetos del estudio.....	61
3.1.6 Análisis estadístico	62
3.2 IgG antibody response to pneumococcal-conjugated vaccine (Prevenar®13) in children with immunodeficiency disorders.....	63
3.2.1 Diseño del estudio	63
3.2.2 Variables recogidas	63
3.2.3 Sujetos del estudio.....	64
3.2.4 Técnicas utilizadas para la medición de variables analíticas.....	64
3.2.5 Análisis estadístico	65
3.3 A surface plasmon resonance based approach for measuring response to pneumococcal vaccine	66
3.3.1 Diseño del estudio	66
3.3.2 ELISA para la cuantificación de anti-PnPs IgG.....	66
3.3.3 Purificación de las IgGs totales.....	66
3.3.4 Cuantificación del título de anti-PnPs IgGs por RPS	69
3.3.5 Análisis estadístico	71
4. Resultados.....	72
5. Trabajos publicados.....	76
5. Discusión.....	116
6. Conclusiones	124
7. Bibliografía	128

ABREVIATURAS

Aly: Autolisina

AVE: Sistema de Análisis Epidemiológico de la Comunidad Valenciana

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CPS: Cápsula polisacárida

CV: Comunidad Valenciana

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima

ENI: Enfermedad Neumocócica Invasiva

ESID: Sociedad Europea de Inmunodeficiencias

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

HUP La Fe: Hospital Universitario y Politécnico La Fe

ID: Inmunodeficiencia

IgG: Inmunoglobulina

IL: Interleuquina

IP: Inmunodeficiencia primaria

IS: Inmunodeficiencia secundaria

LCR: Líquido cefalorraquídeo

NAC: Neumonía adquirida en la comunidad

OMA: Otitis media aguda

OPA: Actividad opsonofagocítica

Ply: Neumolisina

PnPs: Polisacáridos de *S. pneumoniae*

Psp: Proteínas de superficie

RedMIVA: Red de Vigilancia Microbiológica de la Comunidad Valenciana

RIA: Radioinmunoensayo

RPS: Resonancia de Plasmón Superficial

TNF: Factor de necrosis tumoral

UR: Unidades de resonancia

VNC: Vacuna neumocócica conjugada

VNP: Vacuna neumocócica polisacárida

LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

- Tabla 1.1.** Factores que predisponen a padecer una infección por *S. pneumoniae*.
- Tabla 1.2.** Características de los casos de ENI en la Comunidad Valenciana (2014-2023).

FIGURAS

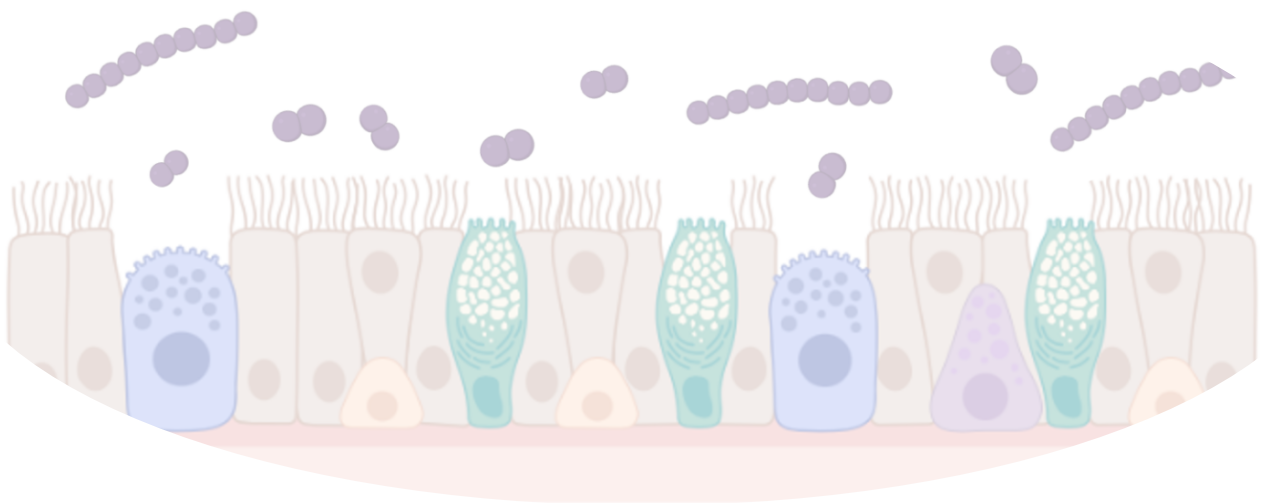
- Figura 1.1.** Visualización de tinción de Gram de *S. pneumoniae* (x100).
- Figura 1.2.** Crecimiento de *S. pneumoniae* en agar sangre con sensibilidad a la optoquina.
- Figura 1.3.** Representación esquemática de los principales factores de virulencia de *S. pneumoniae* y localización en la bacteria.
- Figura 1.4.** Procesos de transmisión, colonización e invasión de *S. pneumoniae* en el hospedador.
- Figura 1.5.** Serotipos incluidos en las diferentes vacunas antineumocócicas comercializadas.
- Figura 1.6.** Distribución anual de casos de ENI en la Comunidad valenciana (2011-2023).
- Figura 1.7.** Etapas del ensayo de RIA para la determinación de anticuerpos anti-CPS en suero.
- Figura 1.8.** Etapas del método de hemaglutinación para la determinación de anticuerpos anti-CPS en suero.
- Figura 1.9.** Esquema del ELISA de la OMS (WHO ELISA) para la determinación de anticuerpos IgG anti-CPS.
- Figura 1.10.** Detección de anticuerpos anti-CPS de *S. pneumoniae* mediante ensayos multiplexados basados en microesferas (micromatrices).
- Figura 1.11.** Ensayo clásico de OPA donde se mide la mortalidad de un serotipo específico de *S. pneumoniae*.
- Figura 1.12.** Ensayo de OPA múltiple (MOPA) de distintos serotipos de *S. pneumoniae*.

Figura 1.13. Esquematización del proceso de RPS.

Figura 3.1. Esquema de las etapas previas a la realización del experimento de RPS.

Figura 3.2. Esquema del proceso de cuantificación de anti-PnPs IgGs en el suero de los pacientes mediante RPS.

1. Introducción



1.1 *Streptococcus pneumoniae*

1.1.1 Marco histórico y características microbiológicas

Streptococcus pneumoniae fue descubierto de manera casi simultánea en 1881 por Louis Pasteur en Francia y George Miller Sternberg en EE. UU. Años más tarde fue reconocido como la causa más frecuente de neumonía lobar y empezó a denominarse neumococo. En 1926 se le asignó el nombre de *Diplococcus pneumoniae*, por su apariencia en la tinción de Gram, y en 1974 fue renombrado como *S. pneumoniae*, por su morfología durante el crecimiento en medio líquido. En los primeros años de la década de 1980, Felix y Georg Klemperer demostraron que la inmunización con neumococos inactivados protegía a los conejos frente a la subsiguiente inoculación con neumococos, y que esta protección se podía transferir infundiendo suero procedente de conejos inmunizados a receptores sin exposición previa. Neufeld y Rimpau demostraron que la base de esta inmunidad era la presencia de uno o varios factores en el suero que facilitaban la fagocitosis por los leucocitos (opsonización). Estos estudios sentaron las bases de lo que hoy llamamos inmunidad humoral^{1,2}.

S. pneumoniae es una bacteria Gram-positiva que presenta una forma cocoide con extremos lanceolados. Se dispone típicamente en parejas, especialmente en muestras clínicas, aunque también puede encontrarse formando cadenas cortas sobre todo en medio líquido³ (**Figura 1.1**).

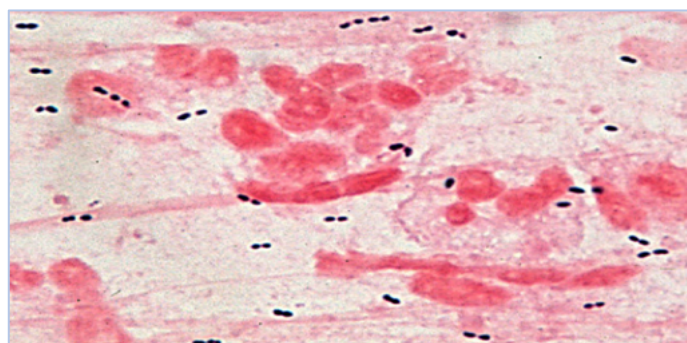


Figura 1.1. Visualización de tinción de Gram de *S. pneumoniae* (x100).

Este microorganismo, anaerobio facultativo, es auxótrofo para la colina y crece en agar sangre con atmósfera al 5% de CO₂ dando lugar a colonias α -hemolíticas⁴. Su identificación en el laboratorio puede llevarse a cabo mediante tres pruebas bioquímicas: 1) solubilidad de las colonias en sales biliares (desoxicolato sódico); 2) ausencia de actividad catalasa, y 3) sensibilidad a la optoquina (**Figura 1.2**).

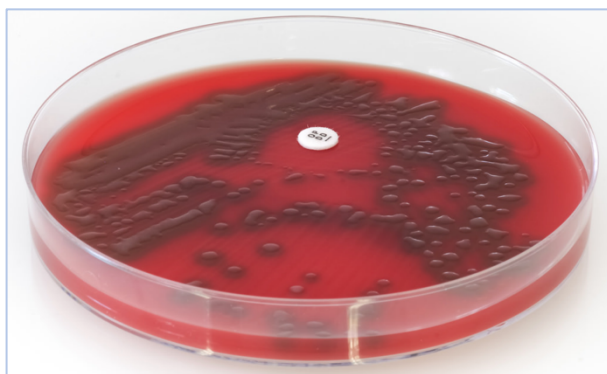


Figura 1.2. Crecimiento de *S. pneumoniae* en agar sangre con sensibilidad a la optoquina.

No obstante, algunas cepas presentan resistencia a la optoquina. El peptidoglucano y el ácido teicoico son los principales componentes de la pared del neumococo. El ácido teicoico es un polímero de hidrato de carbono que contiene fosforilcolina, el cual está unido covalentemente al peptidoglucano en la superficie externa de la pared bacteriana. El ácido teicoico y fragmentos estrechamente adheridos del peptidoglucano componen el polisacárido C, el cual está presente en todas las cepas de *S. pneumoniae*⁵.

1.1.2 Factores de virulencia

La habilidad del neumococo para sobrevivir dentro del hospedador está relacionada con el genotipo bacteriano el cual determinará la expresión de una serie de genes de virulencia involucrados en la interacción patógeno-hospedador, situación que le permitirá resistir el estrés fisiológico y ambiental⁶. *S. pneumoniae* presenta numerosos factores de virulencia entre los que destacan los descritos a continuación (**Figura 1.3**).

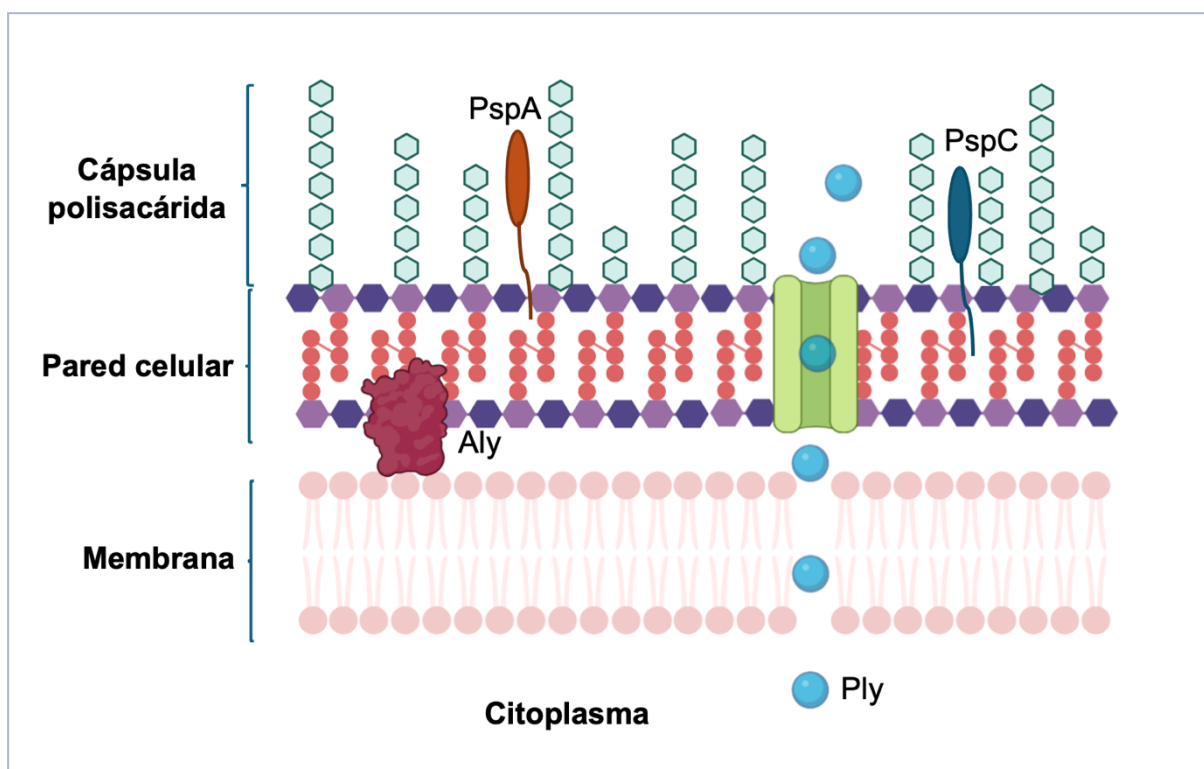


Figura 1.3. Representación esquemática de los principales factores de virulencia de *S. pneumoniae* y localización en la bacteria (citoplasma, membrana, pared celular y cápsula polisacárida). **Ply:** Neumolisina, **Aly:** Autolisina, **PspA** y **PspB:** proteínas de superficie A y B respectivamente.

Cápsula polisacárida:

La cápsula, constituida por un polisacárido complejo variable en diferentes cepas (CPS: *capsular polysaccharide*), es el factor de virulencia más importante, ya que las cepas capsuladas son capaces de eludir la acción fagocitaria mediada, o no, por el sistema del complemento⁷. Hasta la fecha se han identificado al menos 97 serotipos de *S. pneumoniae* en función de diferencias antigénicas. Prácticamente la totalidad de los aislados clínicos de *S. pneumoniae* están rodeados por CPS constituyendo la piedra angular de la patogénesis de las infecciones neumocócicas. No obstante, se han documentado casos de cepas no capsuladas implicadas en brotes de conjuntivitis⁸.

Además, la capacidad antigénica de la CPS es la base de las actuales vacunas, ya que los anticuerpos anti-capsulares son los que confieren principalmente la protección frente a la enfermedad neumocócica⁷. Asimismo, cada serotipo presenta unas propiedades intrínsecas que condicionarán la interacción con el hospedador. De este modo, las cepas de los serotipos 3, 7F y 19A son encontradas habitualmente en la población adulta, especialmente a partir de los 65 años⁹. Mientras que los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F afectan principalmente a la población pediátrica¹⁰. No obstante, tras la implantación generalizada de la vacunación antineumocócica en los países desarrollados la casuística está cambiando debido al remplazo por serotipos no incluidos en las vacunas¹¹.

Neumolisina:

Es una toxina con efecto proinflamatorio, la cual estimula la producción de TNF, IL-1 e IL-8 en macrófagos, células dendríticas, epiteliales y endoteliales, lo que potencia la patogénesis y diseminación de la bacteria. Además, inhibe directamente la migración de neutrófilos y activa la vía clásica del complemento, lo que disminuye las reservas de complemento¹².

Autolisina:

La autolisina neumocócica es un factor de virulencia implicado en la autólisis, así como en la lisis inducida por penicilinas¹³. La función *in vivo* de la autolisina sigue siendo controvertida. En modelos murinos, las cepas de neumococo deficientes en este componente son menos virulentas que las cepas salvajes, aunque no está claro cómo contribuye a la virulencia de la bacteria. La liberación de otros factores de virulencia tras la lisis bacteriana como proteínas implicadas en la evasión inmunitaria podría ser una explicación plausible¹².

Proteínas de superficie:

Las proteínas de superficie son un importante factor de virulencia de *S. pneumoniae* ya que participan activamente en la interacción patógeno-hospedador. Presentan un importante potencial inmunógeno lo que las convierte en candidatas perfectas para el desarrollo de nuevas vacunas como antígenos proteicos.

Las proteínas de unión a la colina (LytA, LytB, LytC, PspA, PspC), son algunas de las representantes más relevantes de este grupo¹⁴. La LytA es la autolisina responsable de la autólisis celular por hidrólisis del peptidoglucano. Durante este proceso se produce la liberación de productos derivados de la degradación de la pared celular, así como de la neumolisina, lo cual produce una inflamación generalizada a nivel endotelial¹⁵. Esto permite la diseminación de la bacteria a través del torrente circulatorio. La LytB ha sido relacionada con el proceso de adhesión a células de nasofaringe humana durante el proceso de colonización y con la evasión de la fagocitosis mediada por el sistema del complemento¹⁵.

La LytC también es una lisozima que contribuye a la virulencia al liberar otros factores de virulencia y mediadores inflamatorios¹⁶. La PspA interfiere en la activación de la vía clásica del complemento y permite evadir la actividad de la vía alternativa del complemento mediada por el factor B¹⁷. La PspC es una adhesina que favorece la colonización de la nasofaringe humana, así como la transición a través del epitelio¹⁸.

1.1.3 Sensibilidad antibiótica

Hasta 1977 prácticamente la totalidad de aislados de *S. pneumoniae* inhibían su crecimiento con concentraciones de penicilina $\leq 0,06$ $\mu\text{g/mL}$. Ese año se describió el primer caso de resistencia del neumococo a la penicilina asociado a fracasos terapéuticos, especialmente en meningitis¹⁹. Aislados de neumococo con una concentración mínima inhibitoria (CMI) $\leq 0,06$ $\mu\text{g/mL}$ se consideraron sensibles a la penicilina y aquellos con una CMI $\geq 0,12$ $\mu\text{g/mL}$, resistentes. En 2008 las definiciones de sensibilidad a la penicilina se modificaron según el lugar de la infección, haciendo una distinción clara entre meningitis y otros cuadros clínicos¹². Actualmente, según el EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) una CMI $\leq 0,06$ $\mu\text{g/mL}$ se considera sensible con independencia del tipo de cuadro clínico, mientras que para la definición de resistente diferencia la meningitis (CMI $> 0,06$ $\mu\text{g/mL}$) del resto de cuadros clínicos (CMI > 2 $\mu\text{g/mL}$)²⁰.

Los betalactámicos (penicilinas y cefalosporinas) son el tratamiento de elección de las infecciones neumocócicas, aunque pueden emplearse otros antibióticos, así como combinaciones de estos en función de la gravedad del cuadro clínico y del tipo de paciente. En infecciones no complicadas como la otitis media, la sinusitis o la neumonía no grave puede emplearse amoxicilina, levofloxacino o moxifloxacino. En infecciones invasivas graves se utilizan fármacos de mayor espectro como ceftriaxona, cefotaxima, linezolid o vancomicina, entre otros²¹. En España, el 20% de las cepas tienen resistencia intermedia a penicilina y menos del 5% resistencia de alto nivel; además, el 20% de los aislados son resistentes a macrólidos y cerca del 2% a levofloxacino⁹.

1.1.4 Sintomatología y manifestaciones clínicas

El principal mecanismo de transmisión de *S. pneumoniae* es a través del contacto directo persona-persona mediante las secreciones respiratorias del portador/enfermo e individuos sanos. La propagación de la bacteria a través de fómites, aunque mucho menos habitual, también ha sido demostrada ya que el neumococo puede crear biopelículas en objetos inanimados y sobrevivir durante periodos de tiempo prolongados en el medio ambiente²². En las primeras semanas de vida, la prevalencia de colonización se sitúa en torno a un 10%, llegando a presentar un pico del 70-100% en el primer año de vida. En la edad adulta estos valores descienden por debajo de un 5%. La mayoría de los episodios de colonización son asintomáticos, ya que el hospedador es capaz de eliminar la bacteria²²⁻²⁴.

En algunas ocasiones, se dan las condiciones óptimas para que el neumococo se adhiera y multiplique en el epitelio (infecciones virales previas, microbioma polimicrobiano, neuraminidasas neumocócicas...) y de esta forma consiga propagarse a otros tejidos y órganos dando lugar a infecciones²⁵. La **Figura 1.4** esquematiza los procesos de transmisión, colonización e invasión de *S. pneumoniae* en el hospedador.

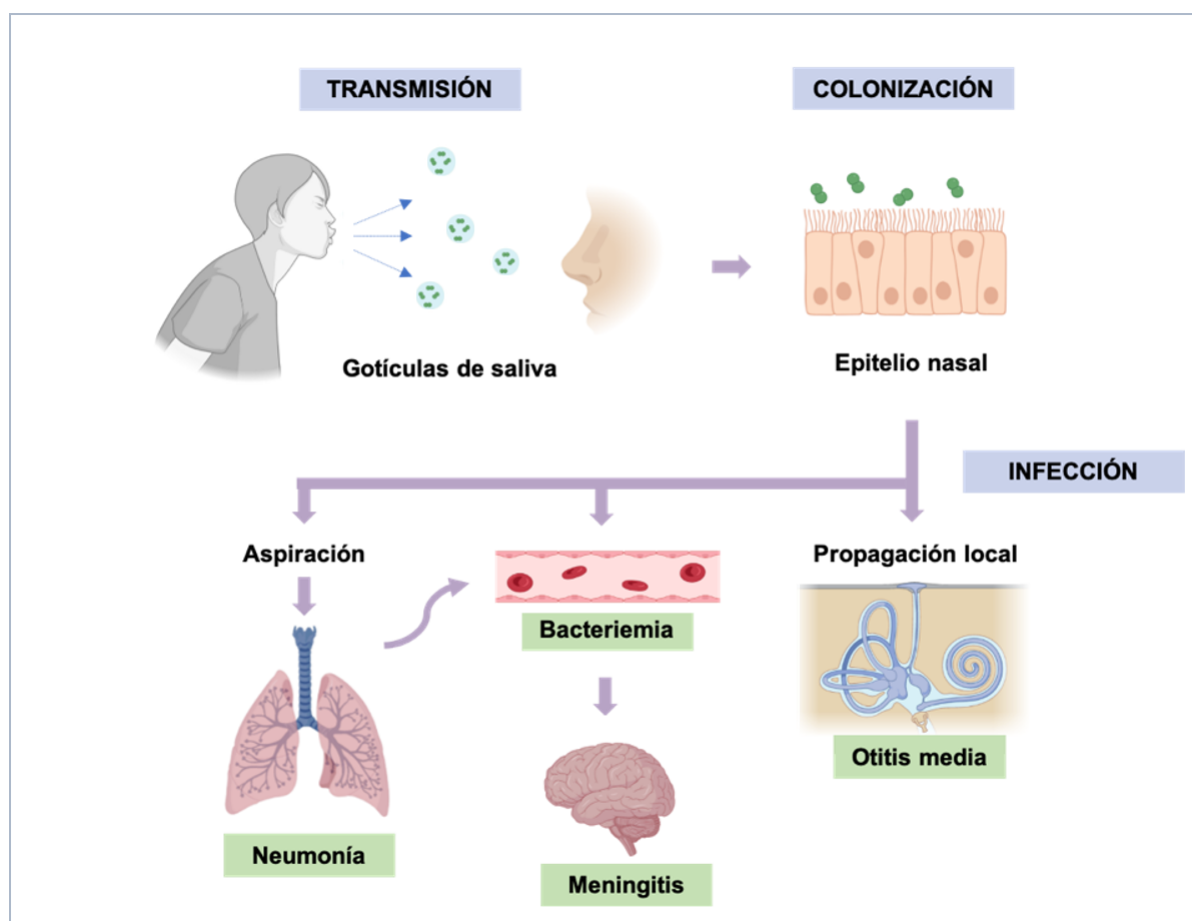


Figura 1.4. Procesos de transmisión, colonización e invasión de *S. pneumoniae* en el hospedador. Una vez que el neumococo ha colonizado la nasofaringe, puede invadir otras zonas adyacentes como los senos paranasales, la trompa de Eustaquio, la tráquea, y el árbol bronquial dando lugar a cuadros clínicos tales como otitis, sinusitis o incluso neumonía. Esta situación suele aparecer en individuos susceptibles o con factores predisponentes tras superar los mecanismos locales de aclaramiento de la bacteria. En ocasiones, tras diseminación hematógena, el neumococo consigue acceder al sistema nervioso central, el endocardio, las articulaciones o la cavidad peritoneal, entre otras localizaciones produciendo cuadros invasivos graves.

Las infecciones por *S. pneumoniae* son responsables de 1,6 millones de muertes anuales en el mundo²⁶, constituyendo la enfermedad prevenible por vacunas con mayor mortalidad en población infantil, ancianos, inmunodeprimidos²⁷ e inmunocompetentes con factores de riesgo. En la **Tabla 1.1** se resumen los factores que predisponen a padecer una infección por *S. pneumoniae*²⁸.

Tabla 1.1. Factores que predisponen a padecer una infección por *S. pneumoniae*.

Factor	Situaciones predisponentes
Mayor riesgo de exposición	Residencias de ancianos/discapacidad, guarderías, prisiones, albergues
Factores locales (favorecen la localización y dificultan el aclaramiento mucociliar)	Colonización, infección viral previa, asma bronquial, EPOC, tabaquismo, insuficiencia cardíaca, intubación, broncoaspiración, disminución del nivel de conciencia
Déficit en la producción de anticuerpos	<u>Primaria:</u> agammaglobulinemia e hipogammaglobulinemia, déficit de subclases de IgG <u>Secundaria:</u> mieloma múltiple, linfoma, leucemia linfocítica crónica, VIH
Déficit de factores del complemento	C1, C2, C3b, C4
Neutropenia	Neutropenia cíclica, quimioterapia, aplasia medular
Alteración de la quimiotaxis leucocitaria	Alcoholismo, cirrosis hepática, diabetes mellitus, insuficiencia renal crónica, corticoides
Disminución del aclaramiento bacteriano	Asplenia congénita o esplenectomía
Multifactorial	Edades extremas, desnutrición, diabetes mellitus, corticoides, enfermedades crónicas, alcoholismo, hospitalizaciones prolongadas
Otros	Cansancio extremo, exposición al frío, estrés

Dentro de la patogénesis asociada a *S. pneumoniae* se diferencian procesos invasivos que se engloban dentro de la enfermedad neumocócica invasiva (ENI), y no invasivos. La ENI se define como el aislamiento de *S. pneumoniae*, la detección de su ácido nucleico o de sus antígenos en una localización habitualmente estéril como sangre, LCR, líquido sinovial, líquido pleural, etc.

Los cuadros clínicos más característicos de la ENI son: bacteriemia, endocarditis, artritis séptica, empiema, pericarditis, peritonitis y meningitis; todos ellos con elevada mortalidad asociada²⁸. En Galicia, un estudio realizado durante 2 años estimó que la tasa de letalidad por ENI fue del 16,5%, llegando al 23,3% en mayores de 75 años⁹; en Andalucía, la letalidad media por ENI fue de un 20% en el 2010²⁹; en Madrid en el periodo 2007-2009³⁰, la letalidad media fue del 11,1% y en la Comunidad Valenciana, la letalidad media en el periodo 2007-2012 fue del 15,5%. En esta misma comunidad autónoma, aunque ha disminuido la prevalencia de ENI en el periodo 2007-2016, ha aumentado el número de pacientes hospitalizados por ENI, a pesar de que la mayoría de ellos había sido previamente vacunados³¹.

Entre los cuadros no invasivos producidos por *S. pneumoniae* destacan la otitis, la mastoiditis y la neumonía. La invasividad no es requisito indispensable para la gravedad de la infección, puesto que en España *S. pneumoniae* es responsable de hasta el 63,7% de las neumonías adquiridas en la comunidad (NAC) según series³², con un total de 75.932 muertes en adultos a partir de los 50 años en el periodo 2003-2007³³. La gravedad y globalidad de estas infecciones, unidas al incremento de la resistencia a los antibióticos observada en los últimos años, convierten a la vacunación en un recurso sanitario muy valioso para su prevención.

1.1.5 Vacunas neumocócicas

La vacunación con polisacáridos capsulares es la base del control de la enfermedad neumocócica. Actualmente se dispone de dos tipos de vacunas de amplia utilización, las vacunas neumocócicas conjugadas (VNC) y las vacunas neumocócicas polisacáridas (VNP). Las VNC contienen polisacáridos capsulares conjugados con la proteína transportadora CRM197. Esta conjugación produce: i) una respuesta timo-dependiente con inducción de memoria inmunológica, mediada por células B, ii) una elevación rápida de los niveles de IgG, sobre todo de IgG1, la cual fija bien el complemento, de importancia capital para la fagocitosis bacteriana, y iii) no provoca fenómeno de tolerancia o hiporrespuesta tras dosis repetidas³⁴.

Todas estas características las convierten en candidatas idóneas para su utilización tanto en niños como en adultos. Por otra parte, las VNP son poco inmunógenas por debajo de los 18 meses de edad, su inmunidad se reduce con el tiempo y genera tolerancia³⁵. Por esta razón se administran únicamente en población adulta. En la **Figura 1.5** se indican los serotipos de las diferentes vacunas antineumocócicas comercializadas hasta la fecha.

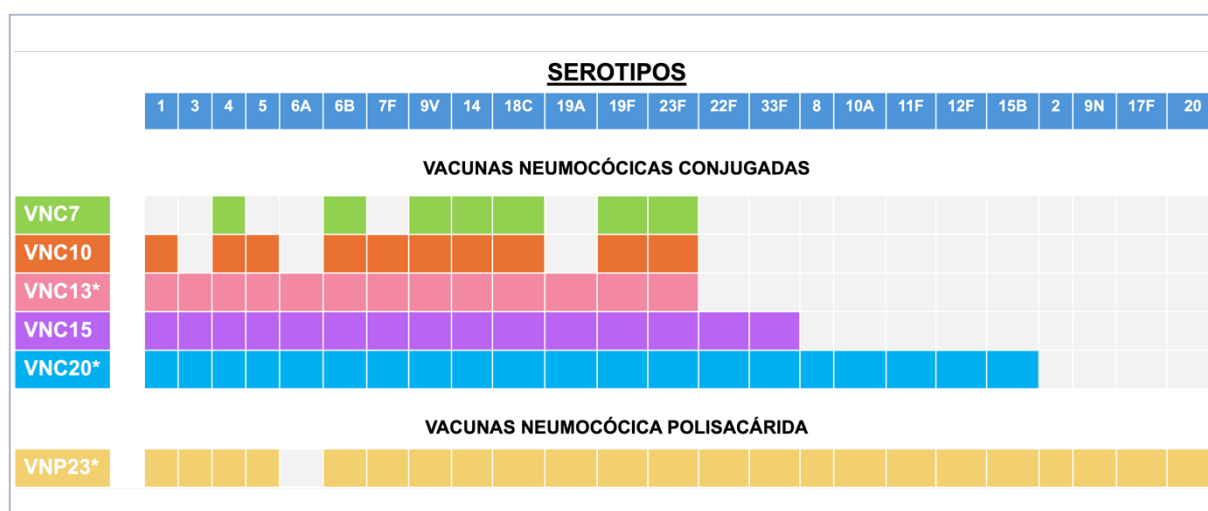


Figura 1.5. Serotipos incluidos en las diferentes vacunas antineumocócicas comercializadas. *Vacunas utilizadas actualmente en España.

En España, la vacunación sistemática con VNC (VNC7, VNC10, VNC13) en la edad pediátrica se introdujo en 2015 (y en todas las Comunidades Autónomas en 2016); aunque, desde su comercialización en 2001, se ha administrado a la población infantil sólo por prescripción privada. Actualmente, y siguiendo las recomendaciones de la Asociación Española de Pediatría, el calendario vacunal completo para neumococo debe incluir 3 dosis de VNC13 o VNC20 (de reciente comercialización en España), las 2 primeras a los 2 y 4 meses, con un refuerzo a partir de los 11 meses de edad³⁶. En la población adulta se recomienda vacunar con VNP23 a los mayores de 65 años, sin necesidad de dosis de refuerzo salvo en casos especiales, y con VNC13 o VNC20 a la población adulta perteneciente a grupos de riesgo (inmunodeficiencia, enfermedades crónicas, implantes cocleares, etc.).

Pese a la amplia utilización de estas vacunas, la NAC y la ENI por *S. pneumoniae* son dos de las enfermedades infecciosas con mayor prevalencia en países con amplia cobertura vacunal. Según el *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), la incidencia de ENI global en Europa en 2015 fue de 5,6 casos por 10⁵ habitantes³⁷. Desde la comercialización de las vacunas antineumocócicas, se han realizado múltiples estudios para evaluar la eficacia de las mismas, así como la relación coste-efectividad. Por lo que respecta a la VNP23, Bouza *et al.*, en un metaanálisis realizado en 2013, mostraron que la efectividad de la VNP23 en personas inmunocompetentes fue del 50-80% en la prevención de la ENI, pero sin demostración concluyente de protección frente a la neumonía no bacteriémica³⁸. En pacientes pertenecientes a poblaciones de riesgo, otro metaanálisis mostró que no hubo evidencia de protección con la VNP23, ni de reducción de la neumonía, ni de la mortalidad³⁹. Un ensayo clínico realizado en pacientes infectados por el VIH en Uganda con VNP23 frente a placebo observó la ausencia de eficacia vacunal para la prevención del primer episodio de ENI⁴⁰.

Otro estudio realizado en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, tratados con anti-TNF o con inmunosupresores combinados (anti-TNF y tiopurinas), ha mostrado que la inmunogenicidad de la VNP23 se ve disminuida⁴¹. En el Reino Unido donde la cobertura vacunal de la población alcanza el 75%, no se evidenció la efectividad vacunal de la VNP23 en población con enfermedad de base ni en mayores de 75 años⁴².

El uso de la vacuna VNC13 en nuestro país se asocia con una reducción en la tasa de incidencia de hospitalizaciones por ENI del 55% ($p < 0,001$), en niños menores de 15 años, y de hasta un 63% ($p < 0,001$) en niños de entre 12 y 24 meses⁴³. Estos datos se asemejan a los obtenidos en otros países como Reino Unido o EE.UU.⁴⁴. Pese a que la VNC13 muestra mejor perfil de eficacia que la VNP23, en algunos estudios la respuesta en mayores de 60 años es menor de la esperada⁴⁵, así como en pacientes con leucemia linfocítica crónica⁴⁶.

Es difícil de estimar el impacto coste-efectivo de la vacunación antineumocócica en adultos con enfermedad de base. Un estudio realizado en 10 países europeos, incluido España, evaluó el impacto económico de la utilización de la VNP23 para prevenir la ENI en adulto. La vacunación fue coste-efectiva en todos los países y en España los costes por QALY en adultos ≥ 65 años fueron de 9.187 euros⁴⁷. Sin embargo, estudios posteriores realizados en Alemania mostraron que la estrategia de vacunar a adultos con VNC13 resultó más coste-efectiva que vacunar con VNP23 y que no vacunar⁴⁸.

1.1.6 Epidemiología de la ENI en la Comunidad Valenciana

Desde el 1 de enero de 2007, la ENI es una enfermedad de declaración obligatoria (EDO) en la Comunidad Valenciana, registrándose los casos mediante el sistema AVE de Vigilancia Epidemiológica. Este sistema recopila automáticamente información sociodemográfica y de cobertura vacunal. Además, la Red de Vigilancia Microbiológica de la Comunidad Valenciana (RedMIVA) integra en tiempo real los resultados microbiológicos de los hospitales en el sistema AVE³¹.

Las cepas de neumococo aisladas en muestras clínicas por los diferentes laboratorios de microbiología de la Comunidad Valenciana, que cumplen con la definición de caso de ENI, son remitidas para su serotipado al laboratorio de referencia. Hasta 2019, estas cepas eran enviadas al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (HUP La Fe); sin embargo, a partir de 2020, el Hospital General Universitario de Valencia actúa como laboratorio de referencia. Con toda la información recopilada, el Servicio de Vigilancia y Control Epidemiológico elabora un informe anual de la vigilancia epidemiológica de la ENI en la Comunidad Valenciana, el cual es de acceso libre a través del portal de la Conselleria de Sanitat i Salut Pública. La **Figura 1.6** muestra la distribución anual del número de casos notificados de ENI en la Comunidad Valenciana, así como el porcentaje de vacunación de los mismos, desde el 2011 al 2023³¹.

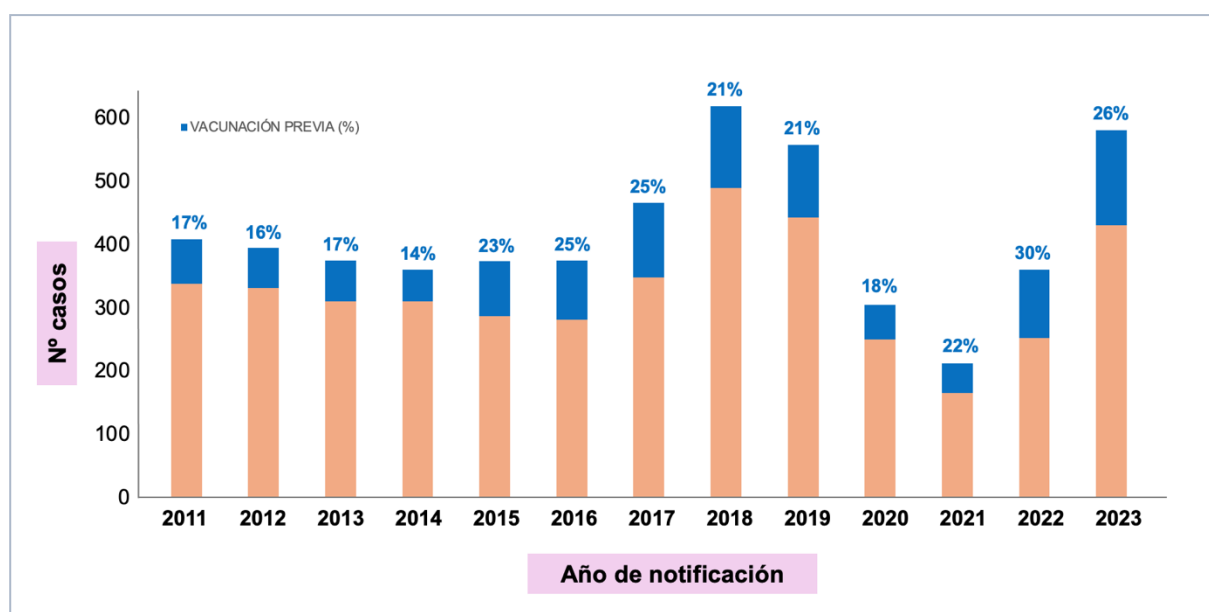


Figura 1.6. Distribución anual de casos de ENI en la Comunidad Valenciana (2011-2023).

En la **Tabla 1.2** se resumen algunas de las características generales de los casos de ENI en la Comunidad Valenciana desde el 2014 al 2023³¹.

Tabla 1.2. Características de los casos de ENI en la Comunidad Valenciana (2014-2023).

	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023
Casos notificados	360	373	374	466	618	557	304	212	360	580
Tasa de ENI (por 10⁵)	7	7,4	7,5	9,4	12,5	11,14	6,04	4,16	6,95	11,1
Enfermedad de base (%)	67,5	69,4	69,8	71	68,3	65,7	68,4	68,4	60,8	65,86
Letalidad (%)	19,2	18,5	17,4	16,9	15,8	15,8	15,5	20,3	11,7	13,1
Hospitalización (%)	93,1	92,5	94,9	92,3	93,5	91	93,4	95,3	94,2	93,3
Sepsis	86	94	76	104	151	141	73	59	81	129
Meningitis	47	53	59	61	67	56	35	31	42	84
Neumonía	179	173	192	244	337	279	165	91	190	298

1.2 Métodos de medición de la respuesta vacunal a las vacunas antineumocócicas

Desde un punto de vista clínico, no es fácil valorar la efectividad real de las vacunas antineumocócicas, sobre todo en grupos de riesgo e inmunodeprimidos, a pesar de que representan el grupo de población diana para el uso de estas vacunas, por la mayor morbi-mortalidad asociada de la ENI. La OMS ha definido los siguientes criterios serológicos de protección conjunta para todos los serotipos frente a ENI: un título $\geq 0,35$ $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpos IgG anti-CPS (enzimoinmunoensayo; ELISA) y una actividad opsonofagocítica (OPA) del suero $\geq 1/8$ un mes después de la primovacunación.

Los títulos protectores frente a neumonía y frente a la otitis media aguda (OMA) están peor definidos, pero es probable que para la primera se necesiten títulos 3-4 veces superiores a los de la ENI, mientras que para la segunda son necesarios títulos >10 veces superiores⁴⁹. Pese a que el ELISA es la técnica *gold standard*, puede considerarse tediosa debido a los numerosos pasos técnicos y de manipulación necesarios, dificultando su utilización de manera rutinaria. Con esta premisa surge la necesidad de desarrollar nuevos métodos analíticos que cuantifiquen la eficacia vacunal sobre todo en pacientes de especial riesgo, como los inmunodeprimidos.

1.2.1 Radioinmunoensayo

El radioinmunoensayo (RIA) es uno de los métodos clásicos para la medición de la respuesta vacunal. Se trata de un método radioinmunocéntrico basado en la formación específica de complejos antígeno-anticuerpo. El RIA mide la interacción entre los anticuerpos anti-CPS presentes en el suero de pacientes vacunados y epítomos de las vacunas neumocócicas por radiometría⁵⁰. En la **Figura 1.7** se esquematizan las etapas del RIA para la detección de anticuerpos anti-CPS en suero.

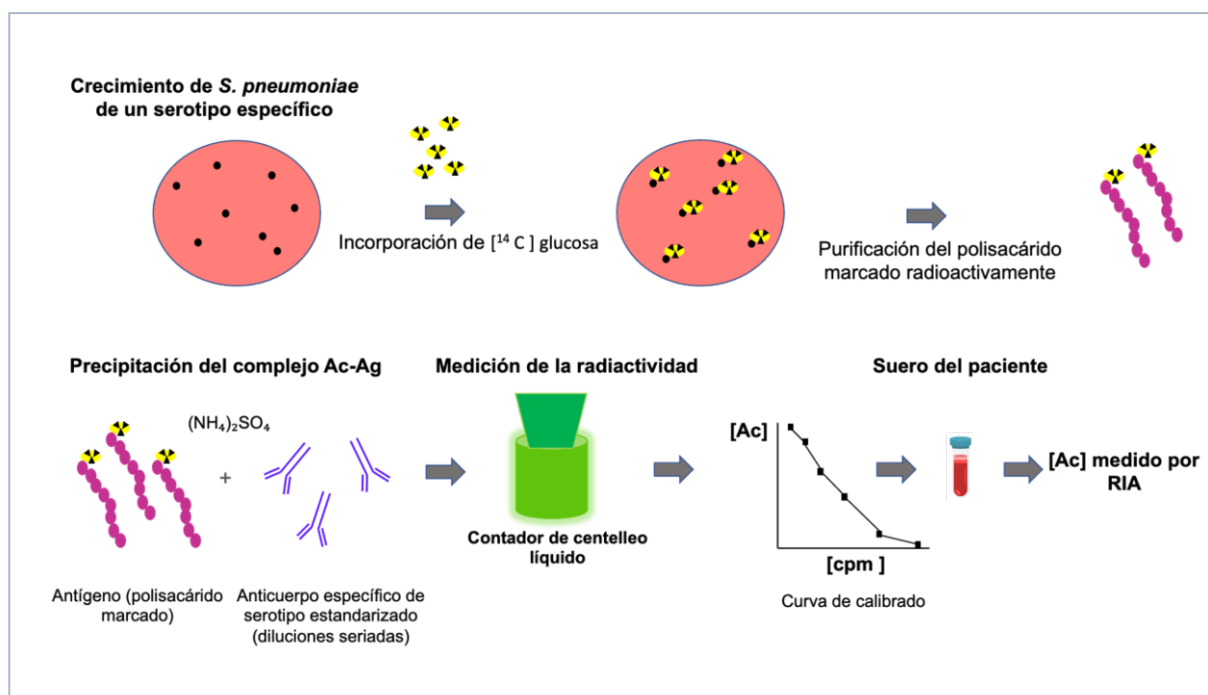


Figura 1.7. Etapas del método de RIA para la determinación de anticuerpos anti-CPS en suero.

A pesar de su alta sensibilidad, la falta de especificidad, los problemas de seguridad relacionados con la utilización de polisacáridos neumocócicos radiomarcados y su coste elevado han contribuido a remplazar esta técnica, casi en su totalidad, por el método de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)⁵⁰. Además, un estudio mostró la ausencia de correlación entre la respuesta de los anticuerpos antineumocócicos medidos por RIA con la frecuencia/gravedad de las infecciones en pacientes con inmunodeficiencia⁵¹.

1.2.2 Hemaglutinación

Las pruebas de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación se basan en la capacidad de algunos patógenos para aglutinar los eritrocitos. En el caso de la detección de anticuerpos antineumocócicos, los glóbulos rojos humanos recubiertos de polisacárido neumocócico se mezclan con una muestra de suero del paciente y se documenta la mayor dilución a la que se produce aglutinación.

Aunque estas pruebas son específicas de serotipo o subtipo y arrojan una sensibilidad aceptable, su estandarización no es sencilla, por lo que no se ha generalizado su uso para evaluar la respuesta vacunal a *S. pneumoniae*⁵². En la **Figura 1.8** se representa el proceso de hemaglutinación para la detección de anticuerpos anti-CPS de *S. pneumoniae*.

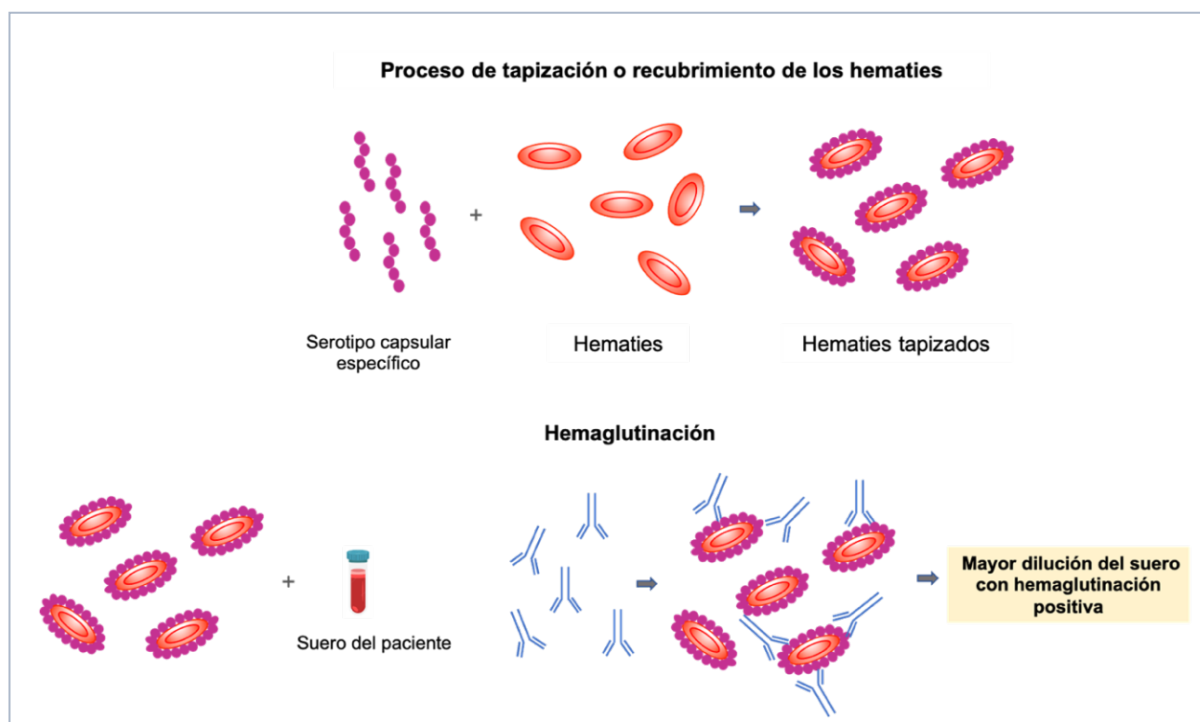


Figura 1.8. Etapas del método de hemaglutinación para la determinación de anticuerpos anti-CPS en suero.

1.2.3 ELISA

Debido en gran parte a las limitaciones ya mencionadas, el RIA y la hemaglutinación han sido reemplazadas por técnicas de ELISA. Esta metodología utiliza un enzima como marcador para medir la formación de complejos antígeno-anticuerpo.

Esta técnica presenta múltiples ventajas entre las que destacan: i) elevada sensibilidad, exactitud y especificidad, ii) equipamiento y reactivos relativamente baratos y de larga vida, iii) procedimientos técnicos rápidos y sencillos, y iv) gran variedad de sustratos y cromógenos que incrementan sustancialmente su versatilidad^{52,53}.

Estos ensayos se apoyan en tres características biológicas fundamentales: la extraordinaria especificidad de los anticuerpos, la alta selectividad y el elevado poder catalítico de las enzimas. La reacción antígeno-anticuerpo se detecta generalmente mediante un cambio de color o la emisión de luz, producidos por la interacción de la enzima y su sustrato. Ambos efectos son cuantificables y proporcionales a la intensidad de la interacción⁵⁴. La técnica de ELISA para la detección de anticuerpos antineumocócicos se desarrolló y perfeccionó durante las décadas de 1980 y 1990 y en la actualidad continúa siendo una de las técnicas más utilizadas en la práctica clínica habitual. La primera generación de ELISA para detectar anticuerpos antineumocócicos tendía a sobreestimar los niveles de anticuerpos debido a la presencia de anticuerpos no protectores.

Los ensayos de segunda generación consiguieron eliminar algunos de estos anticuerpos no funcionales mediante la preabsorción de sueros de prueba con polisacárido de la pared celular del neumococo, pero seguían sin ser específicos. La tercera generación de ELISA mejoró la especificidad mediante la preabsorción con polisacárido 22F en la placa y consiguió eliminar los anticuerpos no funcionales. Por esta razón se ha adoptado como técnica *gold standard* recomendada por la OMS (*WHO ELISA*), (**Figura 1.9**)^{49,52-55}.

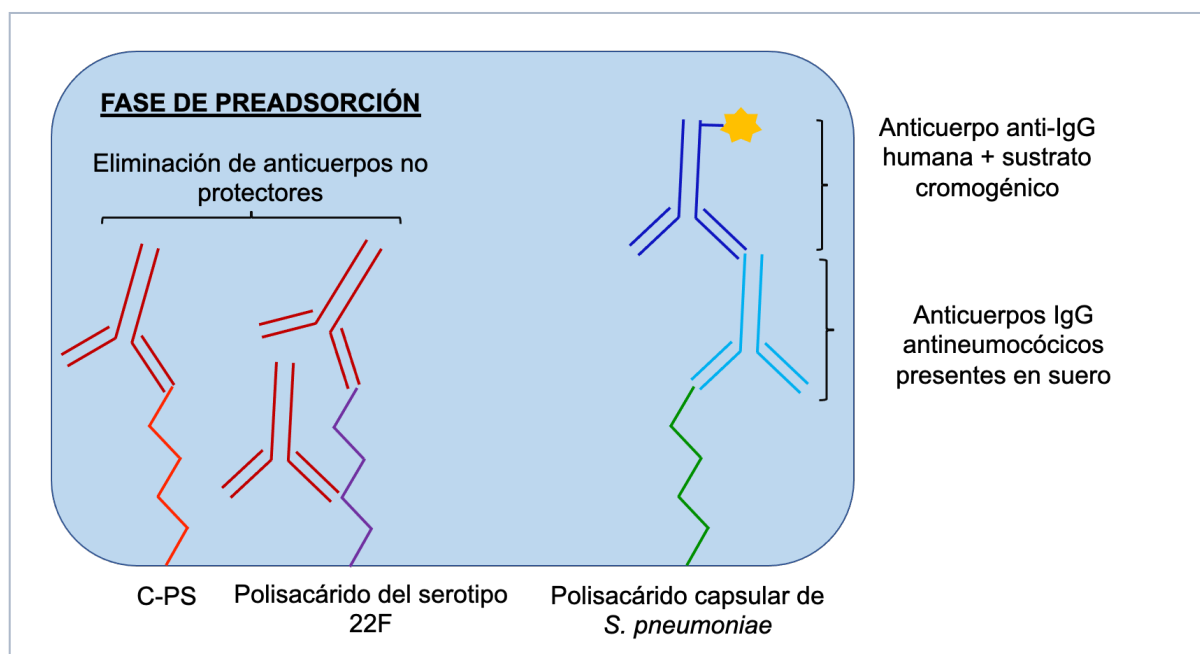


Figura 1.9. Esquema del ELISA de la OMS (*WHO ELISA*) para la determinación de anticuerpos IgG anti-CPS.

El ELISA de la OMS utiliza micropocillos recubiertos con polisacáridos de *S. pneumoniae* específicos de cada serotipo, a los que se unirán los anticuerpos IgG presentes en el suero, para posteriormente reaccionar con el sustrato cromogénico. La densidad óptica obtenida tras la interacción se correlacionará con la concentración de anticuerpos. Esta técnica se utilizó ampliamente en la evaluación y autorización de vacunas neumocócicas, particularmente en vacunas conjugadas en niños. El título de anticuerpos IgG antineumococo medido por el ELISA de la OMS se estableció como criterio de valoración de la eficacia primaria para la autorización inicial de las vacunas conjugadas en lactantes⁵⁶.

La OMS ha establecido un punto de corte de 0,35 µg/mL de anticuerpos IgG para autorizar el uso de vacunas contra la ENI en niños. Sin embargo, este umbral podría ser mayor en infecciones que requieran títulos más altos de anticuerpos, como la neumonía o la otitis media. Además, los niveles de protección vacunal pueden variar según el serotipo y la variabilidad del paciente. Por lo tanto, es importante tener en cuenta estos factores al evaluar la eficacia de las vacunas contra la ENI^{57,59}.

1.2.4 Ensayos multiplexados (micromatrices)

En los últimos años los ensayos de micromatrices han emergido como una de las tecnologías más notables e innovadoras entre las que se dispone actualmente para el análisis de moléculas biológicas de distinta naturaleza. Se basan en la medición de interacciones específicas entre las moléculas capturadas (antígenos, anticuerpos, proteínas, péptidos) en la superficie de la micromatriz y la muestra problema (suero, sangre, líquidos biológicos, etc.) mediante quimioluminiscencia, fluorescencia o colorimetría. Este método permite el análisis simultáneo de múltiples moléculas en una sola muestra, siendo valioso tanto para la investigación como para el diagnóstico⁶⁰.

Dado que la técnica de ELISA de la OMS requiere la realización de un ensayo independiente para cada serotipo analizado, la inclusión de serotipos adicionales en las vacunas neumocócicas conjugadas supuso un aumento del coste. Por esta razón los ensayos de micromatrices, y más concretamente los ensayos de matriz de microesferas multiplex (Luminex), han ido reemplazando al ELISA ya que permiten medir anticuerpos antineumococo contra múltiples serotipos en una sola muestra de suero⁶⁰⁻⁶².

Los anticuerpos antineumocócicos presentes en el suero se unen con cada uno de los serotipos de *S. pneumoniae* presentes en la superficie de la micromatriz lo que se traduce en una señal de fluorescencia proporcional a la intensidad de la interacción. A mayor cantidad de anticuerpos antineumocócicos presentes en el suero, la fluorescencia media emitida será proporcionalmente mayor (**Figura 1.9**)⁶³⁻⁶⁶.

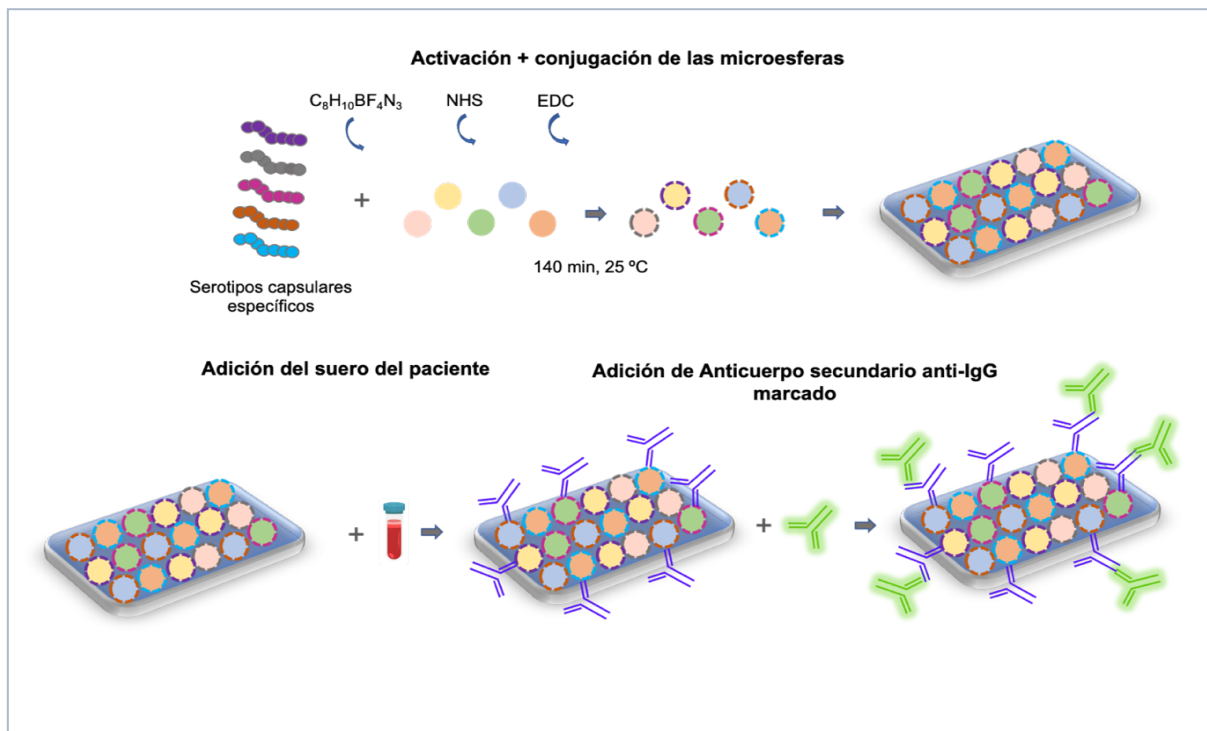


Figura 1.10. Detección de anticuerpos anti-CPS de *S. pneumoniae* mediante ensayos multiplexados basados en microesferas (micromatrices).

1.2.5 Ensayos de opsonofagocitosis (OPA)

Los ensayos de opsonofagocitosis (OPA) miden la capacidad que presentan los anticuerpos séricos de promover la fagocitosis y la muerte bacteriana y, por tanto, la funcionalidad real de estos anticuerpos antineumocócicos. Los ensayos clásicos implicaban agregar suero a una mezcla estandarizada de fagocitos, complemento y neumococos de un serotipo específico, y luego preparar diluciones seriadas para generar la curva de muerte bacteriana y realizar el conteo de las colonias de *S. pneumoniae* (Figura 1.11)⁶⁷.

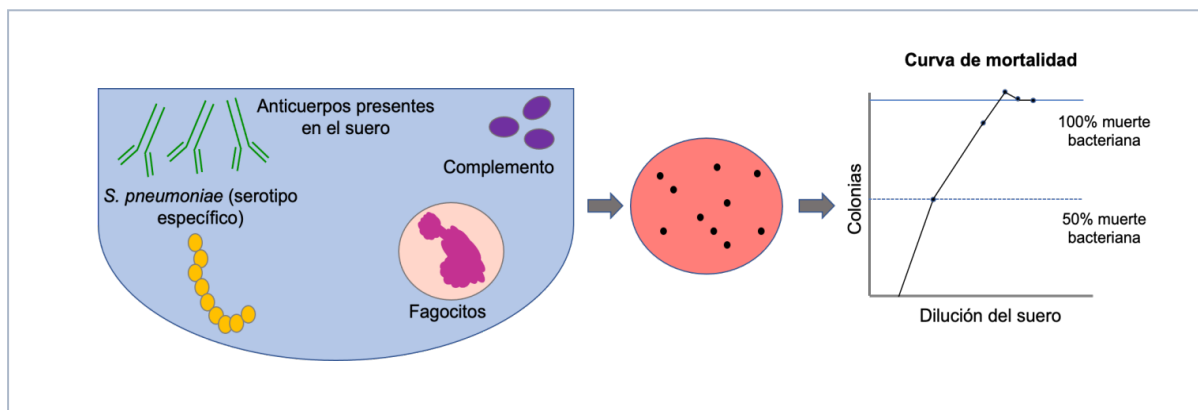


Figura 1.11. Ensayo clásico de OPA donde se mide la mortalidad de un serotipo específico de *S. pneumoniae*.

Cada ensayo mide de manera independiente la capacidad de eliminación de un único serotipo y requiere el recuento visual de las colonias, por lo que su realización es tediosa, y necesita de grandes cantidades de suero para evaluar la eficacia vacunal⁶⁸. Para superar las limitaciones que planteaba esta metodología más clásica se han desarrollado los ensayos de opsonofagocitosis multiplex (MOPA). La técnica MOPA emplea distintos serotipos de *S. pneumoniae* con resistencia antibiótica distinta permitiendo, mediante la adición de antibióticos en agar, seleccionar el crecimiento de serotipos específicos. Esto facilita medir la eliminación de varios serotipos en un solo ensayo de forma automatizada y reducir el tiempo de análisis (**Figura 1.12**)⁶⁹.

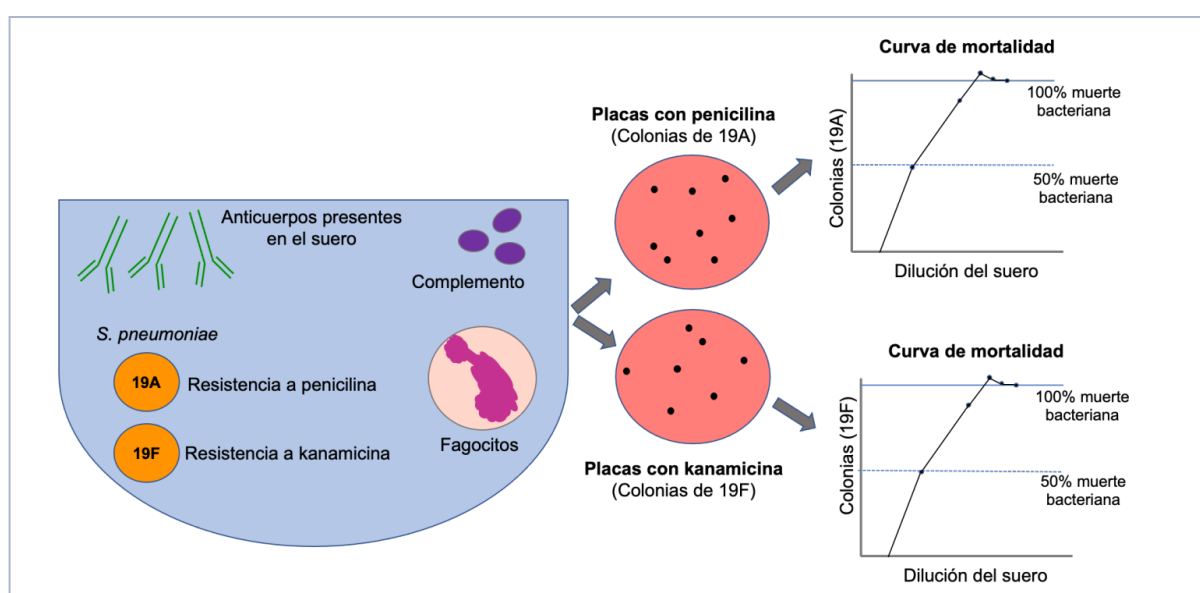


Figura 1.12. Ensayo de OPA múltiple (MOPA) de distintos serotipos de *S. pneumoniae*.

En algunas circunstancias, la presencia de títulos de anticuerpos IgG “adecuados” o normales en el suero no refleja una inmunidad protectora real tras la administración de la vacuna. Los estudios han demostrado que la población pediátrica que recibió la VNC7, que contiene polisacáridos del serotipo 19F, también produjeron anticuerpos IgG de reacción cruzada frente al serotipo 19A, pese a no estar incluido en la vacuna. Sin embargo, los datos del ensayo de OPA indicaron que estos anticuerpos no eran funcionales, ya que los “anticuerpos 19A” no opsonizaban ni eliminaban las bacterias en el 81% de los casos⁶⁹.

Por esta razón, los OPAs han llegado a ser herramientas indispensables para la evaluación de la respuesta inmune funcional y para la concesión de licencias de las vacunas antineumocócicas. Por consiguiente, se considera que el título OPA >1:8 proporciona protección frente a la ENI. No obstante, otros factores como la edad, el estado inmunológico o las enfermedades crónicas del individuo van a influir en la calidad de la respuesta inmunológica frente a la infección.

1.2.6 Diagnóstico de inmunodeficiencias mediante inmunoensayos

Las inmunodeficiencias primarias (IDP) son un grupo de enfermedades causadas por la alteración cuantitativa y/o funcional de distintos mecanismos implicados en la respuesta inmunológica. Esta condición se traduce en una elevada susceptibilidad y mayores recurrencias de manifestaciones clínicas, tales como dermatosis (eccemas, exantemas, telangiectasias), citopenias, diarrea crónica, abscesos u osteomielitis recurrentes, entre otras. El diagnóstico precoz es fundamental para disminuir la morbimortalidad de estos pacientes y mejorar su calidad de vida, así como para instaurar una terapia de sustitución con inmunoglobulinas en caso necesario⁷⁰.

La Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID) establece los siguientes criterios diagnósticos de IDP: i) disminución marcada (al menos de 2 SD por debajo de la media de edad) de IgG e IgA en suero; ii) ausencia de isohemaglutininas y/o escasa

respuesta a las vacunas y/o iii) exclusión de causas definidas de hipogammaglobulinemia⁷⁰.

Las guías actuales también recomiendan evaluar la respuesta a vacunas de polisacáridos, como las vacunas antineumocócicas, y más concretamente a la VNP23. Así pues, sugieren la medición cuantitativa de los niveles basales de anticuerpos antineumocócicos, seguida de la repetición de la prueba 4-8 semanas después de la administración de la VNP23^{71,72}.

No obstante, las concentraciones de anticuerpos que se corresponden con protección frente a la enfermedad neumocócica varían según la edad, el serotipo y el lugar de la infección. En adultos y de forma generalizada, $\geq 1,3$ $\mu\text{g/mL}$ se considera un nivel de anticuerpos “protector” para cada serotipo. En aquellos casos en los que se produzca un aumento de 2 veces en la concentración de anticuerpos en al menos el 70% de los serotipos probados, y siempre y cuando se supere el umbral protector, el paciente habrá obtenido una respuesta vacunal adecuada⁷⁰.

1.3 Resonancia de Plasmón Superficial (RPS) como nueva metodología para la medición de IgG anti-PnPs (polisacáridos de neumococo)

1.3.1 Principios de la metodología de RPS

La Resonancia de Plasmón Superficial (RPS) es una técnica experimental precisa y económica que permite evaluar interacciones moleculares entre moléculas de diferente tamaño y naturaleza en tiempo real. Se basa en los estudios de difracción después de irradiar un metal con luz policromática y en las fluctuaciones de densidad que se propagan en una interfaz metal-dieléctrico. Otto *et al.* y Kretschmann *et al.* (1968) describieron el fenómeno de excitación de los plasmones de superficie, lo que estableció las bases para su uso en la medición de interacciones biomoleculares⁷³. La RPS es ampliamente utilizada en biología y química para la detección y cuantificación de moléculas en solución, siendo una técnica potente y valiosa en la investigación científica⁷⁴.

La RPS se produce al medir la luz polarizada bajo condiciones de reflexión total interna en una superficie metálica conductora y una interfaz entre medios de diferente índice de refracción⁷⁴. La luz polarizada se dirige hacia la cara del cristal en contacto con el sensor, generando un campo eléctrico en forma de onda evanescente que es absorbida por los electrones libres presentes en la superficie de oro, generando oscilaciones de electrones cargados ("plasmones") que reducen la intensidad de la luz reflectada. El ángulo de resonancia depende del índice de refracción de la solución en contacto con la superficie de oro y varía según la cantidad de masa depositada, permitiendo estudiar la asociación entre biomoléculas⁷⁵.

Los biosensores ópticos de afinidad tienen cuatro componentes comunes: un detector para medir los cambios de índice de refracción, el tampón para introducir y eliminar el analito, la superficie del sensor donde se inmoviliza el ligando y el propio ligando. La respuesta se mide en unidades de resonancia (UR) y se relaciona con la masa molecular generada en la superficie del sensor tras la interacción analito-ligando^{75,76}. El sensograma muestra el progreso de la unión entre ambas biomoléculas (**Figura 1.13**).

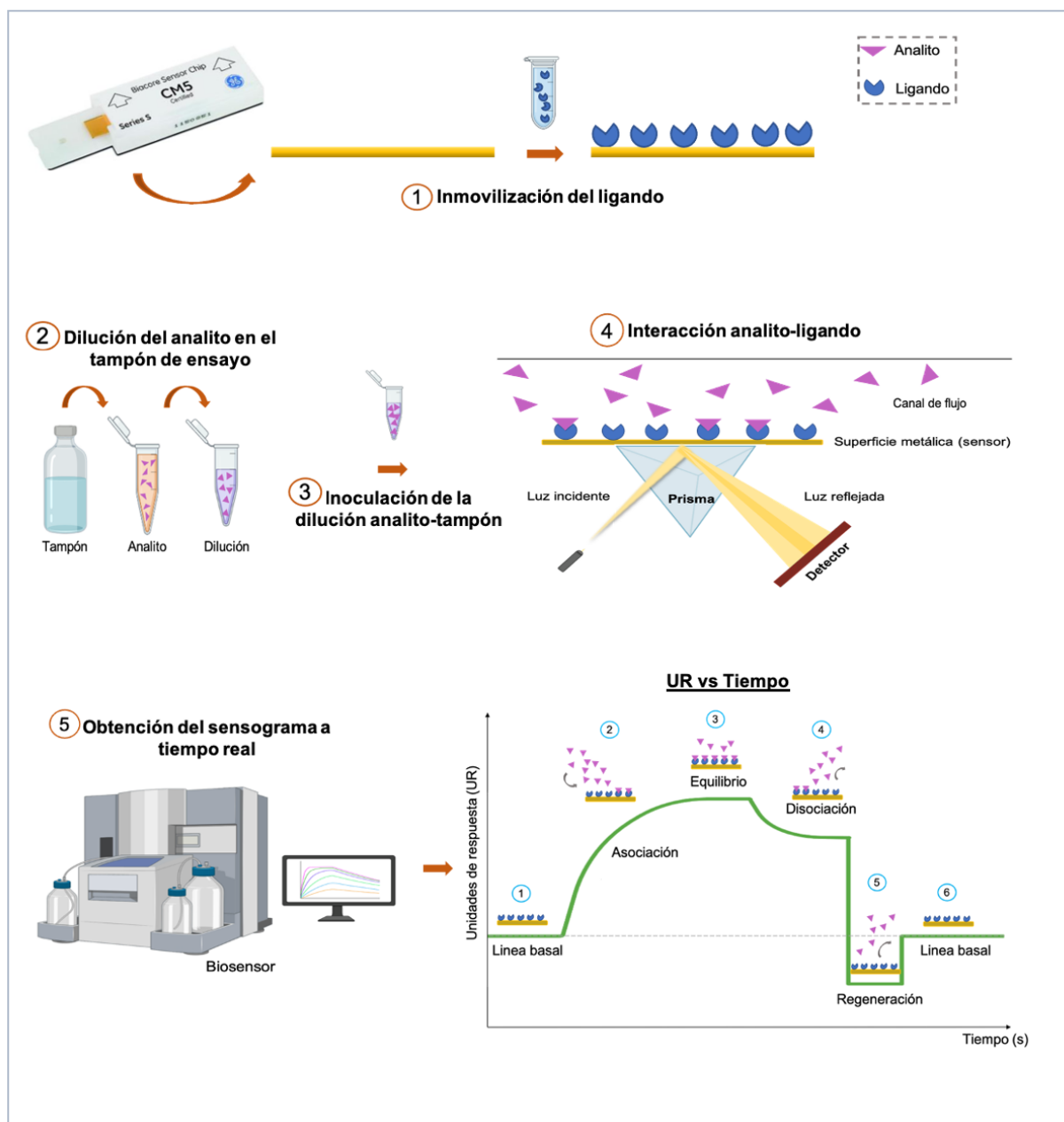


Figura 1.13. Esquematización del proceso de RPS. 1) Inmovilización del ligando en la superficie del sensor de oro mediante unión covalente, 2) Preparación de la muestra en función del tipo de experimento (dilución en tampón de ensayo), 3) Inyección de la muestra, 4) Medición de la interacción ligando-analito a medida que este último se une a la superficie del sensor, y 5) Obtención del sensograma (UR vs tiempo) a tiempo real.

1.3.2 Aplicaciones tecnológicas de la RPS en la práctica clínica

La RPS apareció a principios de los años 90 como una tecnología revolucionaria con un futuro prometedor en la práctica clínica. Esta novedosa metodología tiene la capacidad de detectar en tiempo real, con una sensibilidad elevada y sin necesidad de marcaje de biomoléculas, interacciones biomoleculares, lo que la convierte en una herramienta valiosa para la investigación y el diagnóstico clínico.

Uno de los primeros estudios que demostró el potencial del RPS en la práctica clínica fue realizado por Homola *et al.* (1999), donde se utilizó RPS para detectar la interacción entre la proteína de unión a la inmunoglobulina G humana (IgG) y la IgG humana⁷⁷. Desde entonces, se han llevado a cabo numerosos estudios en los que se ha utilizado RPS para la detección de biomoléculas en muestras clínicas:

- **Diagnóstico de enfermedades infecciosas** basándose en la detección y cuantificación de anticuerpos contra patógenos específicos en muestras de suero o plasma. Por ejemplo, para la detección de anticuerpos contra los virus Zika, SARS-Co-V-2 o de la hepatitis C y contra bacterias como *Legionella pneumophila* o *Helicobacter pylori* en muestras de suero humano⁷⁸⁻⁸⁰.
- **Evaluación de la eficacia de medicamentos** incluyendo la determinación de la dosis óptima o la cinética de unión entre fármaco-receptor. Por ejemplo, se ha utilizado RPS para evaluar la eficacia de los medicamentos antiinflamatorios en la unión a la proteína recombinante humana de la interleucina-6⁸¹.
- **Desarrollo de biosensores o dispositivos** que pueden detectar la presencia de biomoléculas específicas en una muestra biológica. Por ejemplo, para la detección de antígenos del virus SARS-CoV-2 en muestras de saliva⁸².
- **Detección de biomarcadores proteicos para el diagnóstico de múltiples enfermedades** como la proteína C reactiva (115 kDa), la cual es un importante

marcador presente en suero en determinados procesos inflamatorios (enfermedad cardiovascular, enfermedad inflamatoria intestinal)⁸³.

En ocasiones, la tecnología de RPS ha demostrado ser más ventajosa que los métodos tradicionales en términos de sensibilidad, reproducibilidad y tiempo de ensayo, como en el caso del biomarcador anexina 5, que está relacionado con la trombosis o el infarto de miocardio. Otra de las aplicaciones de esta novedosa metodología sería la monitorización de biomarcadores de enfermedades crónicas, como el cáncer, en fluidos biológicos (molécula de adhesión celular leucocitaria/CD166, transgelina-2)^{74,84}.

1.3.3 Utilización de RPS en el desarrollo y evaluación de vacunas

La creciente conciencia pública de la emergencia de otra pandemia que requiera un tratamiento rápido de millones de personas ha impulsado un renovado interés en las vacunas. Los plazos de desarrollo de nuevas vacunas pueden necesitar décadas de investigación y esfuerzos para encontrar una fórmula efectiva. Para enfrentar este desafío, la industria farmacéutica está adoptando nuevos métodos de desarrollo, así como principios de fabricación mejorados y más flexibles para aumentar la eficiencia de producción mientras se asegura la seguridad y eficacia de la vacuna.

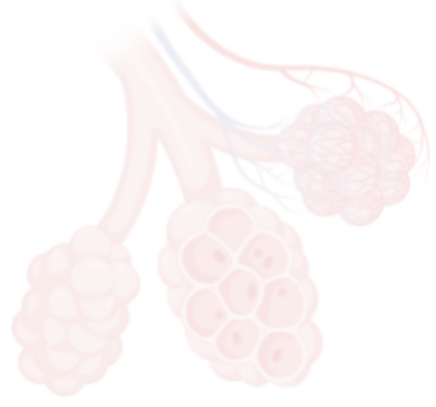
La demanda de técnicas de caracterización *in vitro* ha aumentado, especialmente en pruebas de rutina, en línea con la tendencia hacia la disminución de las pruebas en animales. En este contexto, la metodología basada en RPS puede contribuir a la comprensión detallada de las propiedades y características de un nuevo prototipo, así como de la interacción vacuna-anticuerpo para evaluar la eficacia de una vacuna ya comercializada^{73,74}.

Algunas de las aplicaciones de la RPS en este ámbito se resumen a continuación:

- **Diseño y caracterización de nuevas vacunas:** la RPS avanza en la investigación y diseño de vacunas al proporcionar datos de caracterización

precisos y exactos sobre la unión entre epítomos virales o bacterianos y los anticuerpos generados. Actualmente, esta metodología está empleándose en el diseño de futuras vacunas contra el VIH-1, el virus de Epstein-Barr, la malaria o el tétanos, entre otros⁸⁵⁻⁸⁷.

- **Eficacia del adyuvante vacunal** ya que permite medir la afinidad y la cinética de la unión de los adyuvantes a los epítomos vacunales y a los receptores en las células inmunitarias, facilitando la valoración de su efectividad en la potenciación de la respuesta inmunitaria y en la mejora de la eficacia de las vacunas. En un estudio publicado en 2015, se utilizó RPS para caracterizar la interacción entre un adyuvante de naturaleza fosfolipídica y un antígeno de la vacuna contra la malaria. Los resultados mostraron una mayor afinidad de unión del adyuvante a los componentes vacunales en comparación con otros adyuvantes comunes, lo que sugiere su potencial como adyuvante efectivo para esta vacuna^{88,90}.
- **Control de calidad en el desarrollo de vacunas:** la RPS es una herramienta analítica de alta calidad que permite medir la recuperación, el rendimiento y la pureza de bacterias y virus en el proceso de fabricación y liberación del lote de vacuna. De esta forma se puede seguir a tiempo real el proceso de producción de la vacuna y monitorizar la calidad del producto final⁹¹.
- **Medición de anticuerpos (respuesta vacunal):** la técnica de RPS permite medir la afinidad y la cinética de la unión entre anticuerpo y antígeno, lo que proporciona información detallada sobre la respuesta vacunal. Además, varios estudios muestran una correlación positiva entre los valores obtenidos por RPS y los obtenidos por ELISA, que es la técnica utilizada más ampliamente en la práctica clínica habitual. Publicaciones más recientes muestran que la sensibilidad de la RPS incluso llega a superar a la del ELISA estándar, lo que sugiere que esta metodología mejora la detección y medición de anticuerpos vacunales en suero^{91,92}.



2. Justificación y objetivos de las publicaciones

Artículo 1: Study of Paediatric Invasive Pneumococcal Disease in the 13-pneumococcal conjugated vaccine era

S. pneumoniae es una de las principales bacterias asociadas a mortalidad en menores de 2 años, con una incidencia de morbilidad variable de acuerdo con la demografía y exposición a factores protectores o de riesgo. Se estima que anualmente se producen entre 700.000 y 1.000.000 muertes en niños menores de 5 años, la gran mayoría en países en vías de desarrollo, donde la incidencia puede elevarse hasta los 100-500 casos anuales por 100.000 niños⁹³. Las elevadas cifras de morbilidad asociadas sobre todo a cuadros invasivos (ENI) a nivel global, han convertido a la infección neumocócica en un problema de salud pública de intervención prioritaria. Las vacunas han demostrado ser inmunogénicas, eficaces y seguras y constituyen la principal herramienta para prevenir la ENI por serotipos vacunales. Además, se ha observado el llamado “efecto indirecto o de inmunidad de grupo” con una disminución de la incidencia de ENI en niños y adultos no vacunados, al disminuir la colonización nasofaríngea en los inmunizados y, por tanto, la transmisión y circulación de serotipos vacunales^{94,95}.

No obstante, a pesar de la disminución significativa de la ENI debido especialmente a las vacunas conjugadas, se ha observado un incremento de casos a expensas del aumento de serotipos no vacunales lo que se conoce como remplazo vacunal. Al desaparecer los serotipos vacunales del nicho ecológico de la nasofaringe humana, el resto de los serotipos, adquieren una ventaja ecológica y, en consecuencia, aumenta su prevalencia como colonizantes, pudiendo producir enfermedad⁹⁵.

Este fenómeno tiene una génesis multifactorial en la que intervienen diferentes factores como: las fluctuaciones naturales de los serotipos, la introducción de nuevos antibióticos, la aparición de resistencias, la utilización de las vacunas o el incremento del número de personas pertenecientes a grupos de riesgo⁹⁶.

Toda esta problemática que gira en torno a la enfermedad neumocócica, incluida su naturaleza multifactorial, la convierten en un tema de total actualidad y hace imprescindible la implantación y el desarrollo de programas de vigilancia activa,

epidemiológica y microbiológica. En este contexto surge el interés de realizar un estudio sobre la ENI en la población pediátrica de la Comunidad Valenciana. Este trabajo recoge los casos de ENI notificados en un amplio periodo de tiempo con la finalidad de conocer la casuística, así como la repercusión que ha tenido la implantación de la VNC13 en el calendario de vacunación infantil.

Objetivos del estudio:

- Analizar la evolución de los serotipos de *S. pneumoniae* productores de ENI en población pediátrica en la Comunidad Valenciana entre 2012 y 2022.
- Determinar las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes (enfermedades crónicas de base, inmunodeficiencia, consumo de medicación inmunosupresora, etc.).
- Evaluar las tasas de cobertura vacunal antineumocócica en esta población y el impacto de las medidas de inmunización aplicadas en la población pediátrica.

Artículo 2: IgG antibody response to pneumococcal-conjugated vaccine (Prevenar®13) in children with immunodeficiency disorders

Las pacientes con inmunodeficiencias (ID) sufren con mayor frecuencia infecciones recurrentes y graves, así como cuadros clínicos poco comunes, lo que afecta negativamente a su salud y calidad de vida⁹⁷. La edad infantil constituye el grupo de población con mayor prevalencia de ID, especialmente de formas primarias graves, las cuales van acompañadas de elevadas tasas de morbilidad, principalmente en los casos de inmunodeficiencia común variable⁹⁸. No obstante, desde la implantación de tratamientos específicos, como la terapia sustitutiva con inmunoglobulinas o el trasplante de progenitores hematopoyéticos, la calidad de vida de estos pacientes ha mejorado sustancialmente, reduciéndose también la tasa de mortalidad hasta el 20%⁹⁹. Por tanto, los niños con sospecha de ID deben ser remitidos al inmunólogo para la realización de una evaluación diagnóstica y la instauración precoz de un tratamiento adecuado⁹⁹⁻¹⁰⁰.

En este sentido, el laboratorio es la principal fuente de información diagnóstica para el cribado inicial. La cuantificación de los títulos de anticuerpos frente a vacunas anteriormente administradas, las subclases de IgG, las poblaciones linfocitarias y los títulos de anticuerpos pre/postimmunización, junto con el contexto clínico del paciente ayudan a orientar el diagnóstico^{101,102}.

Monitorizar la respuesta a la vacuna antineumocócica es esencial, ya que el *S. pneumoniae* es uno de los microorganismos más comúnmente aislados en las infecciones bacterianas en pacientes con ID, especialmente en las deficiencias de anticuerpos primarios. En este contexto se basa la importancia de nuestro trabajo, en el que hemos evaluado la respuesta vacunal a la VNC13 (pauta completa) en niños con ID. Además, hemos recogido datos sobre niveles plasmáticos de otros componentes implicados en la respuesta inmune (poblaciones linfocitarias, inmunoglobulinas, etc.) para establecer asociaciones entre hiporrespuesta vacunal y concentración plasmática de los mismos.

Objetivos del estudio:

- Cuantificación del título de IgG anti-PnPs en suero de niños con ID tras recibir la pauta de vacunación completa con VNC13 (3 dosis).
- Determinar las características demográficas y clínicas de los pacientes (tipo de inmunodeficiencia, terapia inmunosupresora, terapia antiinfecciosa profiláctica, terapia de reemplazo con inmunoglobulinas, etc.).
- Cuantificación de los niveles plasmáticos de IgA, IgM, IgG y subclases de IgG; leucocitos y neutrófilos y poblaciones linfocitarias (CD3+T, CD4+T, CD45+T, CD8+T, CD19+B y CD56+/CD16+ NK).
- Comparación de los títulos de IgG anti-PnPs obtenidos tras la vacunación en cada uno de los grupos de estudio.

Artículo 3: A surface plasmon resonance-based approach for measuring response to pneumococcal vaccine

La RPS es una técnica experimental muy potente y precisa para evaluar, con gran sensibilidad y en tiempo real, interacciones moleculares entre ligandos de diferente tamaño y naturaleza sin necesidad de costes elevados^{104,105}. Estudios recientes indican que esta tecnología podría jugar un papel fundamental en el desarrollo de vacunas. La técnica de ELISA es la metodología utilizada actualmente para cuantificar las IgGs generadas por los pacientes tras la administración de las vacunas antineumocócicas en la mayoría de los hospitales españoles. Esta técnica se caracteriza por su sencillez, pero no debe obviarse que consta de varios pasos (mayor probabilidad de error) y que la duración media de su realización es de dos horas^{52,53}.

A partir de estas dos premisas surge la hipótesis de nuestro estudio: “La tecnología de RPS podría utilizarse para medir la interacción entre las vacunas antineumocócicas y las IgGs generadas en pacientes vacunados”. Mediante RPS, una vez que el proceso de inmovilización de la vacuna se ha llevado a cabo, el suero del paciente puede analizarse directamente sin necesidad de un tratamiento previo. Por otra parte, la RPS permitiría visualizar el proceso de unión de las IgGs y la vacuna prácticamente a tiempo real para obtener datos de respuesta vacunal en minutos.

Objetivos del estudio:

- Evaluar si, mediante la técnica de RPS, es posible medir la interacción entre vacunas antineumocócicas e IgGs.
- Diseño y validación de un protocolo de RPS que permita medir la interacción entre la VNC13 y las IgGs generadas en el suero de pacientes vacunados.
- Comparación de los resultados obtenidos mediante la técnica de ELISA y la RPS.



3. Metodología

3.1 Study of Paediatric Invasive Pneumococcal Disease in the 13-pneumococcal conjugated vaccine era

3.1.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio observacional, retrospectivo y multicéntrico de todos los episodios de ENI notificados a la Dirección General de Salud Pública de la CV en población pediátrica (0-13 años), entre enero de 2012 a septiembre de 2022. Se recogieron variables epidemiológicas, clínicas y terapéuticas de todos los casos de ENI utilizando la Red de Vigilancia Microbiológica de la CV (RedMIVA), el sistema de análisis epidemiológica (AVE) y las historias clínicas de los pacientes.

3.1.2 Definición de los casos

El caso confirmado de ENI se definió como un resultado positivo de cultivo, reacción de cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real y/o prueba de antígeno de *S. pneumoniae* en una localización normalmente estéril (sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido sinovial, etc.).

3.1.3 Serotipado de las cepas

Los reactivos utilizados para el serotipado de las cepas de *S. pneumoniae* fueron:

Antisueros (Denka Seiken, Tokyo, Japan)¹⁰⁶: contiene 8 tipos de sueros polivalentes y 39 tipos de sueros monovalentes frente el antígeno capsular K del *S. pneumoniae*. La reacción consiste en una aglutinación simple poniendo en contacto la colonia de *S. pneumoniae* pura con el antisuero. En el caso de que la reacción sea positiva se observa una reacción de aglutinación fácilmente detectable con luz sobre fondo negro.

Prueba de Quellung (Pneumotest; Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark)¹⁰⁷, considerada la prueba *gold standard*. La técnica consta de varios pasos;

primero en un portaobjetos de vidrio se coloca una gota del suero, a continuación, una gota de azul de metileno y por último se añade colonia pura de *S. pneumoniae*; seguidamente se mezcla todo obteniendo una mezcla homogénea y se coloca un cubreobjetos. La siguiente etapa consiste en observar al microscopio si se ha producido la reacción de Quellung, es decir, si el tamaño de la cápsula ha aumentado. Si se observa un aumento del tamaño de la cápsula o agrupaciones de neumococos de gran tamaño se considera que la reacción es positiva, lo que significa que el serotipo de la cepa de *S. pneumoniae* es el del suero utilizado.

Inicialmente se utilizaron los antisueros (Denka Seiken, Tokyo, Japan), ya que en la mayoría de los casos es suficiente para identificar el serotipo correcto. En las ocasiones, en las que los resultados obtenidos tras el uso de estos antisueros no fueron concluyentes se realizó la prueba de Quellung.

3.1.4 Cobertura vacunal y definición de fallo vacunal

El estado vacunal de los pacientes se obtuvo a partir del sistema de información vacunal (SIV) y de las historias clínicas. Se recogió información sobre el tipo de vacuna conjugada y número de dosis administradas. Para la realización del estudio únicamente fueron válidas aquellas dosis de vacuna recibidas al menos 15 días antes del inicio del cuadro clínico de ENI.

Los pacientes que recibieron el número correcto de dosis de VNC acorde con su edad fueron considerados como correctamente vacunados. Consecuentemente, la ENI producida por serotipos incluidos en las vacunas conjugadas en pacientes correctamente vacunados fue considerada como fallo vacunal¹⁰⁸.

3.1.5 Sujetos del estudio

Con la finalidad de evaluar la posible asociación entre las enfermedades crónicas de base y el riesgo de desarrollar un episodio de ENI, los pacientes fueron agrupados en 4 grupos:

- **Sanos:** pacientes sin ningún factor de riesgo asociado a un incremento del riesgo de ENI publicado con anterioridad¹⁰⁹.
- **Enfermedades respiratorias crónicas:** pacientes con cualquier tipo de enfermedad que comprometa el correcto funcionamiento de las vías respiratorias (asma, alergia crónica, otitis crónica de repetición, enfermedad pulmonar crónica, etc.).
- **Inmunodeficiencias:** pacientes con diagnóstico confirmado de inmunodeficiencia primaria o secundaria¹¹⁰.
- **Enfermedades neurológicas:** pacientes con enfermedades crónicas del sistema nervioso, incluidas aquellas que son resultado del crecimiento anormal del tejido blando, huesos de la cara y cabeza (quistes cerebrales, anomalías craneofaciales, epilepsia, etc.).

3.1.6 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados usando el programa *R Project for Statistical Computing* versión 4.3.2 y las pruebas estadísticas utilizadas fueron el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba exacta de Fisher. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

3.2 IgG antibody response to pneumococcal-conjugated vaccine (Prevenar®13) in children with immunodeficiency disorders

3.2.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio observacional y retrospectivo en el HUP La Fe, en el periodo comprendido entre noviembre de 2018 y mayo de 2022. El estudio se llevó a cabo en el Servicio de Microbiología en colaboración con el Servicio de Inmunología Pediátrica.

Los criterios de inclusión fueron: (a) niños menores de 12 años atendidos en el Servicio de Pediatría del HUP La Fe; (b) diagnóstico confirmado o sospecha de inmunodeficiencia (antecedentes familiares, síndrome no filiado, infecciones bacterianas recurrentes o atípicas, etc.); (c) pauta vacunal neumocócica completa (3 dosis) con VNC13.

Se excluyeron todos los pacientes que cumplían alguno de los siguientes criterios: (a) pautas vacunales diferentes (VNC7, VNC10, VNC20, VPN23) o número de dosis de VNC13 distintos; (b) pacientes con antecedentes de infección invasiva/no-invasiva por *S. pneumoniae* recogidos en los historiales clínicos del HUP La Fe.

3.2.2 Variables recogidas

Se incluyeron variables demográficas, clínicas (ID, tratamiento inmunosupresor, etc.) y analíticas: a) título de anti-PnPs IgG tras recibir 3 dosis de VNC13; b) niveles de IgA, IgM, IgG, y subclases de IgG en suero; c) niveles de leucocitos y neutrófilos; y d) poblaciones linfocitarias (CD3+T, CD4+T, CD45+T, CD8+T, CD19+B y CD56+/CD16+ NK).

3.2.3 Sujetos del estudio

Los pacientes fueron agrupados en 4 grupos de acuerdo con el síndrome de inmunodeficiencia de cada uno de ellos, siguiendo las guías de la *European Society for Immunodeficiencies* (ESID):

- **Inmunodeficiencia primaria (IP):** pacientes con diagnóstico confirmado de IP.
- **Inmunodeficiencia secundaria (IS):** pacientes con diagnóstico confirmado de IS (cáncer, disfunción esplénica, tratamiento inmunosupresor, etc.).
- **Inmunodeficiencia mixta:** pacientes con diagnóstico de IP con tratamiento inmunosupresor crónico.
- **Posible inmunodeficiencia:** pacientes bajo especial control por sospecha elevada de un síndrome con afectación inmunológica no filiado.

3.2.4 Técnicas utilizadas para la medición de variables analíticas

- **ELISA:** las muestras de suero se recogieron al menos a las 4-6 semanas post-vacunación (3 dosis de VNC13). La cuantificación de los niveles de anti-PnPs IgG fue realizada mediante el kit comercial VaccZyme™ Anti-PCP IgG Enzyme Immunoassay Kit (The Binding Site Group, Birmingham, UK), siguiendo las instrucciones del fabricante. En función del título de anticuerpos los pacientes fueron clasificados en: a) respondedores (anti-PnPs IgG >50 mg/L); y b) no respondedores (anti-PnPs IgG ≤50 mg/L).
- **Inmunoturbidimetría:** para la cuantificación de niveles plasmáticos de IgA, IgM e IgG (Abbot® Alinity, Illinois, EEUU).
- **Nefelometría:** para la medición de las subclases de IgG (Siemens BNII® human IgGSc assay, Mississauga, Canadá).
- **Citometría de flujo:** para la determinación de las poblaciones linfocitarias (CD3+T, CD4+T, CD45+T, CD8+T, CD19+B y CD56+/CD16+ NK).

3.2.5 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando los programas *R Project for Statistical Computing* versión 4.3.2 y SPSS 21.0.152 *Statistical software* (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). El test *t* y el ANOVA fueron las pruebas paramétricas seleccionadas para el análisis; mientras que la prueba U de Mann-Whitney y el test de Kruskal-Wallis lo fueron para las no paramétricas. La prueba exacta de Fisher fue utilizada para comparar variables categóricas. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

3.3 A surface plasmon resonance based approach for measuring response to pneumococcal vaccine

3.3.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio comparativo entre la técnica *gold standard* para la cuantificación de anti-PnPs IgG en suero (ELISA) y la novedosa metodología de RPS. Para la elaboración del mismo colaboraron los servicios de Medicina Preventiva y Microbiología del HUP La Fe junto con la Unidad de Descubrimiento de Fármacos (Instituto de Investigación Sanitaria La Fe). Los pacientes con las siguientes condiciones fueron excluidos: a) menores de 18 años; b) infección neumocócica pasada conocida; y c) antecedentes de haber recibido alguna dosis de VNC13 en los últimos 5 años.

3.3.2 ELISA para la cuantificación de anti-PnPs IgG

Las muestras de suero se recogieron, al menos a las 4-6 semanas post-vacunación (1 dosis de VNC13), en el Servicio de Medicina Preventiva del HUP La Fe. La cuantificación de los niveles de anti-PnPs IgG fue realizada mediante el kit comercial VaccZyme™ Anti-PCP IgG Enzyme Immunoassay Kit (The Binding Site Group, Birmingham, UK), siguiendo las instrucciones del fabricante (**Figura 3.1A-B**). En función del título de anticuerpos los pacientes fueron clasificados en: a) no respondedores (anti-PnPs IgG ≤ 50 mg/L); b) respondedores (anti-PnPs IgG = 51-270 mg/L); y c) súper o altamente respondedores (anti-PnPs IgG > 270 mg/L).

3.3.3 Purificación de las IgGs totales

Previa al experimento de RPS, se incorporó esta etapa para asegurar que la señal (UR) obtenida no se debía a interacciones inespecíficas entre la VNC13 inmovilizada en la superficie del chip y otras proteínas presentes en el suero, como la albúmina.

Las IgGs totales fueron purificadas a partir del suero de los pacientes mediante cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (*FPLC*, por sus siglas en inglés) en el ÄKTA pure chromatography system (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) con la utilización de columnas quelantes de alto rendimiento (HiTrap HP) con Proteína G Sepharose (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

El proceso de purificación constaba de varios pasos, así como de una etapa post-purificación para asegurar la calidad del mismo (**Figura 3.1C**). El suero de los pacientes diluido (1:35, v/v, en 20 mM NaH₂ PO₄ buffer, pH = 7) fue aplicado sobre la columna HiTrap Protein G HP a 1 ml/min, y fue eluido posteriormente usando un buffer de glicina (100 mM glicina, pH= 2,7; 1ml/min). Las fracciones de elución que contenían las IgGs (detectadas mediante SDS-PAGE) fueron dializadas frente a un buffer de HEPES (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH = 7.4) durante 24 horas a 4°C.

Finalmente, se concentraron utilizando filtros de centrifugación de 10 KDa de Amicon Ultra 10 K (Millipore, Bedford, USA) a 5000 rpm hasta alcanzar una concentración entre 5-7 mg/mL. La medición de la concentración exacta de IgG alcanzada se realizó en el NanoDrop One (Thermo Fisher, Madison, USA), utilizando como referencia un coeficiente de extinción molar (ϵ) de 13,7 mol⁻¹cm⁻¹.

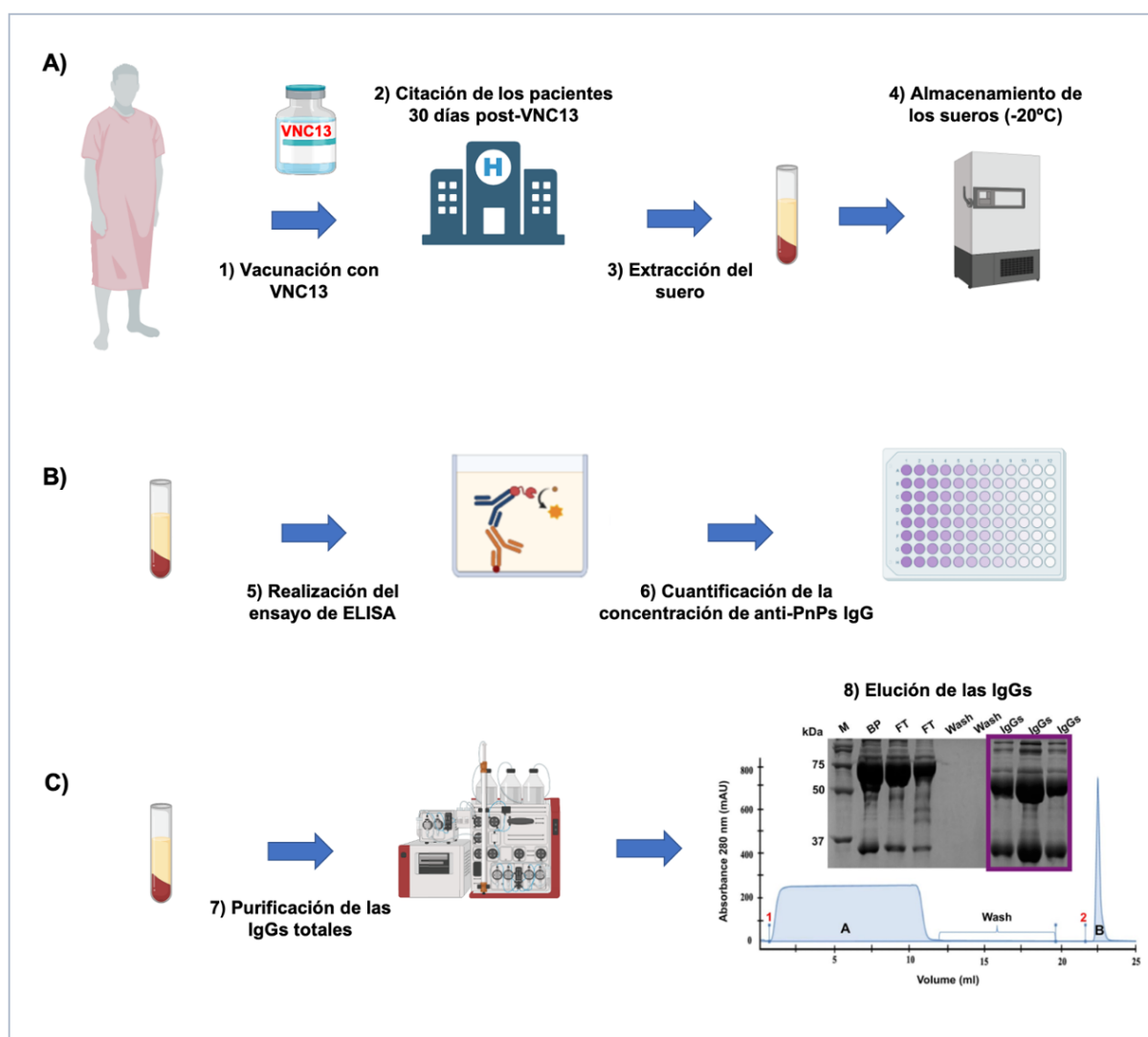


Figura 3.1. Esquema de las etapas previas a la realización del experimento de RPS. **A)** Vacunación y posterior extracción del suero de los pacientes (30 días post-VNC13), los cuales fueron almacenados (-20°C) hasta su utilización posterior; **B)** Realización del ensayo de ELISA; **C)** Purificación de las IgGs totales del suero de los pacientes para evitar las uniones inespecíficas entre proteínas presentes en el suero y la VNC13 inmovilizada en la superficie del chip.

3.3.4 Cuantificación del título de anti-PnPs IgGs por RPS

- **Preparación de la VNC13.** La VNC13 fue deshidratada utilizando un *Microcon centrifugal filter unit YM-50 membrane Amicon* (10.800 rpm, 4 °C) y se recuperó en 320 µl de un tampón de acetato de sodio 10 mM (pH 4,5), para obtener una concentración final de 100 µg/ml del toxoide diftérico (CRM197) contenido en la propia vacuna.
- **Inmovilización de la VNC13 en la superficie del chip CM5.** Las aminos libres de la CRM197 (100 µg/ml) contenida en la VNC13 fueron inmovilizadas por unión covalente a los grupos carboximetilo de la superficie del chip CM5. El proceso constaba de varias etapas: (i) activación de los grupos carboximetilo con 70 µl de una solución de NHS/EDC (10 µl/min), (ii) inyección de 50 µl de la VNC13 para promover la reacción de inmovilización (10 µl/min), y (iii) bloqueo de los grupos carboximetil activados que quedaron libres con 70 µl de etanolamida (10 µl/min) (**Figura 3.2**).
- **Ensayo de interacción entre VNC13 y anti-PnPs IgGs presentes en el suero.** Previo al ensayo de unión, se realizaron diluciones seriadas de las muestras de IgG purificadas en un running buffer de HBS-EP (10 mM HEPES, 500 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.1% surfactante P20, pH=7,4). Se inyectaron un total de 10 µl de cada dilución (tiempo de contacto de 60 s; 10 µl/min) y la disociación se llevó a cabo durante 200 s. La regeneración entre muestras se realizó inyectando 5 µl de una solución de regeneración (50 mM NaOH y 1 M NaCl) durante 30 s (10 µl/min). Para todas las diluciones se inyectó por triplicado cada una de las muestras (**Figura 3.2**).

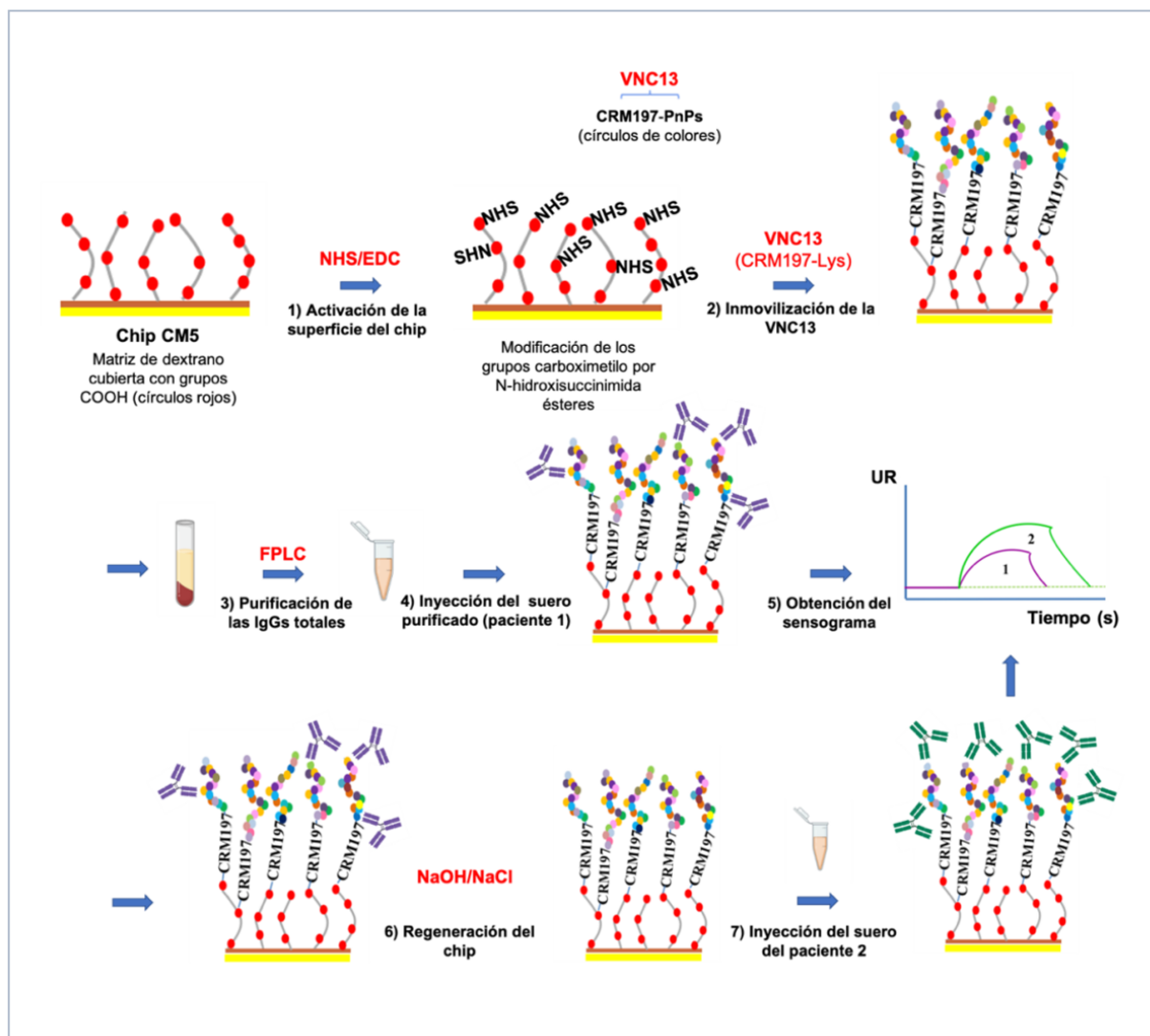
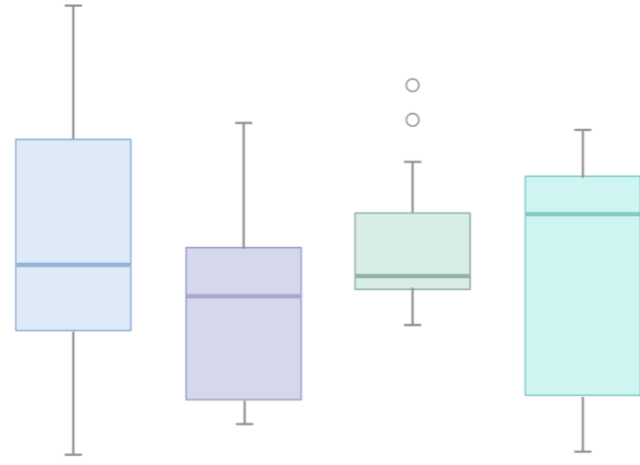


Figura 3.2. Esquema del proceso de cuantificación de anti-PnPs IgGs en el suero de los pacientes mediante RPS. **1)** Activación de la superficie del chip de CM5, transformando los grupos de carboximetilo (COOH, círculos rojos) en N-hidroxisuccinimida ésteres, tras la inyección de EDC/NHS; **2)** Inmovilización de la VNC13 en la superficie del chip, mediante unión covalente de los N-hidroxisuccinimida ésteres con los residuos de lisina presentes en la proteína CRM197 (VNC13). Los 13 serotipos (PnPs) contenidos en la vacuna aparecen representados con círculos de colores; **3)** Purificación de las IgG totales a partir del suero de los pacientes; **4)** Inyección del suero purificado de un paciente respondedor débil; **5)** Obtención del sensograma con una señal de UR de poca intensidad (color morado); **6)** Regeneración del chip tras la inyección de NaOH/NaCl; **7)** Inyección del suero purificado de un paciente altamente respondedor y obtención de una señal de UR de elevada intensidad (color verde).

- **Análisis de los datos.** Los resultados experimentales se analizaron utilizando el programa informático *Biacore X100 Evaluation Software* 2.0.1 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). La interacción entre los anti-PnPs IgGs presentes en los sueros inyectados y la VNC13 inmovilizada en la superficie del chip se definió como la unión de respuesta (UR). La respuesta (UR) correspondiente al canal 2 se calculó restando la señal en UR detectada en el canal de referencia (canal 1) y fue caracterizada usando los métodos de evaluación predefinidos por GE Healthcare (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

3.3.5 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando los programas *R Project for Statistical Computing* versión 4.3.2. Para evaluar la correlación entre las concentraciones de anti-PnPs IgGs (ELISA) y la respuesta de unión (RPS) se utilizó el rango de correlación de Spearman's. El test t y el ANOVA fueron utilizados para establecer diferencias respecto al resultado de RPS obtenido entre los 3 grupos del estudio. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.



4. Resultados

Artículo 1: Study of Paediatric Invasive Pneumococcal Disease in the 13-pneumococcal conjugated vaccine era

- Durante el periodo de estudio se notificaron un total de 379 casos de ENI en 377 pacientes, de ellos el 54,11 % eran varones y el 81,17% eran menores de 5 años.
- Tras la introducción de la VNC13 (2015) en el calendario de vacunación infantil, disminuyeron significativamente los cuadros de ENI producidos por serotipos incluidos en esta vacuna ($p=0,0002$), excepto para el serotipo 3.
- La neumonía fue la forma clínica más común entre los pacientes y la mitad de ellos padecía alguna enfermedad crónica de base (50,40%).
- Respecto a la evolución clínica y la letalidad, los pacientes pertenecientes al grupo con enfermedades neurológicas de base presentaron la tasa de secuelas y mortalidad más elevada ($p=0,57$ y $0,024$, respectivamente).
- Los fallos vacunales se observaron especialmente en pacientes con afecciones médicas subyacentes (63%) y se relacionaron con los serotipos 3 y 19A.
- Finalmente, se evidenció una relación entre el diagnóstico de inmunodeficiencia en los pacientes y la aparición de episodios recurrentes de ENI.

Artículo 2: IgG antibody response to pneumococcal-conjugated vaccine (Prevenar ®13) in children with immunodeficiency disorders

- Durante el periodo de estudio se incluyeron un total de 85 pacientes, de los cuales el 65% fueron varones, con una edad media de 3 años (1,50-5,33).
- La inmunodeficiencia primaria fue diagnosticada en más de la mitad de los pacientes (45), seguida por el grupo con inmunodeficiencia posible (19), el de inmunodeficiencia secundaria (15), y finalmente por el de inmunodeficiencia mixta (8).

- En el 54% de los pacientes se observó una producción deficiente de anti-PnPs IgG con títulos ≤ 50 mg/l, especialmente en los pacientes con inmunodeficiencia mixta.
- En los pacientes VNC13-respondedores la media de los niveles plasmáticos de las poblaciones leucocitarias fue superior a la de los pacientes que no respondieron a la vacuna, con diferencias estadísticamente significativas en los linfocitos T CD4+/CD8+ ($p = 0.372$, $p = 0.014$) y CD56+/CD16+ NK ($p = 0.016$).
- Los pacientes con antecedentes de trasplante de médula ósea fueron los que peor respondieron a la VNC13.

Artículo 3: A surface plasmon resonance based approach for measuring response to pneumococcal vaccine

- Durante el periodo de estudio se incluyeron un total de 24 pacientes, los cuales fueron clasificados en 3 grupos en función del título de anti-PnPs IgG obtenido tras la administración de la VNC13. Ocho fueron altamente respondedores (anti-PnPs IgG >270 mg/L); 10 fueron respondedores (anti-PnPs IgG = 51-270 mg/L); y 6 fueron no respondedores (anti-PnPs IgG ≤ 50 mg/L).
- La cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad en el ÄKTA pure chromatography system con la utilización de columnas quelantes de alto rendimiento con Proteína G Sepharose purificó adecuadamente las IgGs totales del suero de los pacientes.
- La Inmovilización de la VNC13 en la superficie del chip, mediante unión covalente de los N-hidroxisuccinimida ésteres con los residuos de lisina presentes en la proteína CRM197 (VNC13) resultó exitosa.
- Se observó una correlación robusta entre la señal en UR obtenida por RPS y la concentración de los niveles séricos de anti-PnPs IgG medidos mediante ELISA, especialmente para la dilución 1:16 (Spearman's $\rho = 0.84$, $p = 0.001$).
- Además, mediante RPS fue posible clasificar correctamente a los pacientes en función del perfil de respuesta vacunal (según ELISA).



5. Trabajos publicados



Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology & Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobio

Original Article

Study of pediatric invasive pneumococcal disease in the 13-pneumococcal conjugated vaccine era

Marta Garrido-Jareño ^{a,b,*}, Francisco Javier Roig-Sena ^c, Elvira Pérez-Pérez ^c, Ana Gil-Brusola ^{a,b}, José Luis López-Hontangas ^{a,b}, Eulogio Valentín-Gómez ^{b,d}, Antonio Pineda-Lucena ^e, Javier Pemán ^{a,b}

^a Microbiology Department, University and Polytechnic Hospital La Fe Valencia, Spain

^b Severe Infection Research Group, Health Research Institute Hospital La Fe Valencia, Spain

^c General Directorate of Public Health, Council of Universal Healthcare and Public Health, Regional Government of Valencia Valencia, Spain

^d GMCA Research Unit, Department of Microbiology and Ecology, University of Valencia Valencia, Spain

^e Molecular Therapeutics Program, Center for Applied Medical Research, University of Navarra Pamplona, Spain

ARTICLE INFO

Key words:

PCV13

Invasive pneumococcal disease

children

risk factors

vaccine failures

ABSTRACT

Background: Invasive pneumococcal disease (IPD) remains a significant concern among children under 5, despite vaccination efforts. This study assessed IPD prevalence and associated risks in pediatric population.

Methods: An observational, retrospective, multicenter study in Comunidad Valenciana, Spain, of IPD cases in children under 13 from January 2012 to September 2022. Data from the CV Microbiology Surveillance Network (RedMIVA) and medical records were reviewed.

Results: A total of 379 IPD cases in 377 patients were analyzed, predominantly males (54.11 %) under 5 (81.17 %). PCV13 vaccination notably reduced PCV13-serotypes IPD ($p=0.0002$), except serotype 3. Pneumonia was common, with half having underlying conditions (50.40 %). Worse outcomes occurred in patients with neurological disorders (ANOVA, $p=0.57$). Vaccine failures often involved underlying conditions (63 %) and serotypes 3 and 19A. Immunodeficiencies may relate to recurrent IPD, but evidence is limited.

Conclusion: Despite vaccination, IPD still impacts children, influenced by immunological status, affecting severity and mortality.

1. Introduction

Streptococcus pneumoniae is a human-specific pathogen that colonizes the nasopharynx and is transmitted primarily via aerosol. Infection occurs when the bacteria spread from the nasopharynx to other body sites, such as the lungs, blood, or brain [1,2]. The development and severity of pneumococcal disease are influenced by host factors, including age, immune status, and underlying conditions, as well as the bacterium's ability to adhere to the respiratory epithelium, evade the immune system, and invade sterile body fluids, which are dependent on serotype-specific properties [3]. These bacteria can cause various illnesses, with severity depending on the infection site. Invasive pneumococcal disease (IPD) involves serious infections where the bacteria

invade sterile areas, leading to conditions such as bacteremia, pneumonia, sepsis, meningitis, and osteomyelitis [4].

Pneumococcal infections result in 1.6 million deaths annually, particularly affecting children, the elderly, and those with underlying conditions, making it the deadliest vaccine-preventable disease [5]. Specifically, lower respiratory tract infections are the leading cause of death in developing countries, causing 10.6 million deaths in children under 5 each year, with the highest incidence in South Asia and West and Central Africa (2,500 and 1,620 cases per 100,000 children respectively) [6].

In the USA, a 20-year study (1999-2019) found a 5.5 % fatality rate following an IPD episode in children under 18 [7]. In our country, data from the Carlos III Health Institute show a higher prevalence of IPD in

Abbreviations: CRD, Chronic respiratory disease; HC, Healthy children; ID, Immunodeficiency disorder; IPD, Invasive pneumococcal disease; ND, Neurological disease; PCV, pneumococcal conjugated vaccine; PPSV, pneumococcal polysaccharide vaccine.

* Corresponding author at: Microbiology Department, University and Polytechnic Hospital La Fe, Avenida Fernando Abril Martorell, 106 Torre A 3ª planta, 46026 Valencia, Spain..

E-mail address: ma.garridoj@gmail.com (M. Garrido-Jareño).

<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2024.116532>

Received 23 March 2024; Received in revised form 5 September 2024; Accepted 5 September 2024

Available online 7 September 2024

0732-8893/© 2024 Elsevier Inc. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

adults over 85 years (39.6 %) and children under 1 year (20.5 %) compared to the general population [8]. The case-fatality rate is also higher in adults than in children, particularly for meningitis (22 % vs. 8 %) [5,9].

Over 100 serotypes of *S. pneumoniae* have been identified, with certain serotypes more frequently linked to IPD depending on factors like geographic location and vaccine coverage. Pneumococcal vaccines are the most effective strategy for lowering IPD incidence [10,11].

Spain uses two main types of pneumococcal vaccines: pneumococcal conjugate vaccines (PCV7, PCV10, PCV13) and the pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23). PCV7, approved by the European Medicines Agency (EMA) in 2001 for infants under 2, was proven to be safe and effective in preventing pneumonia and invasive disease [12]. The first countries that adopted routine immunization observed a significant decrease in pneumonia and IPD cases after introduction of PCV7 vaccination [13,14]. Higher-valency PCVs (PCV10, PCV13) were later introduced to respond to the increasing burden of disease caused by non-vaccine serotypes. PCV13 was introduced in Spain in 2010 and has been included in the Comunidad Valenciana's (CV) childhood immunization schedule since May 2015, funded by the public health system. Furthermore, IPD has been a mandatory reportable disease in the CV since 2007. These relatively recent healthcare measures have achieved PCV13 vaccination rates in Spain of approximately 65 % and reduced the incidence of IPD caused by all vaccine serotypes, except for serotype 3, in children under 5 years of age [15].

Immunological status significantly affects the response to PCV13, as children with immunodeficiency disorders achieve lower pneumococcal antibody titers than healthy children [16]. Consequently, even with full vaccination, patients with underlying conditions such as chronic inflammatory or respiratory diseases, HIV, cancer, or those on immunosuppressive therapy may have insufficient protection [17,18]. This immunization hypo-responsiveness phenomenon increases the risk of severe IPD and higher case-fatality rates in these patients [19].

We conducted an 11-year retrospective study (January 2012 to September 2022) in children under 13 years in the Comunidad Valenciana to evaluate the epidemiological, clinical, and microbiological characteristics of IPD cases. The study assessed age-specific, serotype-specific, and patient group-specific trends, as well as pneumococcal vaccine coverage and the impact of immunization measures in the pediatric population.

2. Methods

2.1. Study design and participants

We carried out this observational, retrospective, multicenter study of all IPD episodes in children under 13 years of age reported to the Public Health Department of CV (Spain) between January 2012 and September 2022. Epidemiological, clinical, and therapeutic data from the IPD cases were obtained from the CV Microbiology Surveillance Network (Red-MIVA), epidemiological surveillance analysis system (AVE), and patient medical records.

2.2. Case definition

A confirmed case of IPD was defined as having a positive culture, real-time polymerase chain reaction (PCR), and/or *S. pneumoniae* antigen test from a normally sterile site (e.g., blood, cerebrospinal fluid (CSF), and pleural, joint, or peritoneal fluid).

3. Definition of IPD syndrome

Occult bacteremia: presence of *S. pneumoniae* in the blood of a well-appearing febrile child without an identifiable focus of infection [20].

Sepsis: presence of *S. pneumoniae* in the blood of a child with fever and with identifiable focus of infection. Usually accompanied by an

abnormal leukocyte count and at least one additional sign, such as tachycardia, bradycardia, or tachypnea [21].

Meningitis: presence of *S. pneumoniae* in the cerebral spinal fluid. Regardless of whether specific signs of meningitis are present [21].

Pneumonia: presence of *S. pneumoniae* in the lungs, leading to pulmonary involvement [21].

3.1. Serotyping

Serotyping of *S. pneumoniae* isolates was achieved using the slide agglutination test (Denka Seiken, Tokyo, Japan). The Quellung test was used to confirm serotyping of doubtful strains (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) [22,23]. Some serotypes (15A/F, 15B/C, and 24B/F) were serotyped independently or grouped depending on laboratory reagent availability.

3.2. Vaccination status and definition of vaccine failure

The vaccination status of each patient was obtained from the vaccine information system (SIV) and patient medical records. We collected information on the date and doses of conjugated pneumococcal vaccines administered in each case. We considered a dose protective if it had been administered at least 15 days before the onset of the IPD episode. Patients were considered age-appropriately vaccinated when they had received all doses of conjugated pneumococcal vaccines corresponding to their age according to the Spanish Pediatric Association recommendations, even when the vaccination schedule was incomplete [24]. Patients with fewer doses than recommended at the onset of the IPD episode were considered as age-incompletely vaccinated.

We adopted the PCV13 vaccination failure definition described by Heininger *et al.* [25]. This definition refers to the occurrence of an IPD episode caused by a specific vaccine-preventable serotype in a fully vaccinated patient considering the incubation period for invasive disease (1 day to 2 weeks) and the normal delay for obtaining immunological protection as a result of immunization (2 to 3 weeks) [26]. In this sense, we considered that a 2-month interval between complete vaccination schedule and the invasive disease diagnosis would be optimal to ensure the vaccine failure.

3.3. Patient grouping

To evaluate the possibility of immunization hypo-responsiveness phenomenon, the patients were assigned to four groups according to their clinical features: 1) healthy children (HC), patients without any previously published risk factor associated with IPD [17]; 2) chronic respiratory disease (CRD), patients with chronic pulmonary disease, such as asthma, chronic allergy, chronic ear infection, or recurrent bronchospasm; 3) immunodeficiency disorder (ID), patients with a confirmed primary or secondary immunodeficiency diagnosis following the European Society for Immunodeficiencies (ESID) guidelines [27]; or 4) neurological disease (ND), patients with epilepsy, congenital central nervous system malformation, or cerebral palsy.

3.4. Statistical analysis

Results were analyzed using the "ClickR" package (v0.4.3.2). Fisher's exact test and ANOVA were used to assess the significance of differences between the four patient groups. A *p* value < 0.05 was considered significant.

4. Results

A total of 379 cases of IPD in 377 patients were reported during the study period (January 2012 - September 2022) with an incidence of 11.95 cases per 10⁵ inhabitants. Most of the patients were male (204/377, 54.11 %) and under 5 years of age (306/377, 81.17 %) with rate of

15.40 cases per 10⁵ inhabitants in this group. A similar annual number of IPD cases (34 ± 11.20) was observed throughout the study period, with 2017 and 2018 being the years with the highest number of declared episodes (53 and 54, respectively). The introduction of PCV13 into routine immunization programs in May 2015 resulted in significant reductions in IPD due to PCV13 serotypes, with a notable difference between the pre- and post-vaccination period (Fisher's exact test, $p = 0.0002$). The 3 years pre-PCV13 had the highest rates of IPD by PCV13 serotypes, reaching a peak in 2013 (36 %). The opposite occurred during the post-vaccination period, during which levels as low as 5 % were observed, with the lowest recorded in 2021 (3 %), as shown in Fig. 1.

4.1. Study population

Demographics, clinical characteristics, and classifications of patients included in the study are summarized in Table 1. Roughly half the patients presented with underlying medical conditions (190/377, 50.40 %), which were grouped into CRD (116/377, 30.76 %), ID (53/377, 14.06 %), and ND (21/377, 5.58 %). The remaining patients (187/377, 49.60 %) were included in the HC group. The mean patient age was higher in the ID group (ANOVA, $p = 0.067$). The male/female ratio was >1 in all groups except ND, which comprised a higher percentage of females, but the difference was not significant (Fisher's exact test, $p = 0.67$).

The underlying pathologies, demographic characteristics, and pneumococcal vaccine coverage of patients included in the CRD, ID, and ND groups are described in detail in Supplementary Tables 1-3, respectively.

Pneumonia was the most common clinical syndrome of IPD in the HC (79/187, 42.25 %) and CRD (47/116, 40.52 %) groups, followed by sepsis in ID (19/55, 34.55 %) and meningitis in ND (7/21, 33.33 %). Twenty-seven patients (7.17 %) had sequelae after pneumococcal infection: hypoacusis ($n=6$), epilepsy ($n=5$), coagulation disorders ($n=3$), pleural effusion ($n=2$) and one each of the following: hemolytic uremic syndrome, peripheral facial paralysis, bronchopleural fistula, empyema, ruptured eardrum, hepatic failure, functional asplenia, cerebellar infarct, acute glomerulonephritis, pancytopenia and bone lesions, and convulsive seizure. The ND group had the highest rate of sequelae (3/21, 14.28 %), but the difference was not significant (Fisher's exact test, $p = 0.57$). The ID and ND groups had the lowest rates of previous traumatic brain injury (TBI).

Two patients with ID developed two independent episodes of IPD.

The first patient was diagnosed with trichohepatoenteric and short bowel syndromes and developed pneumonia (by serotype 19A) because of a PCV13 vaccine failure 13 months after a meningitis episode by an unknown serotype. The second patient was diagnosed with IgG2 hypogammaglobulinemia and developed an episode of sepsis (by serotype 9N) 2 years after the first episode (by serotype 35B).

Table 2 shows the demographic, clinical, and epidemiological characteristics of the seven patients who died after pneumococcal infection. The ND group had the highest mortality rate (2/21, 9.52 %), followed by ID (3/53, 5.66 %) and HC (2/187, 1.07 %), with significant differences among the groups (Fisher's exact test, $p = 0.024$). The two patients who died due to PCV13 serotypes (6A and 7F) had not received any vaccine dose.

4.2. Vaccination coverage

Of the total patients, 289 (76.66 %) had received at least one dose of any of the available pneumococcal conjugated vaccines. The CRD group had the highest rate of vaccination (100/116, 86.20 %), followed by NR (16/21, 76.19 %), HC (136/187, 72.72 %), and ID (37/53, 69.81 %; Fisher's exact test, $p = 0.03$). PCV13 was the most frequently administered vaccine (90.66 %), followed by PCV7 (7.61 %) and PCV10 (1.73 %). Fig. 2 shows the annual vaccination rates for the groups, including the type of pneumococcal conjugated vaccines used in each of them.

Two hundred sixty-five patients (70.29 %) were age-appropriately vaccinated (even when the vaccination schedule was incomplete) according to the Spanish Pediatric Association recommendations. The CRD group had the highest rate of age-appropriately vaccinated patients (95/116, 81.89 %), followed by HC (124/187, 66.31 %), ID (33/53, 62.26 %), and NR (13/21, 61.90; Fisher's exact test, $p = 0.01$).

4.3. Serotype distribution

A total of 220 strains (58.04 %) were serotyped: 105 in the HC group (56.15 %), 68 in the CRD group (58.62 %), 32 in the ID group (58.18 %), and 15 in the ND group (71.43 %), (Fisher's exact test, $p = 0.606$). Blood was the sample from which most serotyped strains were isolated (180/220), followed by CSF (22/220), pleural fluid (3/220), and synovial fluid (4/220), and one each of the following fluids: pericardial, synovial, aqueous humour, tubal abscess, and glandular aspirate.

The distribution of isolates serotyped by year of isolation and province is summarized in Supplementary Table 4. The remaining isolates,

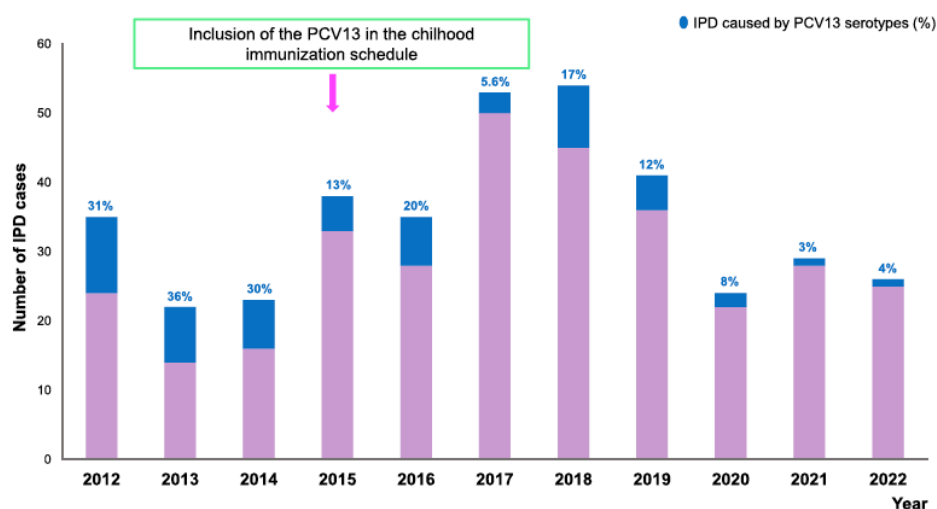


Fig. 1. Confirmed cases of invasive pneumococcal disease by year.

Table 1
Demographic characteristics of confirmed invasive pneumococcal disease cases included in their respective study groups.

	Healthy children	Chronic respiratory disease	Immunodeficiency disorders	Neurology disease	Total	p
Patients	187	116	53	21	377	-
IPD cases	187	116	55	21	379	-
Median age (Q25-Q75)	2.00 (1.16-4.00)	2.00 (1.42-3.00)	3.00 (1.92-5.00)	2.00 (1.54-5.50)	2.00 (1.33-4.00)	-
Average age (STDEV)	2.66 (2.39)	2.70 (2.45)	3.60 (3.00)	3.41 (2.72)	2.85 (2.54)	0.067
Male/female	97/90	66/50	31/22	10/11	204/173	0.67
Clinical presentation, n (%)						
Meningitis	31 (16.58)	18 (15.52)	12 (21.82)	7 (33.33)	67 (17.70)	0.24
Pneumonia	79 (42.25)	47 (40.52)	18 (32.72)	4 (19.05)	148 (39.10)	0.14
Sepsis	36 (19.25)	27 (23.28)	19 (34.55)	3 (14.28)	84 (22.20)	0.15
Occult bacteremia	30 (16.05)	13 (11.21)	5 (9.10)	6 (28.57)	54 (14.26)	0.11
Pericarditis	2 (1.07)	0 (0.00)	1 (1.81)	0 (0.00)	3 (0.80)	-
Arthritis	3 (1.60)	5 (4.31)	0 (0.00)	0 (0.00)	8 (2.11)	-
Pleural empyema	5 (2.67)	5 (4.31)	0 (0.00)	0 (0.00)	10 (2.67)	-
Peritonitis	1 (0.53)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.30)	-
Other	0 (0.00)	1 (0.85) ^a	0 (0.00)	1 (4.77) ^b	2 (0.55)	-
IPD sequelae, n (%)	12 (6.41)	9 (7.76)	3 (5.67)	3 (14.28)	27 (7.17)	0.57
Previous TBI ^c , n (%)	6 (3.20)	7 (6.03)	1 (1.89)	1 (4.76)	15 (3.98)	0.52

^a Endophthalmitis.

^b Tubo-ovarian abscess after pelvic inflammatory disease.

^c TBI: traumatic brain injury.

Table 2
Main characteristics of patients who died with confirmed invasive pneumococcal disease.

Patients group, n (%), Underlying pathology	Age/Sex	Clinical forms of IPD	Pneumococcal vaccine (doses)	Serotype
Healthy children group, 2 (1.07)				
-	3 m/female	Meningitis	PCV13 (1)	Unknown
-	18 m/female	Pericarditis	No	7F
Neurology disease, 2 (9.52)				
Cerebral palsy	6 y/male	Meningitis	No	6A
Epilepsy	1 y/female	Sepsis	PCV13 (3)	Unknow
Immunodeficiency disorders, 3 (5.66)				
Down's syndrome	2 y/male	Sepsis	PCV13 (2)	Unknown
Biliary lithiasis and nephrocalcinosis	2 y/male	Meningitis	PCV13 (4)	15C
Hematopoietic stem cell syndrome	10 y/female	Pneumonia	No	Unknown

m, months; y, years.

which could not be recovered, were autoagglutinating, or non-typable, were classified under the non-serotyped isolates group.

Overall, 38 different serotypes were identified; the 5 most common were 19A (19/220, 8.64 %), 3 (18/220, 8.20 %), 24B/F (18/220, 8.20 %), 33F (14/220, 6.36 %), and 10A (13/220, 5.90 %), without specific association between serotype and anatomical site.

However, serotype 33F did not exhibit tropism for the central nervous system, as no isolates were recovered from (CSF). The most prevalent serotypes found in patients each year are shown in Fig. 3.

The distribution of pneumococcal serotypes in each of the four groups of patients is shown in Fig. 4. In the HC group, the most common serotype was 24B/F (10/105, 9.52 %), followed by 33F (9/105, 8.57 %), 3 (7/105, 6.66 %), and 19A (7/105, 6.66 %). In CRD patients, serotypes 3, 19A, and 24B/F were the most prevalent (each 8/68, 11.76 %). In ID children, serotypes 14 and 11A were the most prevalent (each 4/32, 12.5 %), followed by serotypes 10A and 23B (each 3/32, 9.37 %). Finally, the most prevalent serotypes in the ND group were 23B (3/15, 20 %), followed by 15B and 15C (each 2/15, 13.33 %). The percentage of IPD caused by PCV13 serotypes was slightly higher in patients with any

underlying risk factor, but no significant differences were observed among the groups: CRD (26/105, 24.76 %), ID (10/32, 31.25 %), NR (4/15, 26.66 %), and HC (26/105, 24.76 %; Fisher's exact test, $p = 0.71$).

4.4. Characteristics of vaccine failure cases

We detected 27 cases of pneumococcal vaccine failure according to the study definition, representing 12.27 % of all strains serotyped (Fig. 4). Demographics, clinical features, and serotypes involved in the vaccine failures are shown in detail in Table 3. Of the 27 cases, 66.67 % were male (18 patients), and the overall mean age was 2.30 years (range 1.33-3.00 years, SD 1.44). The most frequent clinical presentation was pneumonia (13/27, 48.16 %), followed by sepsis (6/27, 22.22 %), meningitis (3/27, 11.11 %), occult bacteremia (3/27, 11.11 %), arthritis (1/27, 3.70 %), and pleural empyema (1/27, 3.70 %). All of the patients recovered from the IPD episode without any sequelae. Serotypes 3 ($n=10$ cases, 37.04 %), 19A ($n=10$, 37.04 %), 19F ($n=3$, 11.11 %), 14 ($n=3$, 11.11 %), and 1 ($n=1$, 3.70 %) were the causal agents of vaccine failure episodes.

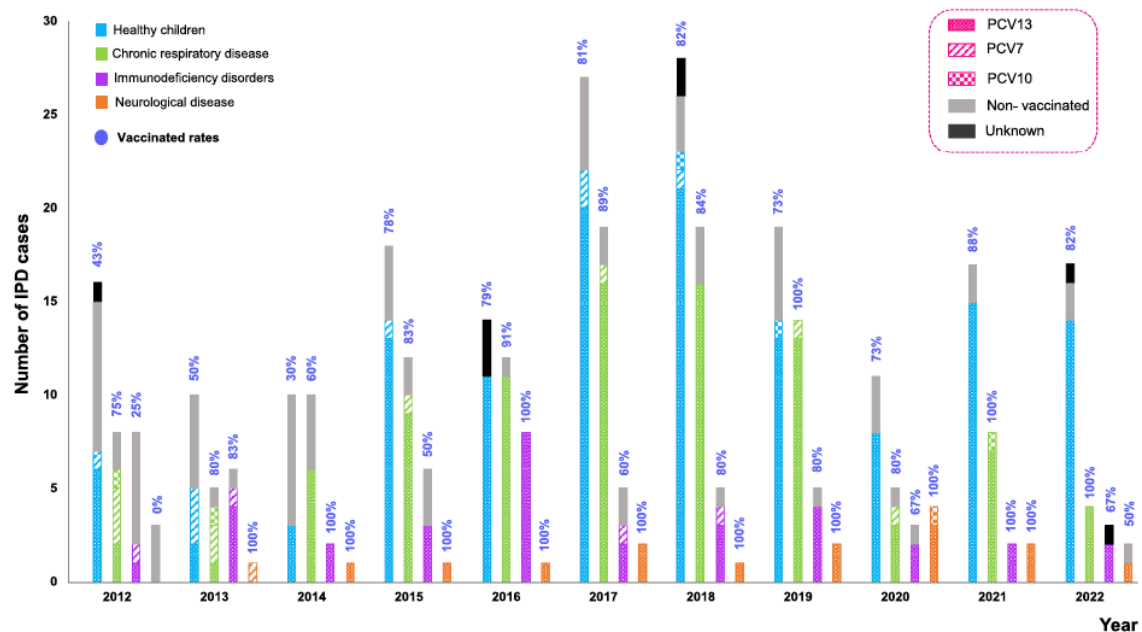


Fig. 2. Distribution of confirmed cases of invasive pneumococcal disease by PCV type, year, and patient group. In patients who received pneumococcal vaccine combinations, only the vaccine with the greatest number of serotypes was considered. Vaccinated rates correspond to the use of the three conjugated vaccines (PCV7, PCV10, and PCV13).

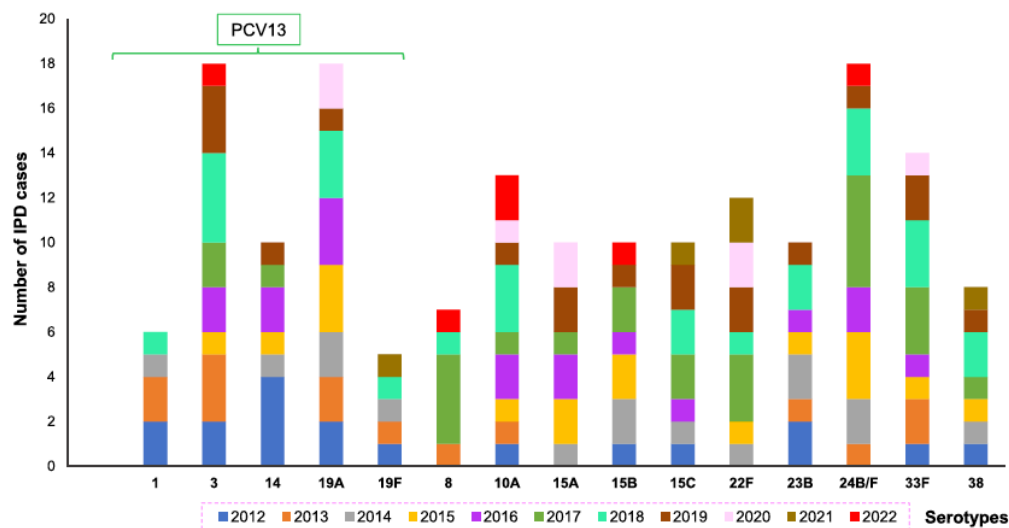


Fig. 3. Distribution of the most frequently serotyped *S. pneumoniae* serotypes causing invasive pneumococcal disease by year. A total of 159 strains (41.96 %) were non-serotyped.

The CRD and ID groups had an almost doubled rate of vaccine failure (10.34 % and 7.27 %, respectively) compared to the HC (5.34 %) and ND groups (4.76 %), though the difference was not significant (Fisher's exact test, $p = 0.40$). In the CRD group, asthma was the most common underlying pathology (5/12). Hypogammaglobulinemia (IgA and IgG2, 1 patient each) was the most frequent disorder in the ID group. The remaining 2 patients included in this group had immune

thrombocytopenic purpura and hereditary spherocytosis. Finally, the patient in the ND group presented with a complex, rare, and severe form of childhood-onset epilepsy, Lennox-Gastaut syndrome. Serotype 19A was predominant in the HC, ID, and ND groups (4/10, 2/4, and 1/1 cases, respectively), whereas serotype 3 was responsible for half of IPD episodes in the CRD group (6/12 cases).

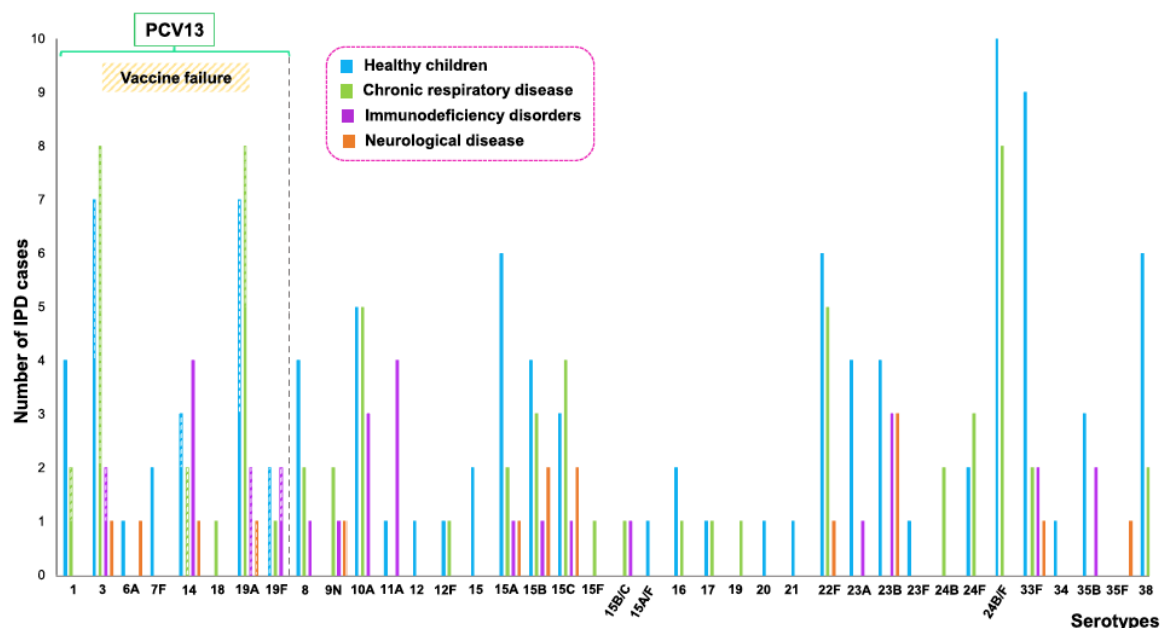


Fig. 4. *S. pneumoniae* serotype distribution of confirmed cases of invasive pneumococcal disease by patient group. The left side of the graph shows the 27 cases of PCV13 vaccine failures (patients age-correctly vaccinated) confirmed during the study period. Serotypes 15A, 15B, 15C, 15F, 24B, and 24F appear separately or together (15A/F, 15B/C, and 24B/F) depending on the type of reagent available Table 3.

4.4.1. Discussion

Globally, IPD is a major cause of morbi-mortality in young children [4]. This large retrospective study reports the confirmed IPD cases and trends before and after implementation of PCV13 vaccination in children aged <13 years in the Spanish Comunidad Valenciana. We noted a comparable rate of IPD episodes to similar studies [28,29].

As in other studies [30–32], the overall vaccine coverage rate increased from 60 % to 87 % after PCV13 introduction. Notably, patients with severe risk factors (ID and ND) were the most inadequately vaccinated.

In our study, IPD had a negative impact on males and those under 5 years of age, as has been reported in other large studies [33,34]. The PCV13 serotypes causing IPD have been markedly reduced after the routine use of this vaccine, exhibiting a clear difference between pre- and post-PCV13 implementation. As in other series, a parallel increase in non-PCV13 IPD cases was observed [35–37].

IPD is more prevalent in children with chronic diseases than in the general population, and this was confirmed in our study, as nearly half of the patients had underlying pathologies. Furthermore, these pre-existing conditions are related to high fatality and IPD recurrence rates [17,38].

The more serious clinical symptoms of pneumococcal disease are pneumonia, bacteremia, and meningitis. In our series, pneumonia was the most common clinical presentation of IPD (148/379 cases), though it has been related mostly to adults [5]. Furthermore, pneumonia is found in both children without underlying medical conditions (HC group) and those with respiratory pathologies, particularly asthma and recurrent ear infections. Few studies have included asthma and chronic otitis as risk factors for IPD [39–42], though *S. pneumoniae* is a well-known agent of community-acquired otitis, which can progress to invasive disease in cases of epithelial and/or cellular immunity dysfunction [43].

According to the literature [17,44], meningitis is the most prevalent form of IPD in children with chronic neurological pathologies. Cochlear implants, CSF leaks, epilepsy, or inner ear deformities are closely related to pneumococcal meningitis [45]. Hénaff *et al.* found that one-third of

patients with *S. pneumoniae* meningitis had predisposing conditions, most commonly an anatomical breach in the blood-brain barrier [44]. In our series, ND patients also had the most sequelae and highest mortality rates, the latter with marked significance ($p = 0.024$). These findings are consistent with previous publications reporting that bacterial meningitis has a case-fatality rate of up to 30 %, and as many as 50 % of survivors develop neurological complications [46].

The two patients with two episodes of IPD had an underlying immunodeficiency. In some series, up to 75 % of patients with immunodeficiency had recurrent IPD [47]. Our results support the immune evaluation of children without a known predisposing condition who present with their first episode of invasive *S. pneumoniae* infection or recurrent IPD, particularly in vaccine failure after immunization complete. This immune evaluation should include an assessment for immunoglobulin deficiency, pneumococcal antibody deficiency, complement disorders, and asplenia [17].

During the study period, 19A, 3, 24B/F, 33F, and 10A were the most frequent pneumococcal serotypes. This finding is in agreement with other authors in the specific case of serotype 19A and especially serotype 3 [15,48]. In our series, we did not observe relevant differences between the most prevalent serotypes in the different groups of patients, and the literature does not mention this finding.

As in other series, PCV13 vaccine failures were mainly associated with pneumonia and with serotypes 3 and 19A [11,49]. Among these, serotype 3 is perhaps the most challenging, though serotype 19A has been of concern in some regions due to its increased prevalence and antibiotic resistance [50]. Lapidot *et al.* observed no effect of PCV13 on the incidence of IPD by serotype 3 in the pediatric population, along with increased colonization rates by this serotype in a population in Massachusetts [51]. Moreover, clinical trials of PCV13 immunogenicity have confirmed that the humoral immune response to serotype 3 is lower than the response to other serotypes, making it an important public health matter [52].

In the present study, >60 % of patients with PCV13 vaccine failures had underlying conditions. In this context, it would be valuable to assess

Table 3

Demographic and clinical characteristics of patients with PCV13 vaccine failure.

Patients group, n (%), Underlying pathology	Age/Sex	Clinical presentation of IPD	Pneumococcal vaccine (doses)	Serotype
Healthy children, 10 (5.34)				
-	7 m/male	Sepsis	PCV13 (2)	3
-	20 m/male	Meningitis	PCV13 (3)	3
-	3 y/female	Sepsis	PCV13 (3)	3
-	5 y/male	Pneumonia	PCV7 (3), PCV13(1)	14
-	10 m/male	Pneumonia	PCV13 (2)	19A
-	11 m/male	Pneumonia	PCV13 (3)	19A
-	20 m/male	Sepsis	PCV13 (3)	19A
-	2 y/female	Sepsis	PCV13 (4)	19A
-	4 m/male	Occult bacteremia	PCV13 (2)	19F
-	2 y/male	Meningitis	PCV13 (3)	19F
Chronic respiratory pathology, 12 (10.34)				
Allergy	2 y/female	Pneumonia	PCV10 (3)	1
Recurrent bronchospasm	16 m/female	Pneumonia	PCV13 (3)	3
Recurrent bronchiolitis	19 m/male	Pneumonia	PCV13 (3)	3
Asthma	2 y/male	Pleural empyema	PCV13 (4)	3
Recurrent bronchospasm	4 y/male	Meningitis	PCV13 (4)	3
Chronic otitis	5 y/female	Pneumonia	PCV13 (4)	3
Asthma	6 y/female	Pneumonia	PCV13 (4)	3
Asthma	2 y/male	Pneumonia	PCV13 (3)	14
Asthma	3 y/male	Sepsis	PCV13 (4)	14
Chronic otitis	11 m/male	Sepsis	PCV13 (3)	19A
Asthma	21 m/male	Pneumonia	PCV13 (4)	19A
Chronic otitis	2 y/male	Arthritis	PCV13 (4)	19A
Immunodeficiency disorders, 4 (7.27)				
IgA hypogammaglobulinemia	4 y/female	Pneumonia	PCV13 (4)	3
Immune thrombocytopenic purpura	1 y/male	Occult bacteremia	PCV13 (3)	19A
IgG2 hypogammaglobulinemia*	3 y/female	Pneumonia	PCV13 (4)	19A
Hereditary spherocytosis (candidate for splenectomy)	3 y/male	Pneumonia	PCV7(3), PCV13 (1)	19F
Neurological disease, 1 (4.76)				
Lennox-Gastaut syndrome	21 m/female	Occult bacteremia	PCV13(3)	19A

*Patient with PCV13 vaccine failure episode after thirteen months of meningitis (by serotype unknown). m, months; y, years.

the pneumococcal antibody titers after fully vaccination to determinate if the patients were poor-PCV13 responders. Which would support a recent study reporting low production of pneumococcal antibodies after full vaccination in a similar cohort [53]. Nevertheless, the relationship between immunological status and vaccine failure is not clear in the

literature, as some studies have found no failures related to chronic diseases [15,54]. A plausible explanation would be that some studies excluded patients with comorbidities, as these represent a substantial source of variability in terms of susceptibility to infection [55]. Therefore, future research with larger series is needed to provide more

accurate and reliable information on this issue.

A limitation of the present study is the notable number of pneumococcal strains that were not serotyped, or incompletely serotyped, especially during the COVID-19 pandemic, which could result in reduced detection of cases of vaccine failure. In addition, no information was available on specific IgG levels in cases of vaccine failure.

In conclusion, we found that the introduction of PCV13 into childhood immunization programs has significantly reduced IPD cases by PCV13 serotypes, except for serotype 3. However, the prevalence of IPD is higher in children with underlying diseases, with worse clinical courses and higher case-fatality rates in patients with neurological disorders. We also observed a slight relationship between immunodeficiencies and vaccine failure or recurrent IPD, though the limited sample size makes it inconclusive.

CRediT authorship contribution statement

Marta Garrido-Jareño: Writing – review & editing, Writing – original draft, Methodology, Formal analysis. Francisco Javier Roig-Sena: Supervision, Data curation. Elvira Pérez-Pérez: Supervision, Data curation. Ana Gil-Brusola: Validation, Supervision, Methodology. José Luis López-Hontangas: Validation, Supervision. Eulogio Valentín-Gómez: Validation, Supervision. Antonio Pineda-Lucena: Validation, Supervision. Javier Pemán: Validation, Supervision, Conceptualization.

Declaration of competing interest

Marta Garrido-Jareño (MGJ): conceived of the presented idea and wrote the manuscript. Francisco Javier Roig-Sena (FJRS): provided part of the epidemiological data of the patients to carry out the study. Elvira Pérez-Pérez (EPP): provided part of the epidemiological data of the patients to carry out the study. Ana Gil-Brusola (AGB): conceived of the presented idea and were involved in planning and supervised the work. José Luis López-Hontangas (JLLH): discussed the results and contributed to the final manuscript. Eulogio Valentín-Gómez (EVG): discussed the results and contributed to the final manuscript. Antonio Pineda-Lucena (APL): discussed the results and contributed to the final manuscript. Javier Pemán (JP): conceived the study and were in charge of overall direction and planning. Discussed the results and contributed to the final manuscript.

References

- [1] Loughran AJ, Orihuela CJ, Tuomanen EI. *Streptococcus pneumoniae*: Invasion and Inflammation. *Microbiol Spectr* 2019;7. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0004-2018>. 7.2.15.
- [2] Musher DM. How contagious are common respiratory tract infections? *The New England Journal of Medicine*; 2003.
- [3] Dietl B, Henares D, Boix-Palop L, et al. Related Factors to *Streptococcus pneumoniae* invasive infection and clinical manifestations: the potential role of nasopharyngeal microbiome. *Front Med* 2021;8:650271. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.650271>.
- [4] European Centre for Disease Prevention and Control. Invasive pneumococcal disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC; 2020.
- [5] Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. 14th ed. Washington, DC: Public Health Foundation; 2021.
- [6] Liu L, Oza S, Hogan D, et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *The Lancet* 2016;388:3027–35. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31593-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31593-8).
- [7] Versluis KA, Eurich DT, Marrie TJ, et al. Invasive pneumococcal disease and long-term outcomes in children: A 20-year population cohort study. *The Lancet Regional Health - Americas* 2022;14:100341. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2022.100341>.
- [8] <http://publicaciones.isciii.es/>.
- [9] Edmond K, Clark A, Korczak VS, et al. Global and regional risk of disabling sequelae from bacterial meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2010;10:317–28. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70048-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70048-7).
- [10] Sá-Leão R, Pinto F, Aguiar S, et al. Analysis of invasiveness of pneumococcal serotypes and clones circulating in Portugal before widespread use of conjugate vaccines reveals heterogeneous behavior of clones expressing the Same Serotype. *J Clin Microbiol* 2011;49:1369–75. <https://doi.org/10.1128/JCM.01763-10>.
- [11] Marimon JM, Ardanuy C. Epidemiology of pneumococcal diseases in Spain after the introduction of pneumococcal conjugate vaccines. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2021;39:142–50. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.02.016>.
- [12] European Medicines Agency. Summary of prevar 7 product characteristics. London, United Kingdom: European Medicines Agency; 2011 [cited 2023 Feb 19]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Summary_for_the_public/human/000323/WC500041558.pdf.
- [13] Ben-Shimol S, Greenberg D, Givon-Lavi N, et al. Early impact of sequential introduction of 7-valent and 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on IPD in Israeli children <5 years: An active prospective nationwide surveillance. *Vaccine* 2014;32:3452–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.03.065>.
- [14] Lepoutre A, Varon E, Georges S, et al. Impact of the pneumococcal conjugate vaccines on invasive pneumococcal disease in France, 2001–2012. *Vaccine* 2015;33:359–66. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.11.011>.
- [15] Hernández S, Moraga-Llop F, Díaz A, et al. Failures of 13-Valent Conjugated Pneumococcal Vaccine in Age-Appropriately Vaccinated Children 2–59 Months of Age. *Spain. Emerg Infect Dis* 2020;26:1147–55. <https://doi.org/10.3201/eid2606.190951>.
- [16] Froneman C, Kelleher P, José RJ. Pneumococcal Vaccination in Immunocompromised Hosts: An Update. *Vaccines (Basel)* 2021;9:536. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060536>.
- [17] Butters C, Phuon LK, Cole T, Gwee A. Prevalence of Immunodeficiency in Children With Invasive Pneumococcal Disease in the Pneumococcal Vaccine Era: A Systematic Review. *JAMA Pediatr* 2019;173:1084. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2019.3203>.
- [18] Backhaus E, Berg S, Andersson R, et al. Epidemiology of invasive pneumococcal infections: manifestations, incidence and case fatality rate correlated to age, gender and risk factors. *BMC Infect Dis* 2016;16:367. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1648-2>.
- [19] van Aalst M, Lötsch F, Spijker R, et al. Incidence of invasive pneumococcal disease in immunocompromised patients: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med Infect Dis* 2018;24:89–100. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2018.05.016>.
- [20] Hernández-Bou S, Gómez B, Mintegi S, et al. Occult bacteremia etiology following the introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine: a multicenter study in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018;37:1449–55. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3270-2>.
- [21] Rubarth Lori Baas. Sepsis, Pneumonia, and Meningitis: What Is the Difference? *Newborn and Infant Nursing Reviews* 2010;10:177–81. <https://doi.org/10.1053/j.nainr.2010.09.013>.
- [22] Shutt CK, Samore M, Carroll KC. Comparison of the Denka Seiken Slide Agglutination Method to the Quellung Test for Serogrouping of *Streptococcus pneumoniae* Isolates. *J Clin Microbiol* 2004;42:1274–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1274-1276.2003>.
- [23] Mudany MA, Kikuchi K, Totsuka K, Uchiyama T. Evaluation of a new serotyping kit for *Streptococcus pneumoniae*. *J Med Microbiol* 2003;52:975–80. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05306-0>.
- [24] Álvarez García FJ, Cilleruelo Ortega MJ, Álvarez Aldeán J, et al. Immunization schedule of the Pediatric Spanish Association: 2022 recommendations. *Anales de Pediatría (English Edition)* 2022;96. <https://doi.org/10.1016/j.anpede.2021.11.002>. S9.e1-S9.e10.
- [25] Heininger U, Bachtari NS, Bahri P, et al. The concept of vaccination failure. *Vaccine* 2012;30:1265–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.12.048>.
- [26] Swarthout TD, Henrion MYR, Thindwa D, et al. Waning of antibody levels induced by a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine, using a 3 + 0 schedule, within the first year of life among children younger than 5 years in Blantyre, Malawi: an observational, population-level, serosurveillance study. *Lancet Infect Dis* 2022;22:1737–47. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00438-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00438-8).
- [27] Brodzki N, Frazer-Abel A, Grumach AS, et al. European Society for Immunodeficiencies (ESID) and European Reference Network on Rare Primary Immunodeficiency, Autoinflammatory and Autoimmune Diseases (ERN RITA) Complement Guideline: Deficiencies, Diagnosis, and Management. *J Clin Immunol* 2020;40:576–91. <https://doi.org/10.1007/s10875-020-00754-1>.
- [28] Mohanty S, Podmore B, Cuñado Moral A, et al. Incidence of pneumococcal disease from 2003 to 2019 in children ≤17 years in England. *Pneumonia* 2023;15:2. <https://doi.org/10.1186/s41479-022-00103-3>.
- [29] Martínez-Osorio J, García-García JJ, Moraga-Llop F, et al. Invasive pneumococcal disease in children under 60 months before and after availability of 13-valent conjugate vaccine. *Anales de Pediatría (English Edition)* 2022;96:501–10. <https://doi.org/10.1016/j.anpede.2021.06.005>.
- [30] Domínguez Á, Ciruela P, Hernández S, et al. Effectiveness of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in preventing invasive pneumococcal disease in children aged 7–59 months. A matched case-control study. *PLoS One* 2017;12:e0183191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183191>.
- [31] Guevara M, Barricarte A, Torroba L, et al. Direct, indirect and total effects of 13-valent pneumococcal conjugate vaccination on invasive pneumococcal disease in children in Navarra, Spain, 2001 to 2014: cohort and case-control study. *Eurosurveillance* 2016;21. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.14.30186>.
- [32] Picazo J, Ruiz-Contreras J, Casado-Flores J, et al. Effect of the different 13-valent pneumococcal conjugate vaccination uptakes on the invasive pneumococcal disease in children: Analysis of a hospital-based and population-based surveillance study in Madrid, Spain, 2007–2015. *PLoS One* 2017;12:e0172222. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172222>.

- [33] Tan TQ. Pediatric Invasive Pneumococcal Disease in the United States in the Era of Pneumococcal Conjugate Vaccines. *Clin Microbiol Rev* 2012;25:409–19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00018-12>.
- [34] de Oliveira LH, Camacho LAB, Coutinho ESF, et al. Impact and effectiveness of 10 and 13-valent pneumococcal conjugate vaccines on hospitalization and mortality in children aged less than 5 years in Latin American Countries: a systematic review. *PLoS One* 2016;11:e0166736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166736>.
- [35] Naucier P, Galanis I, Morfeldt E, et al. Comparison of the impact of pneumococcal conjugate vaccine 10 or pneumococcal conjugate vaccine 13 on invasive pneumococcal disease in equivalent populations. *Clinical Infectious Diseases* 2017;65. <https://doi.org/10.1093/cid/cix685>. 1780–1790.e1.
- [36] Hu T, Song Y, Done N, et al. Incidence of invasive pneumococcal disease in children with commercial insurance or Medicaid coverage in the United States before and after the introduction of 7- and 13-valent pneumococcal conjugate vaccines during 1998–2018. *BMC Public Health* 2022;22:1677. <https://doi.org/10.1186/s12889-022-14051-6>.
- [37] van der Linden M, Imöhl M, Perniciaro S. Limited indirect effects of an infant pneumococcal vaccination program in an aging population. *PLoS One* 2019;14:e0220453. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220453>.
- [38] Hjuler T, Wohlfahrt J, Staum Kalfoti M, et al. Risks of Invasive Pneumococcal Disease in Children With Underlying Chronic Diseases. *Pediatrics* 2008;122:e26–32. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-1510>.
- [39] Inghammar M, Engström G, Kahlmeter G, et al. Invasive pneumococcal disease in patients with an underlying pulmonary Disorder. *Clinical Microbiology and Infection* 2013;19:1148–54. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12182>.
- [40] Talbot TR, Halasa NB, Poehling KA, Griffin MR. Asthma as a Risk Factor for Invasive Pneumococcal Disease. *N Engl J Med* 2005.
- [41] Castro-Rodriguez JA, Abarca K, Forno E. Asthma and the Risk of Invasive Pneumococcal Disease: A Meta-analysis. *Pediatrics* 2020;145:e20191200. <https://doi.org/10.1542/peds.2019-1200>.
- [42] Gregory J, Chohrach N, Iyengar D. Invasive Pneumococcal Disease Secondary to Acute Otitis Media in a High-Risk Patient: A Case Report and Review of Recent Changes to Pneumococcal Immunization Guidelines. *Cureus* 2022. <https://doi.org/10.7759/cureus.28557>.
- [43] Bergenfelz C, Hakansson AP. Streptococcus pneumoniae Otitis Media Pathogenesis and How It Informs Our Understanding of Vaccine Strategies. *Curr Otorhinolaryngol Rep* 2017;5:115–24. <https://doi.org/10.1007/s40136-017-0152-6>.
- [44] Darmaun L, Levy C, Lagrèe M, et al. Recurrent Pneumococcal Meningitis in Children: A Multicenter Case-control Study. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2019;38:881–6. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002358>.
- [45] Hénaff F, Levy C, Cohen R, et al. Risk Factors in Children Older Than 5 Years With Pneumococcal Meningitis: Data From a National Network. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2017;36:457–61. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001470>.
- [46] Zainel A, Mitchell H, Sadarangani M. Bacterial Meningitis in Children: Neurological Complications, Associated Risk Factors, and Prevention. *Microorganisms* 2021;9:535. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030535>.
- [47] Ingels H, Scheibel L, Lundstedt AC, et al. Immunodeficiency Among Children with Recurrent Invasive Pneumococcal Disease. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2015;34:644–51. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000070>.
- [48] Moraga-Llop F, García-García J-J, Díaz-Conradi A, et al. Vaccine Failures in Patients Properly Vaccinated with 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in Catalonia, a Region with Low Vaccination Coverage. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2016;35:460–3. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001041>.
- [49] Antachopoulos C, Tsolia MN, Tzanakaki G, et al. Parapneumonic Pleural Effusions Caused by Streptococcus pneumoniae Serotype 3 in Children Immunized with 13-Valent Conjugated Pneumococcal Vaccine. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2014;33:81–3. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000041>.
- [50] Mott MP, Caierão J, Cunha GR, et al. Emergence of serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* after PCV10 associated with a ST320 in adult population, in Porto Alegre, Brazil. *Epidemiol Infect* 2019;147:e93. <https://doi.org/10.1017/S0950268819000013>.
- [51] Lapidot R, Shea K, Yildirim I, et al. Characteristics of Serotype 3 Invasive Pneumococcal Disease before and after Universal Childhood Immunization with PCV13 in Massachusetts. *Pathogens* 2020;9:396. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050396>.
- [52] Andrews NJ, Waight PA, Burbidge P, et al. Serotype-specific effectiveness and correlates of protection for the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine: a postlicensure indirect cohort study. *Lancet Infect Dis* 2014;14:839–46. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70822-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70822-9).
- [53] Garrido-Jareño M, Sahuquillo-Arce JM, Rodríguez-Vega H, et al. IgG antibody response to pneumococcal-conjugated vaccine (Prevenar®13) in children with immunodeficiency Disorders. *Med Microbiol Immunol* 2023;212:93–102. <https://doi.org/10.1007/s00430-022-00759-0>.
- [54] Adebajo TA, Pondo T, Yankey D, et al. Pneumococcal Conjugate Vaccine Breakthrough Infections: 2001–2016. *Pediatrics* 2020;145:e20190836. <https://doi.org/10.1542/peds.2019-0836>.
- [55] Mungall BA, Hoet B, Nieto Guevara J, Soumahoro L. A systematic review of invasive pneumococcal disease vaccine failures and breakthrough with higher-valency pneumococcal conjugate vaccines in children. *Expert Rev Vaccines* 2022;21:201–14. <https://doi.org/10.1080/14760584.2022.2012455>.



Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology & Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobio

Supplementary information

Pathologies	n	Male/female	Median age years (Q25-Q75)	Age-appropriately vaccinated, n (%)
Chronic ear infection	36	19/17	2.00 (1.52-3.75)	30 (83.33)
Asthma	20	12/8	2.00 (1.81-6.00)	15 (75.00)
Recurrent bronchospasm	19	10/9	1.83 (0.83-2.00)	16 (84.21)
Recurrent bronchiolitis	12	8/4	1.96 (0.58-2.75)	11 (91.67)
Recurrent bronchitis	8	5/3	1.79 (0.75-2.00)	6 (75.00)
Allergy	7	4/3	3.00 (1.42-6.00)	4 (57.14)
Recurrent respiratory infections	8	5/3	1.67 (1.12-1.98)	8 (100.00)
Recurrent pneumonia	3	1/2	2.00 (1.50-7.00)	2 (66.67)
Sleep apnea	3	2/1	1.42 (0.33-1.50)	3 (100.00)
Total	116	66/50	2.00 (1.41-3.00)	95 (81.89)

Supplementary Table 1: Demographic characteristics and pneumococcal vaccine coverage in patients included in CRD group.



Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology & Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobio

Pathologies	n	Male/female	Median age years (Q25-Q75)	Age-appropriately vaccinated, n (%)
Primary immunodeficiency disease (PID)	21	13/8	2.00 (1.17-4.50)	14 (66.66)
Common variable immunodeficiency (TNFRSF13B mutation)	1	0/1	12.00	1 (100.00)
Hypogammaglobulinemia (IgA (2), IgG2 (1))	3	2/1	4.00 (2.00-10.00)	3 (100.00)
Syndromic PID ^a	16	10/6	1.96 (1.08-3.75)	10 (62.50)
Other ^b	1	1/0	5.00	0 (0.00)
Secondary immunodeficiency disease (SID)	26	16/10	3.00 (2.00-5.00)	14 (53.84)
Diabetes	6	3/3	2.00 (1.69-6.75)	1 (16.67)
Bone marrow transplant (BMT) /leukemia/lymphoma	5	4/1	7.00 (3.00-8.50)	2 (40.00)
Nephrotic syndrome	4	2/2	4.00 (2.50-4.75)	3 (75.00)
Solid organ transplantation	2	0/2	3.50	2 (100.00)
Spleen disorder	1	1/0	3.00	1 (100.00)
Immunosuppressive therapy ^c	1	1/0	4.00	0 (0.00)
Trichohepatoenteric syndrome	1	0/1	3.00	1 (100.00)
Nephrocalcinosis	1	1/0	2.00	1 (100.00)
MELAS syndrome ^d	1	0/1	2.00	1 (100.00)
Waldenström macroglobulinemia	1	1/0	0.50	1 (100.00)
Kaposi's sarcoma	1	1/0	6.00	0 (0.00)
Burkitt lymphoma	1	1/0	5.00	0 (0.00)
Celiac	1	1/0	2.00	1 (100.00)
Mixed immunodeficiency disorder (MID)^e	3	0/3	3.00 (0.83-6.00)	2 (66.67)
Severe combined immunodeficiency + BMT	1	0/1	1.00	1 (100.00)
Hypogammaglobulinemia (IgG2) ^f	1	0/1	6.00	1 (100.00)
Hemophagocytic lymphohistiocytosis + BMT	1	0/1	3.00	0 (0.00)
Possible immunodeficiency disorder (POID)^g	3	2/1	2.00 (0.41-2.00)	3 (100.00)
Total	53	31/22	3.00 (1.92-5.00)	33 (62.26)

Supplementary Table 2: Demographic characteristics and pneumococcal vaccine coverage in patients included in ID group.



^a Pathologies included in syndromic PID: Down syndrome (3), Sickle cell disease (2), thalassemia (2), microangiopathic hemolytic anemia (1), DiGeorge syndrome (1), langerhans| cell histiocytosis (1), mucopolysaccharidosis syndrome (1), immune thrombocytopenic purpura (1), Klinefelter syndrome (1), Noonan syndrome (1), fatty acid oxidation disorder (1), thrombocytosis (1).

^b Non-filiated syndrome in patient from China.

^c Patient with methotrexate therapy for chronic uveitis.

^d MELAS syndrome: Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes.

^e Patients with confirmed PID diagnosis in combination with immunosuppressive therapy.

^f Patient with cerebrospinal fluid leak.

^g Patients under observation for suspected immunodeficiency due to recurrent infections, unusual severity, or uncommon etiologic pathogens.



Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology & Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobio

Pathologies	n	Male/female	Median age years (Q25-Q75)	Age-appropriately vaccinated, n (%)
Epilepsy ^a	6	2/4	1.58 (0.87-2.44)	4 (66.67)
Cerebral palsy	5	3/2	6.00 (5.00-8.50)	2 (40.00)
Craniosynostosis and craniofacial disorders	3	2/1	3.00 (0.83-5.00)	2 (66.67)
Macrocephalus	2	1/1	1.75	2 (100.00)
Cochlear implant ^b	2	1/1	1.58	2 (100.00)
Neonatal encephalopathy	2	1/1	1.92	1 (50.00)
Cerebrospinal fluid leak	1	0/1	9.00	0 (0.00)
Total	21	10/11	2.00 (1.54-5.50)	13 (61.90)

Supplementary Table 3: Demographic characteristics and pneumococcal vaccine coverage in patients included in ND group.

^a One patient presents a severe form of epilepsy (Lennox-Gastaut syndrome).

^b Two patients had neonatal hypoacusis, one of them had a diagnosis of Pendred syndrome (SLC26A4 mutation).



IgG antibody response to pneumococcal-conjugated vaccine (Prevenar®13) in children with immunodeficiency disorders

Marta Garrido-Jareño^{1,2,3} · José Miguel Sahuquillo-Arce^{2,4} · Héctor Rodríguez-Vega⁵ · Carmen Lloret-Sos² · Ana Gil-Brusola^{2,6} · José Luis López-Hontangas^{2,6} · María Nuñez-Beltrán⁷ · Jordi Tortosa-Carreres⁸ · José Ángel García-García³ · Lourdes Cerdón⁹ · Leonor Puchades-Carrasco¹ · Carmen Carreras-Gil de Santivañes⁵ · Antonio Pineda-Lucena¹⁰ · Javier Pemán-García^{2,6}

Received: 16 September 2022 / Accepted: 1 December 2022 / Published online: 3 January 2023
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

Abstract

Measurement of anti-pneumococcal capsular polysaccharides (anti-PnPs) IgG titers is an important tool in the immunologic assessment of patients with suspected immunodeficiency disorders (ID) to reduce the morbi-mortality and minimize severe infections. Retrospectively, we studied the relationship among anti-PnPs IgG response to 3 doses of Prevenar®13, levels of immune system components, leukocyte populations, and clinical data in children with ID. Serum samples were collected at least 4 weeks post vaccination. Subsequently, multi-serotype enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed. Eighty-seven children (under 12 years) were enrolled. Primary immunodeficiency disorder (PID) was the most common disorder (45) followed by possible immunodeficiency disorder (POID) (19), secondary immunodeficiency disorder (SID) (15), and mixed immunodeficiency disorder (MID) (8). The median age was 3 (1.50–5.33) years, 65% of patients were male. Deficient production of anti-PnPs IgG (titer ≤ 50 mg/L) was detected in 47 patients (54%), especially in the MID group, all of them under immunosuppressive therapy. In PCV13 responders, the mean of leukocyte population levels was higher with statistically significance differences in CD4 +/CD8 + T lymphocytes ($p=0.372$, $p=0.014$) and CD56 +/CD16 + NK ($p=0.016$). Patients with previous bone marrow transplantation were the worst PCV13 responders. Pneumococcal IgG antibody titers (post-vaccination) along with clinical and analytical markers represented.

Keywords PCV13 · Children with immunodeficiency disorders · Anti-PnP IgG titers · Immunoglobulin levels · Lymphocyte populations

Abbreviations

PCV Pneumococcal-conjugated vaccine
 PPSV Pneumococcal polysaccharide vaccine
 PID Primary immunodeficiency disorder

Edited by Volkhard A.J. Kempf.

✉ Marta Garrido-Jareño
marta.garrido@ucv.es

- ¹ Drug Discovery Unit, Health Research Institute Hospital La Fe, Valencia, Spain
- ² Microbiology Department, University and Polytechnic Hospital La Fe, Avenida Fernando Abril Martorell, 106 Torre A 3ª Planta, 46026 Valencia, Spain
- ³ Valencian Institute of Pathology, Catholic University of Valencia, Valencia, Spain
- ⁴ Respiratory Infection Research Group, Health Research Institute Hospital La Fe, Valencia, Spain
- ⁵ Paediatric Department, University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain

- ⁶ Severe Infection Research Group, Health Research Institute Hospital La Fe, Valencia, Spain
- ⁷ Immunology Department, University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain
- ⁸ Medical Analysis Department, University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain
- ⁹ Hematology Research Group, Health Research Institute Hospital La Fe, Valencia, Spain
- ¹⁰ Molecular Therapeutics Program, Center for Applied Medical Research, University of Navarra, Pamplona, Spain

POID	Possible immunodeficiency disorder
SID	Secondary immunodeficiency disorder
MID	Mixed immunodeficiency disorder
ID	Immunodeficiency disorder
IT	Immunosuppressive therapy

Introduction

Immunodeficiency disorders (ID) represent defects in the immune system that result in weakened or dysregulated immune defense. These deficiencies may occur as primary or secondary conditions or as a combination of both, which are not rare illness although their prevalence varies greatly from country. Primary immunodeficiency diseases (PID) constitute inherent defects in immunity, most of which arise from inborn deviations in the genetic code. Worldwide, approximately 1/10000 people are affected by PID, a number which is likely underestimated due to “missed” diagnoses [1, 2]. The wide range of presentations of PID entails that some forms are undiagnosed for years. Secondary immunodeficiency diseases (SID) are currently increasing and might be defined as impairment of the function of cells or tissues of the immune system caused by extrinsic factors, like HIV infection, lymphoproliferative diseases and, particularly, use of immunosuppressive therapy (IT) [3].

Patients with immunodeficiencies, characteristically suffer from recurrent, severe, or unusual infections, which can lead to deterioration of both their health and quality of life. Nevertheless, development, recurrence, and pathogenesis of these infections within the immunological alterations profile depend mainly on the immunological disorder and not on patient's age [3]. In this sense, severe forms of IPD are particularly more common in pediatric population than adults, in which have a high infectious susceptibility. Furthermore, in this serious illness, morbidity–mortality rates are relevant, especially in common variable immunodeficiency (CVID) [4]. Although in recent decades, the mortality of some of these patients has been reduced to approximately 20% since the introduction of the immunoglobulin replacement therapy (IRT) [5]. Currently, the extensive use of IRT in the clinical practice, together with other specific immunodeficiency treatments like bone marrow transplantation (BMT), contributes to improving the survival of ID patients. Furthermore, severe infections should be minimized using appropriate anti-infective prophylaxis combined with social and environmental preventive measures. Thus, early ID diagnosis is crucial. Based on evidence [6], children with suspected ID should be prematurely referred to immunology specialists for diagnostic evaluation and management recommendations.

The production of normal counts of antibodies and other immunologic components is essential for an adequate

response against a wide variety of pathogens. Therefore, quantitative and qualitative defects in their normal production result in recurrent and severe infections [7]. In this sense, the laboratory serves as the primary source of diagnostic information used to define the immunologic defect. In clinical practice, quantitation of specific antibody levels to prior vaccines, immunoglobulins, IgG subclasses, pre/post-immunization antibody titers and iso-hemagglutinins is used as an initial screening test to ID diagnosis [8–10]. Any abnormalities in the immunoglobulin levels quantification and/or post-vaccination serological responses should be followed by lymphocyte populations analysis performed by flow cytometry to ensure the appropriate presence and distribution of the different cellular subpopulations [7]. Regardless, post-immunization titers below protective levels should be evaluated in the clinical context of the patient and accompanied by other complementary explorations adjusted to the diagnostic suspicion.

Measured pneumococcal vaccine response is necessary because of *Streptococcus pneumoniae* in one of the most commonly isolated microorganisms in bacterial infections in ID patients, especially in primary antibodies deficiencies [11]. These pneumococcal assays are important in vaccine efficacy evaluation as well as in the diagnosis of certain immune deficiency syndromes. The definitive method to evaluate antibody production involves immunizing a patient with protein antigens (e.g., tetanus toxoid) and polysaccharide antigens (e.g., Pneumovax, Merk & Co, Inc, Whitehouse Station, NJ) followed by assessing pre-immunization and 3–4-week post-immunization antibody levels [8].

Nevertheless, in our study, we measured titers of anti-pneumococcal capsular polysaccharides (anti-PnPs) IgG after three shots of pneumococcal-conjugated vaccine (PCV13), following the complete vaccination pediatric schedule, as a primary end-point that would predict protection against pneumococcal disease [12]. In this sense, all our patients should achieve antibody protective levels with fully pneumococcal vaccination, although in more than half, these are not obtained. Although, the correct immunization response protects against infection, other conditions, such as environmental, behavioral, nutritional, and immunological factors, also contribute to avoid pneumococcal disease.

Therefore, we focused on collecting clinical and analytical data related to immunological status (PCV13 response, immunoglobulin levels, IgG subclasses, leukocytes and neutrophils count, and lymphocyte subsets) from pediatric patients with ID that are useful for their clinical management. Accurate and early diagnosis of these pathologies is critical for appropriate therapy and affords the opportunity to provide suitable genetic counseling to the patient and his or her family.

Methods

Study population

An observational retrospective study was carried out at La Fe University Hospital from November 2018 to May 2022. Subjects were eligible to participate in this study if they met all of the following inclusion criteria: (a) children under 12 years of age attended at the Pediatric Department; (b) accurate diagnosis of immunodeficiency, family medical history or conditions affecting the immune system that suggest the presence of an immunodeficiency disorder (recurrent infections, need of parenteral antibiotics, unusual severity, difficult recovery, or uncommon etiologic pathogens); and (c) standard complete vaccination schedule (3 doses) with the PCV13.

Subjects were ineligible to participate in this study if they met any of the following exclusion criteria: (a) other pneumococcal vaccination schedule (PPSV23, PCV7, PCV10, PCV20 or different dose number of PCV13); and (b) the patient was ever diagnosed of invasive/non-invasive pneumococcal infection based on La Fe University Hospital medical records. The clinical information on the pneumococcal vaccination coverage of the patients was obtained from the Nominal Vaccine Registry (NVR) as registered by the Conselleria de Sanitat of the Generalitat Valenciana. The database included patient demographics, clinical (i.e., ID, IT) and analytical data: (a) titers of anti-PnPs IgG; (b) serum levels of IgA, IgM, IgG, and IgG subclasses; (c) leukocytes and neutrophils count; and (d) lymphocyte subsets (CD3 + T, CD4 + T, CD45 + T, CD8 + T, CD19 + B and CD56 + /CD16 + NK).

Patient grouping

The patients were assigned into 4 groups according to their immunodeficiency disorder following the European Society for Immunodeficiencies (ESID) guidelines [3]: Primary immunodeficiency disease (PID): patients with confirmed PID diagnosis; Secondary immunodeficiency disease (SID): patients with confirmed SID diagnosis (malignancies, spleen functional disorders or IT); Mixed immunodeficiency disorder (MID): patients with confirmed PID diagnosis in combination with IT; and Possible immunodeficiency disorder (POID): patients under observation for suspected immunodeficiency due to recurrent infections, unusual severity, or uncommon etiologic pathogens.

Syndromic PID are disorders in which not only the immune system but also other organ systems are affected. In our study, these specific illnesses are included in PID and MID groups [13].

ELISA assays

Serum samples were collected at least 4–6 weeks post vaccination. The VaccZyme™ Anti-PCP IgG Enzyme Immunoassay Kit (The Binding Site Group, Birmingham, UK) was used to assess anti-PnPs IgG titers, according to the manufacturer's instructions. ELISA plates were coated with PnPs antigens (1–5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F, 33F), and antibodies against the 23 serotypes were measured simultaneously in the same determination. Patients were classified following the Binding Site Group recommendations into responders (anti-PnPs IgG > 50 mg/L) and low-responders (anti-PnPs IgG ≤ 50 mg/L) [14, 15].

Analyses of immunoglobulins leukocytes and neutrophils count

The methods performed for the analyses were: immunoturbidimetry for IgA, IgM, and IgG (Abbot® Alinity c), nephelometry for IgG subclasses (Siemens BNII® human IgGSc assay) and flow cytometry for leukocytes and neutrophils count (SYSMEX® XN-Series). All procedures were carried out according to the manufacturer's instructions [16].

Flow cytometry analyses of lymphocyte subsets

Peripheral blood was obtained in EDTA tubes and was processed by flow cytometry within 24 h from collection. Lymphocyte populations (CD3 + T, CD4 + T, CD45 + T, CD8 + T, CD19 + B and CD56 + /CD16 + NK) were stained using BD Multitest 6-color TBNK reagent (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) following the sample processing protocol recommended by the manufacturer in a FACSCanto-II or a FACSLytic flow cytometer and automatically analyzed using FACSCanto or FACSSuite Clinical software, respectively. Briefly, peripheral blood was stained using a cocktail of monoclonal antibodies fluorochrome-conjugated (CD3-FITC, CD16-PE, CD56-PE, CD45-PerCPy5.5, CD4-PECy7, CD19-APC, CD8-APCCy7) and incubated in BD TruCount™ tubes for 15 min in the dark at room temperature. Then, samples were hemolyzed using BD FACSLysing solution (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) for 15 min in the dark at room temperature. After these steps, samples were acquired in the flow cytometer within 1 h. The results of the percentages and absolute counts of the lymphocyte populations were obtained from the Laboratory Information Systems [17, 18].

Statistical analysis

Results were analyzed using the “ClickR” package (v0.4.3.2) and the SPSS V21.0. Statistical software (SPSS

Inc, Chicago, IL, USA). Student's *t* test and ANOVA were used as parametric methods; and Mann–Whitney and Kruskal–Wallis as non-parametric statistical tests. Fisher's exact test was used to compare the categorical variables. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Ethics statements

Patient recruitment and sampling procedures were performed in accordance with the Helsinki Declaration and applicable local regulatory requirements and laws after approval from the Ethics Committee of the Health Research Institute Hospital La Fe.

Results

Study population

A total of 93 children were initially recruited; however, 6 of them were excluded due to a previous pneumococcal infection, since our study focuses on measuring immune response of PCV13. In this sense, 87 of these meeting the defined inclusion criteria.

PCV13 response according to the immunodeficiency disorder

PID was the most common disorder (45 patients) followed by POID (19), SID (15) and MID (8). Demographic characteristics, anti-PnPs IgG titers and PCV13 response of the 87 enrolled patients classified according to the patient grouping are summarized in Table 1. The median age was 3

Table 1 Demographic characteristics and response to PCV13 of patients classified according to their diagnosis group

Diagnosis group	<i>n</i>	Median age (Q25–Q75)	Male/female	Anti-PCP IgG (mean $\pm$ SD)	Responders/no responders
Primary immunodeficiency disease (PID)	45	3.35 (1.83–5.91)	28/17	72.34 $\pm$ 65.48	21/24
Autoinflammatory diseases	1	4.50	0/1	28.72	0/1
Combined immunodeficiency	4	3.00 (1.98–5.46)	4/0	148.55 $\pm$ 68.26	4/0
Complement deficiencies	2	3.87	2/0	50.45 $\pm$ 14.07	1/1
Congenital phagocytes disorders	5	1.92 (1.12–4.08)	1/4	52.67 $\pm$ 78.08	1/4
Hypogammaglobulinemia	11	4.41 (2.25–6.16)	7/4	69.67 $\pm$ 64.13	6/5
Innate immunity disorders	1	6.16	0/1	84.48	1/0
Syndromic PID ^a	21	3.00 (1.76–5.80)	14/7	67.71 $\pm$ 63.44	8/13
Secondary immunodeficiency disease (SID)	15	2.96 (1.60–5.70)	13/2	79.54 $\pm$ 70.95	7/8
Immunosuppressive therapy	11	3.04 (1.52–5.68)	10/1	83.22 $\pm$ 71.28	7/4
Acute myeloid leukemia	1	6.5	1/0	17.9	0/1
Spleen functional disorder	3	2.41 (2.16–2.58)	2/1	16.67 $\pm$ 14.56	0/3
Mixed immunodeficiency disorder (MID)	8	3.25 (1.42–5.33)	5/3	6.26 $\pm$ 7.36	0/8
Severe combined immunodeficiency	2	0.87	0/2	0.36 $\pm$ 0.42	0/2
Congenital phagocyte disorders	1	10.41	1/0	2.88	0/1
Hypogammaglobulinemia	2	4.12	2/0	12.42 $\pm$ 9.35	0/2
Innate immunity disorders	1	1.41	1/0	3.02	0/1
Syndromic PID ^b	2	3.41	1/1	9.34 $\pm$ 10.27	0/2
Possible immunodeficiency disorder (POID)	19	2.42 (1.41–4.33)	11/8	90.77 $\pm$ 94.76	12/7
Respiratory recurrent infections	10	2.66 (1.41–4.66)	6/4	94.82 $\pm$ 94.10	7/3
Skin recurrent infections	4	3.87 (1.68–5.16)	2/2	48.02 $\pm$ 43.10	2/2
Mixed recurrent infections (respiratory + skin)	1	3.41	0/1	4.03	0/1
Others	4	3.20 (1.47–4.66)	3/1	42.80 $\pm$ 39.41	3/1
Total patients	87	3 (1.50–5.33)	57/30	67.82 $\pm$ 69.90	40/47

Q25 first quartile, Q75 third quartile, SD Standard deviation.

^aSyndromes included in syndromic PID: Chediak–Higasi (1), DiGeorge (7), Hereditary spherocytosis (1), Hyper-IgE (3), MECP2 duplication (1), Osler–Weber–Rendu (1), Sickle cell anemia (2), Brainbridge–ropers (1), Thrombocytopenia (4). ^bSyndromes included in syndromic PID: Evans (1), Hyper-IgE (1).

(1.50–5.33) years, 65% of patients were male, and deficient production of anti-PnPs IgG (titer ≤ 50 mg/L) was detected in 47 patients (54%).

Patients from the PID group presented the highest level of anti-PnPs IgG (90.77 ± 94.76 mg/L), whereas the lowest was found in the MID group (6.26 ± 7.36 mg/L). The vaccine response was compared according to age and sex, and no statistically significances were found.

The means of anti-PnPs IgG titers of the 4 groups were compared and statistically significant differences were found ($p=0.013$), as is represented in Fig. 1. The lowest rate of antibody response was found in MID group, since none of these patients achieved protective levels of anti-PnPs IgG.

Relationship between immune system components levels with PCV13 response

In responder patients, the mean of leukocytes, neutrophils and lymphocytes subsets levels was higher in all cases except for CD19 + B lymphocytes. Statistically significant differences were found for CD4 + T lymphocytes ($p=0.372$), CD8 + T lymphocytes ($p=0.014$) and CD56 + /CD16 + NK ($p=0.016$). Figure 2 represents level of leukocytes, neutrophils, and lymphocytes subsets of the 87 patients classified in PCV13 responders (anti-PnPs IgG > 50 mg/L) and low-responders (anti-PnPs IgG ≤ 50 mg/L).

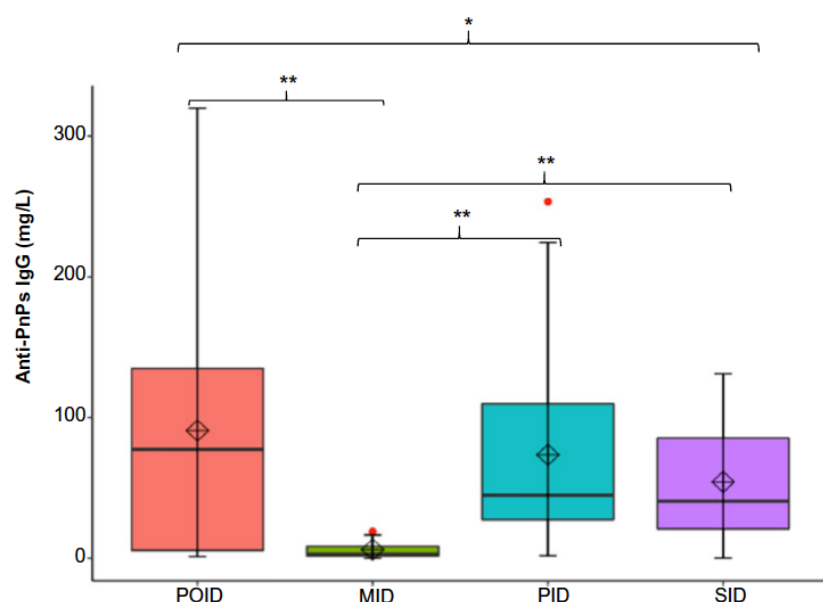
Second, patients were classified in 3 groups (low, normal, and high) according to their serum levels for immunoglobulins and immune system cells, compared with age-matched reference intervals [19, 20]. Figure 3 shows anti-PnPs IgG

levels achieved in these 3 groups. In the low range patients, the mean of anti-PnPs IgG titers achieved was lower in all cases except for CD8 + lymphocytes, IgA and IgG4. Statistically significant differences were found among 3 groups for CD4 + T and CD3 + T lymphocytes ($p=0.014$ and 0.023 , respectively) with greater anti-PnPs IgG levels in the high range patients.

Patients with specific therapy for immunodeficiency disorder

Seven patients, with serious underlying pathologies, required specific immunodeficiency therapy: four within IRT and three within bone marrow transplantation (BMT). Table 2 shows demographic and clinical characteristics, anti-PnPs IgG titers, diagnosis group classification, and levels of immune system components of them. These patients presented worse PCV13 response (22.09 ± 26.14 vs 68.61 ± 69.92 , $p=0.03$) mg/L. Only two patients without IT achieved anti-PnPs IgG protective level (> 50 mg/L). Corticosteroids were the immunosuppressive drug more frequently used (3/5) followed by corticosteroids in combination with cyclosporine (1/5) and other combinations (etoposide + cytarabine + mitoxantrone) (1/5). More than half of the patients required prophylactic anti-infective therapy (5/7). Antibacterials were the prophylactic therapy more frequently used (5/5), especially cotrimoxazole as prophylaxis against *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (4/5). The totality of BMT patients (including patient #4) required

Fig. 1 Anti-PnPs IgG titers achieved according to the immunodeficiency disorder. Box plots showing anti-PnPs IgG titers of the patients included in the study, classified according to the immunodeficiency disorder, determined by ELISA. *POID* possible immunodeficiency disorder; *MID* mixed immunodeficiency disorder; *PID*, primary immunodeficiency disease; *SID* secondary immunodeficiency disease. Black line and rhombus inside box plots represent the median and mean values, respectively. Outliers are represented as red points. * p value < 0.05 ; ** p value < 0.01



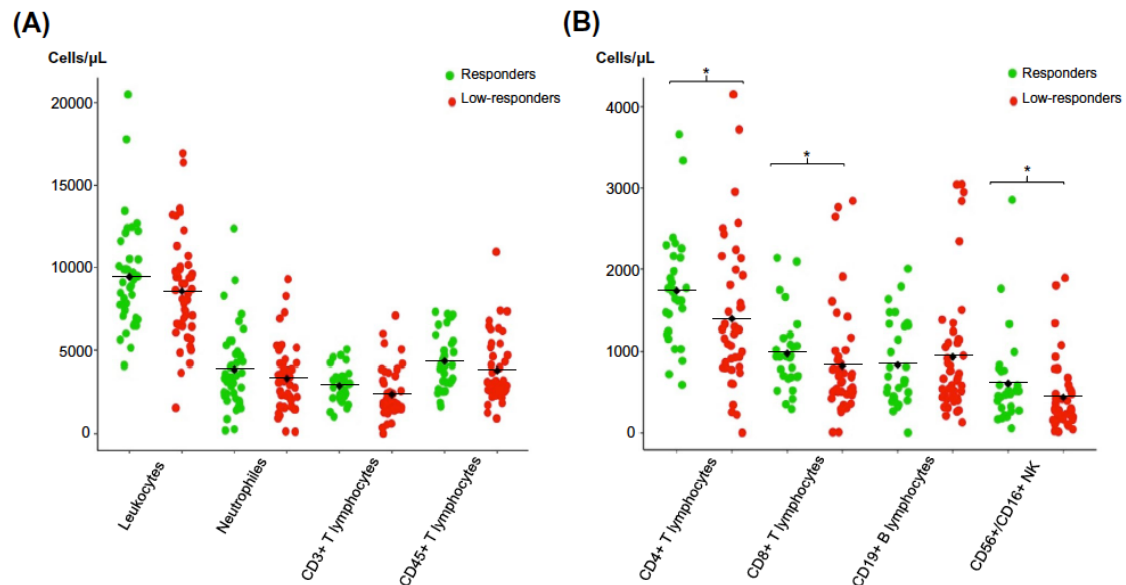


Fig. 2 Correlation between immune system cells levels and PCV13 response. Dot plots showing patient's leukocytes, neutrophils and lymphocyte population (CD3+T, CD45+T, CD4+T, CD8+T, CD19+B and CD56+/CD16+NK), classified according to PCV13

response. Low-responders (red) and responders (green). Black lines inside the dot plot represent the mean value. * p value < 0.05 . Data are shown in two graphs for convenience of interpretation

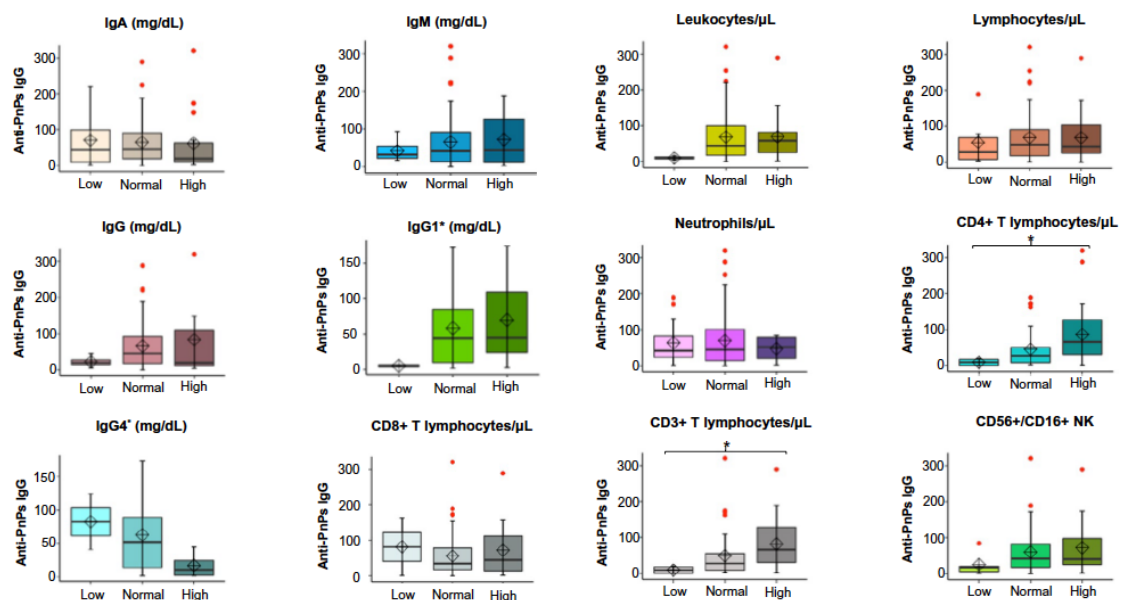


Fig. 3 Anti-PnPs IgG titers according to the reference ranges of immunoglobulins and immune system cells levels. Anti-PnPs IgG serum titers in patients included in the study, classified according to the reference ranges of immunoglobulins and immune system cells

levels (low, normal, high). Black lines and rhombus inside each box plot represent the median and mean value, respectively. Outliers are represented as red points. *IgG4 and IgG1 levels were measured only in 34 patients. * p value < 0.05

Table 2 Clinical and analytical characteristics of patients who received specific therapy for their immunodeficiency

Treatment	Patient	Age (years)/sex	Diagnosis group	Anti-PnPs IgG (mg/L)	Complications (episodes/year)	Anti-infective prophylactic therapy	IT	IgA	IgM	CD4+T	CD3+T	CD19+B	NK
SCIg (IRT)	#1	6.00 /male	MID	16.60	3 ± 1.73	Yes	Yes	86	28*	224*	616*	278*	23*
	#2	2.91/male	PID	50.40	1.5 ± 0.71	No	No	97	152	1032	2249	384	516
	#3	7.41/male	PID	66.12	1	No	No	5*	5*	1766	2802	4*	478
	#4	0.91/female	MID	0.06	3	Yes	Yes	35	41	343*	372*	3040	214
BMT	#5	0.83/female	MID	0.66	3	Yes	Yes	10	20	3*	10*	2838	15*
	#6	10.41/male	MID	2.88	4.16 ± 1.83	Yes	Yes	393	207	2952	5994	131	107
	#7	6.5/male	SID	17.9	2.50 ± 2.50	Yes	Yes	80	82	1158	1882	438	421

SCIg subcutaneous immunoglobulin, IRT immunoglobulin replacement therapy, BMT bone marrow transplantation

*Low levels according to the patients' age. Clinical data of the patients is provided in supplementary material (eTable 2)

cotrimoxazole prophylaxis. Antivirals and antifungals were used only in BMT patients (including patient #4).

Discussion

The prevalence of immunodeficiency disorders has been increasing in recent years, among other causes, due to the improvement of their diagnosis. Clinicians must maintain a high index of suspicion for ID in pediatric patients. Instead, timely recognition of these conditions followed by appropriate testing and referral to an immunology specialist remains indispensable to provide optimal health and well-being for these children [3].

Serologic methods used to measure pneumococcal vaccines response are important in evaluation of vaccine efficacy as well as in the diagnosis of immune deficiency disorders. Combination of pneumococcal antibodies titers measure (by ELISA methodology) with opsonic phagocytosis has become a useful tool for evaluating immunogenicity [21]. WHO ELISA (serotype-specific IgG assay) was used extensively in evaluation and licensure of pneumococcal vaccines, particularly conjugate vaccines in children. However, use of this ELISA in the clinical routine is impractical because the assay must be performed many times to measure individual serotypes response [22, 23]. For this purpose, we focus on the total vaccine anti-PnPs IgG titers as an important component of the diagnostic evaluation of immunodeficiency disorders since it is a relatively easy test to perform although pre/post-immunization antibody titers measurement after pneumococcal polysaccharide vaccine is the definitive method to evaluate antibody production [8].

In our cohort, PID is the most common disorder, coinciding with other series, which show prevalence rates as 1 in 2,000 for children [24, 25]. The role of immunodeficiency in the PCV13 response is essential since ID patients, with qualitative and quantitative antibody defects, achieve lower pneumococcal antibody titers than healthy children [26, 27]. Thus, immunization may result in scarce or no protection. In our study, 54% of patients present a poor PCV13 response despite fully vaccination, these high values are in agreement with other published series [28, 29]. To highlight, in MID group, none of the patients reach protective anti-PnPs IgG titers. This finding could be due to the immunosuppressant medication used in these patients which would explain the immunological hyper-responsiveness phenomenon, as it has been found in other cohorts and with other vaccines (i.e., hepatitis A and B, influenza, meningococcal) [30–35]. Overall, the immuno-suppressors block the clonal expansion of specific T and B cells and, consequently, antibodies are produced in lower amount and quality. In this sense, frequent booster immunizations are required in immunosuppressed

since duration of vaccine protection is shorter than in healthy children [32, 35].

Protection induced by vaccination is mediated through a complex interplay among innate, humoral, and cell-mediated immunity. First, innate immune cells are rapidly recruited to the place of shot inoculation. Second, activation of adaptive immune cells (T and B cells) occurs, which results in the formation of effector and memory cells [36, 37]. Therefore, patients with low counts or dysfunction of immune system components should produce a poor-quality vaccine response, as in our cohort [38], where neutrophils, leukocytes, and lymphocytes subsets means are higher in PCV13 responders with statistically significant differences in CD4+/CD8+ T lymphocytes and CD56+/CD16+ NK, which are main effectors of vaccine response, CD4+ T specially for conjugate vaccines [39].

Additionally, we have obtained similar findings when evaluating the PCV13 response in patients with low serum levels of immune system components (compared with age-matched reference intervals). In the low reference range patients, the mean of anti-PnPs IgG titers achieved is lower in all cases except for IgA, CD8+ T lymphocytes, and especially for IgG4. However, differences in pneumococcal antibody levels between low and normal/high range patients are minimum, except for IgG4. Interestingly, we found inverse relationship between PCV13 response and IgG4 levels since none of high IgG4 reference range patients achieve protective anti-PnPs IgG titers. The IgG subclasses exhibit different functional activities. Specifically, the IgG4 presents the lowest serum level and is the only subclass that fails to fix complement [40]. Recent studies suggest that IgG4 would be presumably involved in aberrant inflammatory response that could be cause of IgG4-related disease (IgG4-RD) or IgG4-associated cholangitis and autoimmune pancreatitis [41, 42]. There were also reports of IgG4-RD concurrent with pancreatic cancer and colon carcinoma. Opposite, other studies suggest an anti-inflammatory and tolerance-inducing IgG4 effect [43]. Therefore, IgG4 plays both pathogenic and protective role in the immune response. Thus, future researches with larger cohorts are required to understand the involvement of this immunoglobulin in vaccine response, which remains largely unknown.

Infectious complications should be minimized as much as possible, and appropriate treatment with IRT or BMT in combination with anti-infective prophylaxis are some of the most commonly therapeutic approaches [44]. In our study, seven patients required specific treatment for immunodeficiency disorder, which are more like to have clinical complications and poorer outcomes. They presented worse PCV13 response, especially in patients with IT since any of them achieved protective pneumococcal antibody levels. Additionally, four of them presented low counts of immune system components compared to age-reference ranges.

Thus, poor-quality pneumococcal vaccine response in these patients is expected [3, 45, 46].

Limitations of the present study include the relatively small number of patients recruited and the heterogeneity of immunodeficiency disorders. Nevertheless, we try to reflect the current situation in pediatric immunology units in which different immunological disorders are diagnosed routinely. Total anti-PnPs IgG titers measure provides a fast and valuable tool for evaluate the response to pneumococcal vaccine and could be use, with other clinical data, to determine impaired host immunity. Next phase of our research would be the measurement of post-immunization antibody levels after booster shoot for a more complete immunological study of our patients. Definitively, this research opens new perspectives in the pneumococcal vaccine immunogenicity research in patients with immunodeficiency disorders.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00430-022-00759-0>.

Funding NonE.

Declarations

Conflict of interest NonE.

Trial registration Not applicable.

References

1. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Chatila T, Cunningham-Rundles C, Etzioni A et al (2020) Human inborn errors of immunity: 2019 update on the classification from the international union of immunological societies expert committee. *J Clin Immunol* 40(1):24–64. <https://doi.org/10.1007/s10875-019-00737-x>
2. Modell V, Knaus M, Modell F, Roifman C, Orange J, Notarangelo LD (2014) Global overview of primary immunodeficiencies: a report from Jeffrey Modell centers worldwide focused on diagnosis, treatment, and discovery. *Immunol Res* 60(1):132–144. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8498-z>
3. Brodzski N, Frazer-Abel A, Grumach AS, Kirschfink M, Litzman J, Perez E et al (2020) European society for immunodeficiencies (ESID) and European reference network on rare primary immunodeficiency, autoinflammatory and autoimmune diseases (ERN RITA) complement guideline: deficiencies, diagnosis, and management. *J Clin Immunol* 40(4):576–591. <https://doi.org/10.1007/s10875-020-00754-1>
4. Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C (2012) Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood* 119(7):9. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-377945>
5. van Wilder P, Odnoletkova I, Mouline M, de Vries E (2021) Immunoglobulin replacement therapy is critical and cost-effective in increasing life expectancy and quality of life in patients suffering from common variable immunodeficiency disorders (CVID): A health-economic assessment. *PLoS ONE* 16(3):e0247941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247941>
6. Chinn IK, Orange JS (2019) Immunodeficiency disorders. *Pediatr Rev* 40(5):229–242. <https://doi.org/10.1542/pir.2017-0308>

7. Capolunghi F, Cascioli S, Giorda E, Rosado MM, Plebani A, Auriti C et al (2008) CpG drives human transitional b cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *J Immunol* 180(2):800–808. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.2.800>
8. Oliveira JB, Fleisher TA (2010) Laboratory evaluation of primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 125(2):S297–S305. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.08.043>
9. Pulvirenti F, Milito C, Cavaliere FM, Mezzaroma I, Cinetto F, Quinti I (2020) IGA antibody induced by immunization with pneumococcal polysaccharides is a prognostic tool in common variable immune deficiencies. *Front Immunol* 11:1283. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01283>
10. Cavaliere FM, Milito C, Martini H, Schlesier M, Dräger R, Schütz K et al (2013) Quantification of IgM and IgA anti-pneumococcal capsular polysaccharides by a new ELISA assay: a valuable diagnostic and prognostic tool for common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 33(4):838–846. <https://doi.org/10.1007/s10875-012-9856-z>
11. Conley ME, Dobbs AK, Farmer DM, Kilic S, Paris K, Grigoriadou S et al (2009) Primary B cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts. *Annu Rev Immunol* 27:199–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132649>
12. Álvarez García FJ, Cilleruelo Ortega MJ, Álvarez Aldeán J, Garcés-Sánchez M, Garrote Llanos E, Iofrio de Arce A et al (2022) Immunization schedule of the pediatric spanish association: 2022 recommendations. *Anales de Pediatría (English Edition)* 96(1):59.e1–59.e10. <https://doi.org/10.1016/j.anpede.2021.11.002>
13. Kersseboom R, Brooks A, Weemaes C (2011) Educational paper: syndromic forms of primary immunodeficiency. *Eur J Pediatr* 170(3):295–308. <https://doi.org/10.1007/s00431-011-1396-7>
14. Schauer U, Stemberg F, Rieger CHL, Büttner W, Borte M, Schubert S et al (2003) Levels of antibodies specific to tetanus toxoid, *Haemophilus influenzae* type b, and pneumococcal capsular polysaccharide in healthy children and adults. *Clin Vaccine Immunol* 10(2):202–207. <https://doi.org/10.1128/CDLI.10.2.202-207.2003>
15. Parker AR, Allen S, Harding S (2016) Concentration of anti-pneumococcal capsular polysaccharide IgM, IgG and IgA specific antibodies in adult blood donors. *Pract Lab Med* 5:1–5. <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2016.02.004>
16. Jang JH, Woo SD, Lee Y, Shin YS, Ye YM, Park HS (2021) Establishment of reference intervals of serum immunoglobulins in healthy korean adults. *Allergy Asthma Immunol Res* 13(4):671–674. <https://doi.org/10.4168/aaair.2021.13.4.671>
17. Tembe N, Joaquim O, Alfai E, Siteo N, Viegas E, Macovela E et al (2014) Reference values for clinical laboratory parameters in young adults in Maputo, Mozambique. *PLoS ONE* 9(5):e97391
18. Das Gupta A, Ochani Z (2006) Single platform enumeration of lymphocyte subsets in healthy Indians aged between 18 and 49 years. *Cytometry B Clin Cytom* 70:361–362
19. Tosato F, Bucciol G, Pantano G, Putti MC, Sanzari MC, Basso G et al (2015) Lymphocytes subsets reference values in childhood: lymphocytes subsets reference values in childhood. *Cytometry* 87(1):81–85. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22520>
20. García-Prat M, Vila-Piñón G, Martos Gutierrez S, Gala Yerga G, García Guantes E, Martínez-Gallo M et al (2018) Age-specific pediatric reference ranges for immunoglobulins and complement proteins on the Optilite™ automated turbidimetric analyzer. *J Clin Lab Anal* 32(6):e22420. <https://doi.org/10.1002/jcla.22420>
21. Hu BT, Yu X, Jones TR, Kirch C, Harris S, Hildreth SW et al (2005) Approach to validating an opsonophagocytic assay for *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Vaccine Immunol* 12(2):287–295. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.2.287-295.2005>
22. Jódar L, Butler J, Carlone G, Dagan R, Goldblatt D, Käyhty H et al (2003) Serological criteria for evaluation and licensure of new pneumococcal conjugate vaccine formulations for use in infants. *Vaccine* 21(23):3265–3272. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00230-5](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00230-5)
23. LaFon DC, Nahm MH (2018) Measuring immune responses to pneumococcal vaccines. *J Immunol Methods* 461:37–43. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.08.002>
24. Boyle JM, Buckley RH (2007) Population prevalence of diagnosed primary immunodeficiency diseases in the United States. *J Clin Immunol* 27(5):497–502. <https://doi.org/10.1007/s10875-007-9103-1>
25. Abolhassani H, Azizi G, Sharifi L, Yazdani R, Mohsenzadegan M, Delavari S et al (2020) Global systematic review of primary immunodeficiency registries. *Expert Rev Clin Immunol* 16(7):717–732. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2020.1801422>
26. Robbins A, Bahuaud M, Hentzien M, Maestruggi Q, Barbe C, Giusti D et al (2021) The 13-valent pneumococcal conjugate vaccine elicits serological response and lasting protection in selected patients with primary humoral immunodeficiency. *Front Immunol* 12:697128. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.697128>
27. Pittet LF, Posfay-Barbe KM (2021) Vaccination of immune compromised children—an overview for physicians. *Eur J Pediatr* 180(7):2035–2047. <https://doi.org/10.1007/s00431-021-03997-1>
28. Froneman C, Kelleher P, José RJ (2021) Pneumococcal vaccination in immunocompromised hosts: an update. *Vaccines* 9(6):536. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060536>
29. Le Ng X, Alikhan M, Stark JM, Mosquera RA, Shahruxh Hashmi S, Gonzales T et al (2019) Comparison of pneumococcal vaccination response in children with sickle cell disease: HbSS and HbSC. *Allergol Immunopathol* 47(6):564–569. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2019.04.003>
30. Kuronuma K, Takahashi H (2019) Immunogenicity of pneumococcal vaccines in comorbid autoimmune and chronic respiratory diseases. *Hum Vaccin Immunother* 15(4):859–862. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1564443>
31. van Aalst M, Langedijk AC, Spijker R, de Bree GJ, Grobusch MP, Goorhuis A (2018) The effect of immunosuppressive agents on immunogenicity of pneumococcal vaccination: a systematic review and meta-analysis. *Vaccine* 36(39):5832–5845. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.07.039>
32. Ergüven M, Kaya B, Hamzah OY, Tufan F (2011) Evaluation of immune response to hepatitis a vaccination and vaccine safety in juvenile idiopathic arthritis. *J Chin Med Assoc* 74(5):205–208. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2011.03.004>
33. Aikawa NE, Campos LM, Goldenstein-Schainberg C, Saad CG, Ribeiro AC, Bueno C et al (2013) Effective seroconversion and safety following the pandemic influenza vaccination (anti-H1N1) in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Scand J Rheumatol* 42(1):34–40. <https://doi.org/10.3109/03009742.2012.709272>
34. van den Bossche WBL, Rykov K, Teodosio C, ten Have BLEF, Knobben BAS, Sietsma MS et al (2018) Flow cytometric assessment of leukocyte kinetics for the monitoring of tissue damage. *Clin Immunol* 197:224–230. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.09.014>
35. Blanchard-Rohner G (2021) Vaccination in children with autoimmune disorders and treated with various immunosuppressive regimens: a comprehensive review and practical guide. *Front Immunol* 12(12):711637. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.711637>
36. Liang F, Loré K (2016) Local innate immune responses in the vaccine adjuvant-injected muscle. *Clin Trans Immunol* 5(4):e74. <https://doi.org/10.1038/cti.2016.19>
37. Zimmermann P, Curtis N (2019) Factors that influence the immune response to vaccination. *Clin Microbiol Rev* 32(2):e00084–e118. <https://doi.org/10.1128/CMR.00084-18>
38. Gonzalez-Rodriguez AP, Contesti J, Huergo-Zapico L, Lopez-Soto A, Fernández-Guizán A, Acebes-Huerta A et al (2010) Prognostic significance of CD8 and CD4 T cells in chronic

- lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 51(10):1829–1836. <https://doi.org/10.3109/10428194.2010.503820>
39. Furuya Y, Kirimanjeswara GS, Roberts S, Racine R, Wilson-Welder J, Sanfilippo AM et al (2017) Defective anti-polysaccharide IgG vaccine responses in IgA deficient mice. *Vaccine* 35(37):4997–5005. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.07.071>
 40. Schroeder HW, Cavacini L (2010) Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 125(2):S41–S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
 41. Zen Y (2020) Pathological characteristics and diagnosis of IgG4-related disease. *La Presse Médicale* 49(1):104014. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2020.104014>
 42. Maslinska M, Dmowska-Chalaba J, Jakubaszek M (2022) The role of IgG4 in autoimmunity and rheumatic diseases. *Front Immunol* 25(12):787422. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.787422>
 43. Castagnoli R, Delmonte OM, Calzoni E, Notarangelo LD (2019) Hematopoietic stem cell transplantation in primary immunodeficiency diseases: current status and future perspectives. *Front Pediatr* 7:295. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00295>
 44. Trampert DC, Hubers LM, van de Graaf SFJ, Beuers U (1864) 2018 On the role of IgG4 in inflammatory conditions: lessons for IgG4-related disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 4:1401–1409. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2017.07.038>
 45. Sánchez-Ramón S, Bermúdez A, González-Granado LI, Rodríguez-Gallego C, Sastre A, Soler-Palacín P et al (2019) Primary and secondary immunodeficiency diseases in oncohaematology: warning signs, diagnosis, and management. *Front Immunol* 10:586. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00586>
 46. Olsson RF, Hagelberg S, Schiller B, Ringdén O, Truedsson L, Åhlin A (2016) Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of human C1q deficiency: the Karolinska experience. *Transplantation* 100(6):1356–1362. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000975>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.



Supplementary information

eTable 2

#1: Evans syndrome + IT (prednisone oral 2mg/kg/day) + IRT (1g/kg, two doses/month) + amoxicillin clavulanic acid (if fever).

#2: Immune thrombocytopenia + IRT (0.8-1g/kg, two doses, short term use) + history of Epstein-Barr virus infection that required therapy with corticosteroids (iv metilprednisone 4 mg/kg/day).

#3: Congenital agammaglobulinemia + IRT (0.8/kg, four doses/month).

#4: Severe combined immunodeficiency + IRT (2.5g/kg/month), IT (budesonide inhalation suspension 0.5mg/day + Cyclosporine 3mg/kg/day + azithromycin (72mg/day, 3 days/week) + cotrimoxazole (80 mg/day, 3 days/week) + acyclovir (80mg/kg/day) + itraconazole (5mg/kg/day) + history of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and severe bronchospasm due to respiratory syncytial virus + waiting for BMT.

#5: Severe combined immunodeficiency + IT (prednisone oral 8 mg/kg/day) + ciprofloxacin (160mg/day) + cotrimoxazole (50 mg/day, 3 days/week) + voriconazole (180 mg/day) + history of cutaneous graft-versus-host disease.

#6: Chronic granulomatous disease + IT (prednisone oral 7.5 mg/kg/day) + amoxicillin clavulanic acid (500mg/day) + cotrimoxazole (40 mg/day, 3 days/week) + itraconazole (100 mg/day) + history of pulmonary aspergillosis + history of cutaneous graft-versus-host disease + Cytomegalovirus reactivation after hematopoietic stem cell.

#7: Acute myeloid leukemia + IT (etoposide + cytarabine + mitoxantrone) + cotrimoxazole (50 mg/day, 3 days/week).



OPEN

A surface plasmon resonance based approach for measuring response to pneumococcal vaccine

Marta Garrido-Jareño^{1,2,6}, Leonor Puchades-Carrasco^{1,6}, Leticia Orti-Pérez¹, José Miguel Sahuquillo-Arce², María del Carmen Meyer-García³, Joan Mollar-Maseres³, Carmina Lloret-Sos², Ana Gil-Brusola^{2,4}, José Luis López-Hontangas², José Manuel Beltrán-Garrido³, Javier Pemán-García^{2,4}✉ & Antonio Pineda-Lucena^{1,5}✉

Incidence of pneumococcal disease has increased worldwide in recent years. Response to pneumococcal vaccine is usually measured using the multiserotype enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) pneumococcal test. However, this approach presents several limitations. Therefore, the introduction of new and more robust analytical approaches able to provide information on the efficacy of the pneumococcal vaccine would be very beneficial for the clinical management of patients. Surface plasmon resonance (SPR) has been shown to offer a valuable understanding of vaccines' properties over the last years. The aim of this study is to evaluate the reliability of SPR for the anti-pneumococcal capsular polysaccharides (anti-PnPs) IgGs quantification in vaccinated. Fast protein liquid chromatography (FPLC) was used for the isolation of total IgGs from serum samples of vaccinated patients. Binding-SPR assays were performed to study the interaction between anti-PnPs IgGs and PCV13. A robust correlation was found between serum levels of anti-PnPs IgGs, measured by ELISA, and the SPR signal. Moreover, it was possible to correctly classify patients into "non-responder", "responder" and "high-responder" groups according to their specific SPR PCV13 response profiles. SPR technology provides a valuable tool for reliably characterize the interaction between anti-PnPs IgGs and PCV13 in a very short experimental time.

Streptococcus pneumoniae represents a public health hazard as it is the most common cause of bacterial pneumonia, especially in children, the elderly and immunosuppressed patients, and causes 1.6 million annual deaths worldwide¹. The severity, global nature of these infections and the emergence of antibiotic resistance makes vaccination a valuable health resource for prevention². However, the complexity of the data generated from serotype-specific assays, historical variations in the assessment of pneumococcal antibodies and cut-off points that define response difficult the interpretation of what constitutes an adequate response³. In addition, pneumococcal vaccines are commonly employed as a tool to functionally evaluate a patient's humoral immune response⁴; i.e., anti-pneumococcal antibodies (PnAb) are measured before and after vaccination in order to determine whether an appropriate response has occurred.

Different pneumococcal vaccines have been developed which differ in two fundamental characteristics: the number of serotypes represented in the vaccine and the antigenic nature of the pneumococcal materials used. Contrary to adults, for whom recent studies increasingly recommended routine vaccination, the childhood immunization schedule is well known and generally well implemented in developed countries⁵. Two pneumococcal vaccines are currently widely used worldwide: Pneumovax 23 (PPV23; Merck, West Point, Pa.), a 23-valent vaccine containing 23 pneumococcal capsular polysaccharides (PnPs) serotypes, and Prevnar 13 (PCV13; Wyeth, Philadelphia, PA.), a 13-valent conjugate vaccine containing 13 PnPs serotypes and a non-toxic variant of diphtheria toxin (diphtheria CRM197 protein) which transforms the T cell-independent polysaccharide vaccines to T cell-dependent antigenic vaccines that are much more immunogenic, allowing its use in children under two years⁶.

¹Drug Discovery Unit, Health Research Institute La Fe, Valencia, Spain. ²Microbiology Department, University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain. ³Preventive Medicine Department, University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain. ⁴Severe Infection Group, Health Research Institute Hospital La Fe, Valencia, Spain. ⁵Molecular Therapeutics Program, Center for Applied Medical Research, University of Navarra, Pamplona, Spain. ⁶These authors contributed equally: Marta Garrido-Jareño and Leonor Puchades-Carrasco. ✉email: pman_jav@gva.es; apinedal@unav.es

Vaccine response profile	N total	Age (years) (mean $\pm$ SD)	Anti-PnPs IgGs* (mg/L) (mean $\pm$ SD)
High responder	8	43.50 $\pm$ 14.25	352.42 $\pm$ 50.33
Responder	10	43.10 $\pm$ 10.05	143.99 $\pm$ 74.38
Non-responder	6	43.00 $\pm$ 14.57	25.71 $\pm$ 13.66

Table 1. Demographic characteristics of subjects included in the groups of study, classified according to their PCV13 response profile as determined by ELISA. SD Standard deviation. *Determined by ELISA.

Many methods have been used for the measurement of serotype-specific PnAb levels, the most common being the multiserotype anti-PnPs IgGs ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). This test allows the quantification of anti-PnPs IgGs for various serotypes of *S. pneumoniae* in only one determination. Limitations of this approach include the multiple reagents used, the high rate of false positive/negative results and the long experimental time required (about 2 h)^{7–11}.

Surface plasmon resonance (SPR) is an analytical technique that can provide a deeper characterization of the antibody-antigen interaction, very valuable for a better understanding of a patient's vaccine response. This experimental tool has greatly contributed to the research, development, and production of new vaccines in recent years^{12,13}. SPR is based on an optical phenomenon that occurs when polarized light is reflected by a surface coated with a fine layer of metal (e.g., gold or silver). The binding of biomolecules on the sensor surface results in a change in the refractive index, which can be measured as a change in resonance angle or resonance wavelength. Thus, one of the interacting molecules (ligand) is immobilized on the surface of a sensor chip while the other (analyte) is injected in solution, flowing over the sensor surface. The change in refractive index on the surface has a linear relationship with the number of molecules bound to the sensor surface¹⁴. Recent studies based in this technology have shown that SPR-based methods are sensitive enough to detect antigen-specific IgGs in the ng/uL range, providing information for differentiating the antibody responses of immunized patients^{15,16}. In a more recent study, Khurana et al. demonstrated the impact of repeated vaccinations on antibody-affinity maturation using this analytical approach^{17,18}. Based on these previous reports, the aim of this pilot study was to evaluate the potential of SPR for the quantification of anti-PnPs IgGs in serum of patients after PCV13 vaccination, with a focus on the feasibility of implementing this experimental approach in routine clinical practice.

Results

Immunization state. Demographic characteristics and classification of patients included in the study according to their vaccine response profile, based on their anti-PnPs IgGs levels (ELISA), are summarized in Table 1. No significant age differences were observed among groups (ANOVA test p value = 0.99).

Isolation of total IgG from serum samples. Albumin and other high-concentrated serum proteins were efficiently removed from serum samples before SPR analysis to avoid potential interferences resulting from non-specific binding (NSB) to the chip. Thus, higher specificity in the interaction between specific anti-PnPs IgGs present in the serum and PCV13 immobilized on the chip could potentially be achieved. The composition of the different elution fractions obtained after the purification was analysed by SDS-PAGE (Fig. 1). A broad and flattened peak was obtained for the flow-through fractions, containing albumin and other serum proteins not retained in the column, while a narrow peak, corresponding to IgGs enriched elutions was obtained after the purification.

Optimization of SPR binding assay conditions. SPR binding experiments were performed after PCV13 immobilization at 1730 RUs, following chip activation (Fig. 2). The performance of different acid and basic solutions (i.e., glycine pH 2–3.5, HCl, NaCl and NaOH at different concentrations) was evaluated for the optimal regeneration of the chip surface (data not shown). An optimal regeneration of the chip surface was obtained after a 30 s injection of a 50 mM NaOH and 1 M NaCl solution. The same baseline level before and after injection and reproducible SPR response even after numerous cycles was achieved following this protocol (Fig. 3). After optimization of an effective regeneration protocol, different sample dilutions were assayed to ensure minimal NSB and best signal-to-noise ratio. Thus, the choice of the optimal dilution to perform the SPR experiments was based on the analysis of the reproducibility and the dynamic range of the SPR signal.

Intra-dilution reproducibility was assessed based on the mean of the coefficient of variation (%CV) obtained for all the samples included in the study. Thereby, non-diluted samples (1:1) showed the highest intra-dilution variability (%CV = 15.40%), while it was below 10% for all assayed dilutions. Particularly, dilutions 1:8 and 1:16 exhibited the highest reproducibility, with %CVs of 4.20 and 3.90, respectively (Table 2). Regarding the dynamic range of 1:8 and 1:16 dilutions, the highest fold change between the SPR signal for the most and the less anti-PnPs IgGs concentrated samples included in the study, as determined by ELISA (429.13 mg/L and 8.65 mg/L, respectively), were achieved for the 1:16 diluted samples, as is shown in Table 2. Overall, dilution 1:16 showed the SPR response with the lowest NSB and best signal-to-noise ratio for clear differentiation between different anti-PnPs IgGs concentrations^{19,20}.

Based on these considerations, sample dilution 1:16 was selected as the best experimental condition, showing the most accurate and reproducible SPR results.

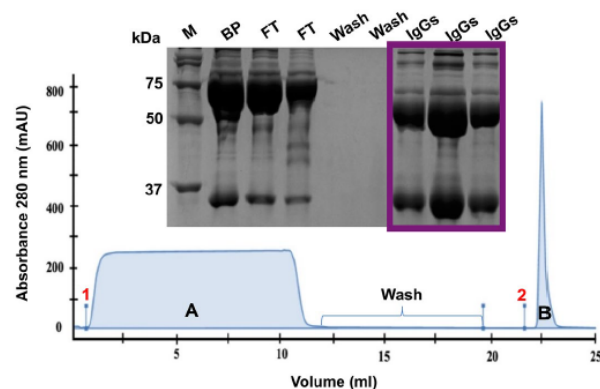


Figure 1. Total IgG isolation from serum samples following FPLC assay. Chromatogram corresponding to the interaction between serum proteins and HiTrap Protein G HP columns: (1) Diluted serum sample injection; (2) Glycine buffer injection. Peak A corresponds to the flow-through fractions, containing albumin and other serum proteins not retained in the column. Peak B (purple) corresponds to the elution fractions containing total IgGs present in serum samples. Peak composition was confirmed by SDS-PAGE 12% (top insert). M: Protein molecular weight marker; BP: Serum sample before purification, FT: flow through, containing albumin (66.5 kDa) and other serum proteins, IgGs: Elution fractions containing total IgGs present in serum samples (IgG's light and heavy chains, 25 and 50 kDa, respectively).

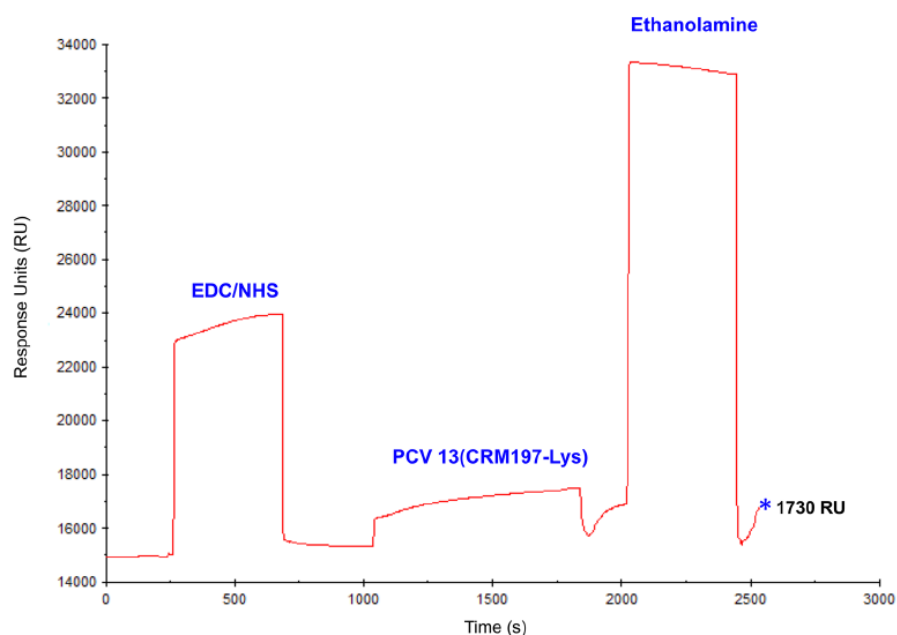


Figure 2. PCV13 immobilization using amine chemistry. Representative SPR sensorgram illustrating the steps of the immobilization process: (1) EDC/NHS were injected to activate the surface of the CM5 chip by modification of the carboxymethyl groups to N-Hydroxysuccinimide esters; (2) Diluted PCV13 was injected and immobilized in the chip surface by spontaneous reaction of the N-Hydroxysuccinimide esters in the chip surface with the amine groups of lysine residues present in PCV13's diphtheria CRM197 protein; (3) Ethanolamine was injected to block free activated carboxymethyl groups in the chip surface, preventing further unspecific bindings during the SPR experiments. Blue asterisk indicates total immobilization level obtained in the chip (1730 RU).

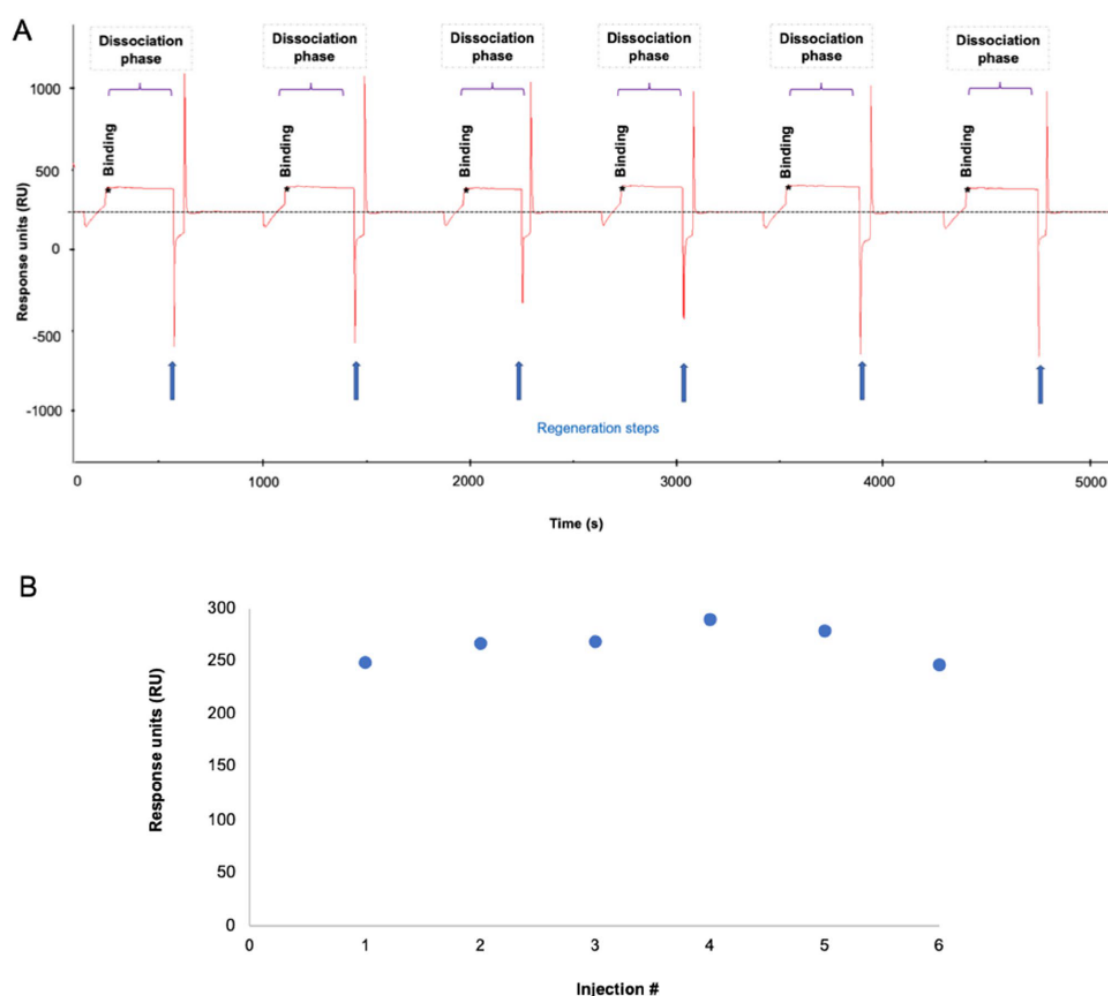


Figure 3. Efficacy of chip regeneration following repeated injections. (A) SPR sensorgrams of 6 consecutive injections for the same 1:8 diluted serum sample. Blue arrows indicate regeneration steps after each individual injection; (B) Graphical representation of SPR response obtained after each injection and its dependency with the injection number. * Binding report point refers to the maximum level of RU obtained after serum injection.

Sample dilution	Maximum SPR signal ^{a,*}	Minimum SPR signal ^{a,b}	FC ^{a,c}	%CV ^{a,d}
1:1	907.40	159.48	5.69	15.40
1:2	706.45	52.40	13.48	8.90
1:4	399.60	33.03	12.10	5.13
1:8	251.51	16.52	15.22	4.20
1:16	146.33	8.26	17.72	3.90
1:32	85.23	4.13	20.64	5.54

Table 2. Evaluation of different sample dilutions and effect on SPR parameters. *Values in Response Units (RU). ^aCorresponding to most anti-PnPs IgGs concentrated sample included in the study, as determined by ELISA (429.13 mg/L). ^bCorresponding to less anti-PnPs IgGs concentrated sample included in the study, as determined by ELISA (8.65 mg/L). ^cFold Change between the RU values of the maximum and minimum SPR signal determined for each sample dilution. ^dMean of the coefficient of variation between replicates for all samples included in the study.

Correlation between SPR response and anti-PnPs IgGs levels determined by ELISA. SPR binding profiles of subjects included in the study reflected patients' immunization state (Fig. 4). A robust correlation between the SPR response and the concentration of anti-PnPs IgGs determined by ELISA was found for all samples included in the study using the 1:16 dilution (Spearman's $\rho = 0.84$, p value = 0.001) (Fig. 5). Only samples with a serum anti-PnPs IgGs concentration below 270 mg/L, as determined by ELISA, were included in these analyses to avoid potential interferences due to the saturation of the ELISA signal. This strong correlation was also observed when analyzing all the different dilutions assayed during the study (Fig. S1). Moreover, the analysis of the linearity of the SPR signal within this dynamic range (Fig. S2) revealed a good linearity of the SPR response for the different sample dilutions analyzed in the study ($R^2 = 0.99$). Finally, statistically significant differences in SPR response were found between the groups of patients classified according to anti-PnPs IgGs levels determined by ELISA (Fig. 6; p value < 0.0001).

Discussion

Recent studies have described that SPR could become a relevant tool for the design and evaluation of vaccines for the clinical management of several infectious diseases, such as HIV and Hepatitis^{16,21,22}. However, to the best of our knowledge, our study demonstrates for the first time that SPR-based approaches may provide highly reliable and accurate measurements of serum anti-PnPs IgGs in a very short experimental time (2 min). Moreover, SPR assays could offer additional advantages in routine clinical practice over classic ELISA. Thus, it would be possible to regenerate the sensor and run over two hundred analytical samples using the same chip, which would also translate into a better cost-effectiveness ratio over commercial ELISA kits.

In this study, different experimental actions were taken to ensure minimal NSB and optimal signal-to-noise ratios in SPR experiments^{23–25}. First, a Protein G Sepharose High Performance FPLC method was used to purify serum total IgGs, as it was previously described^{26–28}. Then, taking advantage of amine groups of lysine residues present in PCV13's diphtheria CRM197 protein, amine coupling was chosen for PCV13 immobilization on a CM5 chip surface. Following this approach, a good PCV13 immobilization level was achieved. Moreover, this immobilization strategy facilitated the interaction between anti-PnPs IgGs present in the serum and the PCV13 immobilized in the chip, as no covalent bond is generated between PCV13 and the surface chip, ensuring accessibility to the active site²⁹. Finally, in order to test the reusability and durability of the bioactive surface, different regeneration conditions were evaluated. An effective regeneration protocol should remove anti-PnPs IgGs bound to PCV13, while PCV13 molecules remain immobilized in the chip surface. In fact, as shown in Fig. 3, an excellent recovery of the sensorgram baseline was obtained using an optimized chip regeneration protocol³⁰.

A robust correlation was also found when comparing the SPR response levels and the anti-PnPs IgGs concentration, as determined by ELISA, for all patients included in the study. A good sensitivity and optimal reproducibility levels were obtained when 1:16 diluted serum samples were used for the SPR experiments. The optimization of the assay conditions allowed the performance of SPR experiments without the need to saturate the ligand in order to get meaningful results. This result constitutes a relevant finding because higher analyte concentrations can give rise to multiphasic binding curves^{31,32}. Moreover, removal of non-specific IgGs from the chip was obtained by the continuous flow of buffer, as it is achieved with the washes during the ELISA tests^{31,32}. The 1:16 dilution of the samples provided the minimal variability in comparison with the other assayed sample dilutions. In particular, the highest variation between replicates, over 10%, was observed for samples diluted 1:1. A potential explanation for this finding could be that, at higher concentrations, IgGs could aggregate and bind to each other during the SPR binding experiment. This phenomenon would explain the differences found in the SPR signal when replicating this condition³¹. Overall, the 1:16 dilution was deemed optimal because it provided a wide dynamic range of SPR signals that could facilitate the discrimination of different anti-PnPs IgGs concentrations²⁰.

In summary, the interaction between anti-PnPs IgGs and PCV13 with a high specificity was successfully measured using a SPR-based approach. Furthermore, significant differences in the SPR binding profile of patients were found for patients classified according to their PCV13 response profile, as determined by serum anti-PnPs IgGs levels measured by ELISA. Although further investigations in larger cohorts of patients and using different pneumococcal vaccines are still needed, the results from this pilot study clearly show that SPR is a very valuable tool for measuring response to pneumococcal vaccine in the clinical practice.

Finally, most current pneumococcal vaccination schemes are based on repeated doses of the same vaccine to ensure the production of protective levels of IgGs, although some reports propose that natural infection may induce stronger and longer-lasting immunity than vaccines^{33,34}. Nowadays, several limitations difficult the interpretation of what constitutes an adequate vaccine response³. In future studies, SPR could represent a very promising tool for evaluating and measuring the effect of different vaccines and specific serotypes following different vaccination schemes, allowing to determine whether an appropriate response has been achieved.

Methods

Study design. A total of 24 patients were enrolled in this study at the Department of Preventive Medicine of the University and Polytechnic La Fe Hospital (Valencia, Spain). Serum samples were collected one month after vaccination with PCV13. Exclusion criteria included patients aged less than 18 years old, patients with previous pneumococcal infection, as well as those who had received a previous dose of PCV13 in the last 5 years. Recruitment and sampling procedures were performed in accordance with the Declaration of Helsinki, and after approval from the Ethics Committee of the Health Research Institute La Fe (IIS La Fe, Valencia, Spain). Written informed consent was obtained from each participant included in this study.

Quantification of serum anti-PnPs antibodies by ELISA. VaccZyme Anti-PCP IgG Enzyme Immunoassay Kit (The Binding Site Group, Birmingham, UK) was used to assess anti-PnPs IgG titers, according to

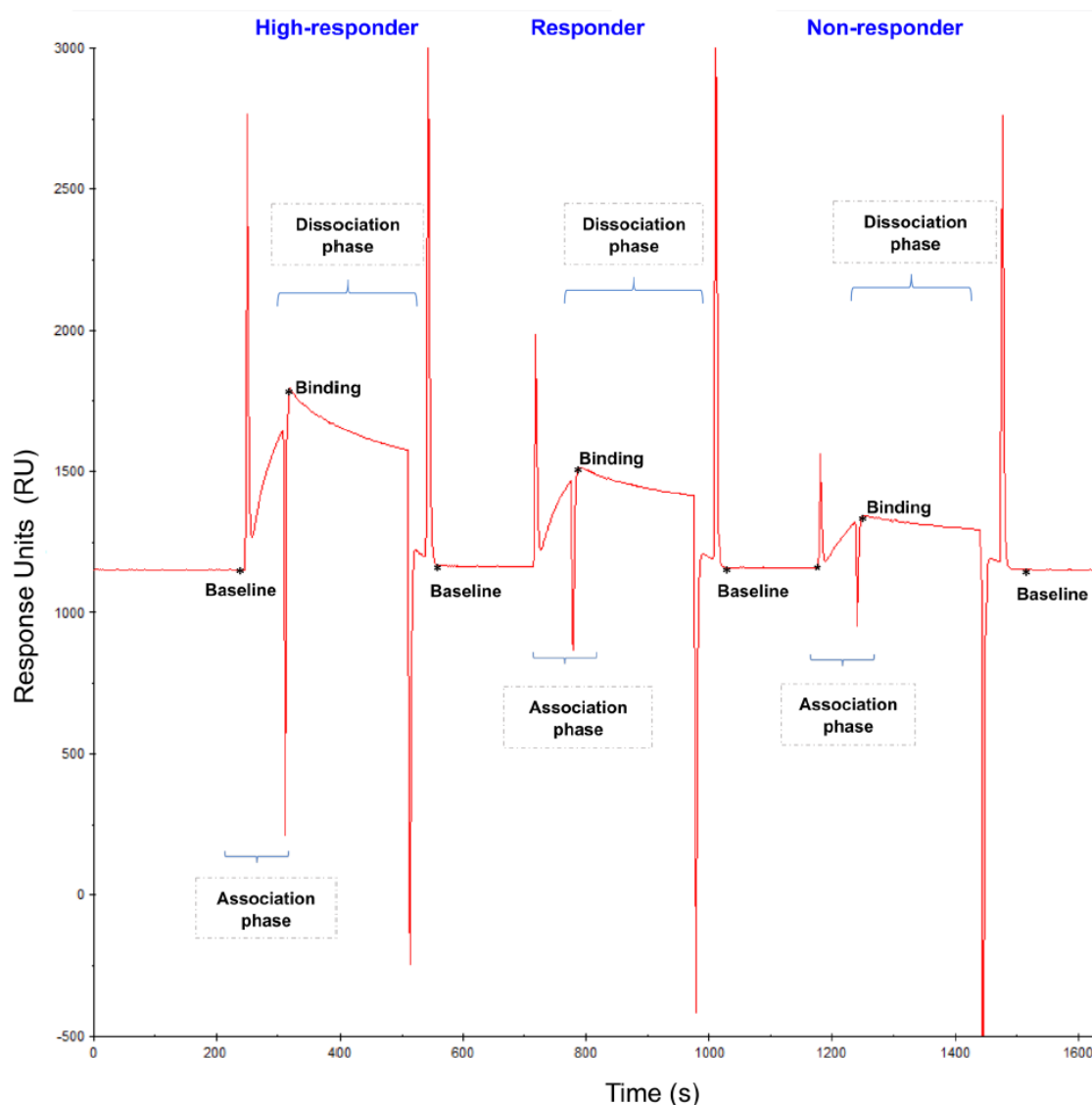


Figure 4. Representative SPR sensorgrams corresponding to the different groups of subjects included in the study. During SPR experiments, interaction between the PCV13 molecules immobilised in the chip and the serum anti-PnPs IgG occurs, changing the refractive index at the surface of the gold film and increasing signal intensity. Response units (RU) are used to describe the increase in the signal, where 1 RU is equal to a critical angle shift of 10^{-4} deg. At the start of the experiment all immobilised PCV13 molecules have not been exposed to serum anti-PnPs IgGs and the RU correspond to the starting critical angle (baseline). During the association phase, serum samples are injected into the flow cell and serum anti-PnPs IgGs bind to the immobilised PCV13 molecules, increasing the signal intensity. The shape of this curve can be used to measure the rate of association. This maximum RU relates to the maximum concentration of serum anti-PnPs IgGs that specifically interact with immobilized PCV13. During the dissociation phase, serum anti-PnPs IgGs are removed from the chip by the continuous flow. The surface is regenerated at the end of the experiment and returned to the starting critical angle (baseline) to start the next experiment. *Characteristically report points of SPR sensorgram: Baseline report point refers to the value of the critical angle at the star of the experiment. Binding report point refers to the maximum level of RU obtained after serum injection.

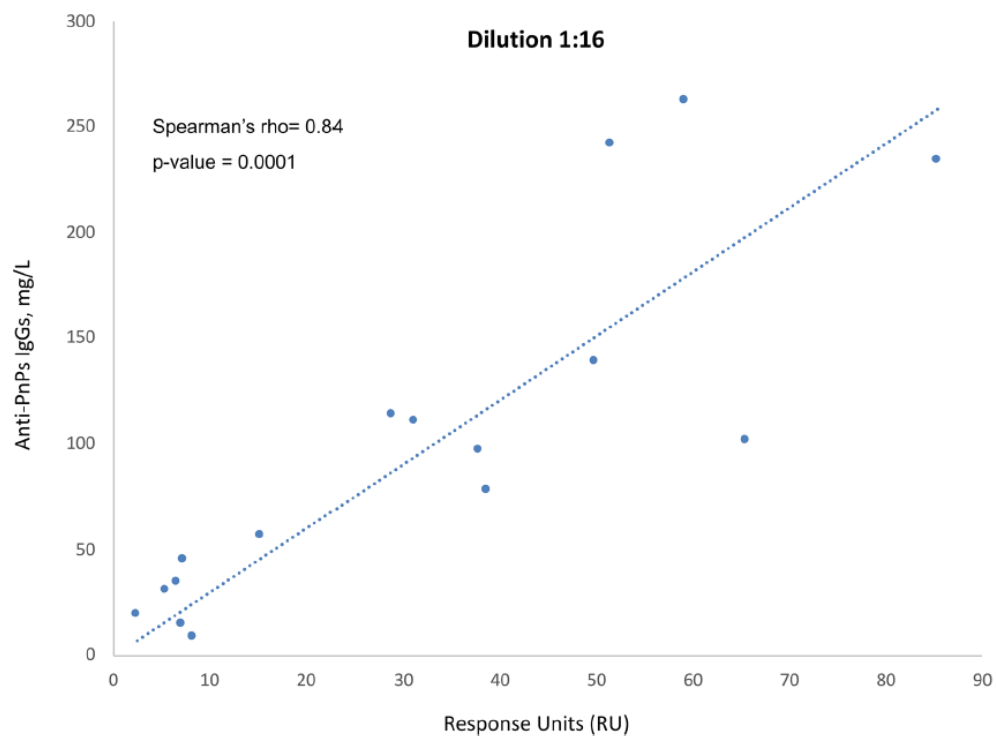


Figure 5. Correlation between SPR response and serum anti-PnPs IgGs levels determined by ELISA. Spearman's rank correlation analysis between SPR response (RU) and serum anti-PnPs IgGs levels determined by ELISA (mg/L) for all samples included in the study with a serum anti-PnPs IgGs concentration below 270 mg/L, as determined by ELISA (SPR results for the 1:16 dilution).

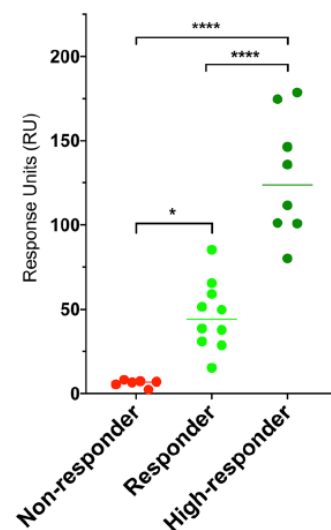


Figure 6. SPR binding profile reflects subjects' immunization state. Dot plots showing the SPR binding level (1:16 dilution) in the samples included in the study, classified according to their PCV13 response profile, determined by ELISA: Non-responder (red), Responder (light green), High-responder (dark green). Student's t-test: *p value < 0.05; ****p value < 0.0001.

the manufacturer's instructions. Patient's classification was performed based on the measuring range of the ELISA assay (3.3–270 mg/L) and following the Binding Site Group recommendations into: (i) PCV13 non/poor-responders (anti-PnPs IgGs ≤ 50 mg/L), (ii) PCV13 responders (anti-PnPs IgGs = 51–270 mg/L), and (iii) PCV13 high-responders (anti-PnPs IgGs > 270 mg/L)^{35,36}.

Isolation of serum total IgGs. Total IgGs were isolated from serum using fast protein liquid chromatography (FPLC) in an ÄKTA pure chromatography system (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). HiTrap HP columns, prepacked with Protein G Sepharose High Performance (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), were used to isolate IgGs from serum samples. Briefly, sera were diluted (1:35, v/v, in 20 mM NaH₂PO₄ buffer, pH = 7), applied to the HiTrap Protein G HP column at 1 ml/min, and eluted using a glycine buffer (100 mM Glycine, pH = 2.7; 1 ml/min). IgG-containing elution fractions, as detected by SDS-PAGE, were dialyzed against HEPES buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH = 7.4) for 24 h at 4°C, then concentrated using 10 kDa centrifugal filter units Amicon Ultra 10 K (Millipore, Bedford, USA) at 5,000 rpm up to a concentration of 5–7 mg/ml. A mass extinction coefficient (ϵ) of 13.7 M⁻¹ cm⁻¹ was used for measuring the IgG concentration in a NanoDrop One (Thermo Fisher, Madison, USA).

Quantification of serum anti-PnPs antibodies by SPR. The binding between anti-PnPs IgGs and PCV13 was monitored at 25 °C using a Biacore X100 instrument (GE Healthcare).

PCV13 preparation. PCV13 was dehydrated using Microcon centrifugal filter unit YM-50 membrane Amicon (10,800 rpm, 4°C) and recovered in 320 μ l of 10 mM sodium acetate buffer (pH 4.5), to obtain a final concentration of 100 μ g/ml diphtheria toxoid (CRM197).

PCV13 immobilization. Free amines of CRM197 (100 μ g/ml) contained in PCV13 were covalently immobilized in the flow cell 2 of a carboxy-methylated CM5 sensor chip by (i) activating the carboxymethyl groups with 70 μ l of N-hydroxysuccinimide (NHS) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) solution (10 μ l/min), (ii) injecting 50 μ l of PCV13 to promote the coupling reaction (10 μ l/min), and (iii) blocking the free activated carboxymethyl groups with 70 μ l of ethanolamine (10 μ l/min) (Fig. S3). A reference channel (flow cell 1) was immobilised in parallel, without PCV13, following the same procedure. After immobilization, 10 injections of 5 μ l of regeneration solution (50 mM NaOH and 1 M NaCl) were performed until baseline stabilization was obtained (10 μ l/min).

Binding SPR assay. For the evaluation of binding, serial dilutions (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) of purified IgG samples were freshly prepared in running buffer HBS-EP (10 mM HEPES, 500 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.1% surfactant P20, pH = 7.4), previously filtered and degassed. A total volume of 10 μ l were injected for each dilution (60 s contact time; 10 μ l/min) for association. Dissociation was performed over a 200 s interval. Surface regeneration between samples was carried out injecting 5 μ l of regeneration solution (50 mM NaOH and 1 M NaCl) during 30 s (10 μ l/min). Triplicates of the samples were injected for all dilutions.

Data analysis. Experimental results were analysed using Biacore X100 Evaluation Software 2.0.1 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The interaction between injected anti-PnPs IgGs and PCV13 immobilised in the CM5 sensor chip was defined by the binding response. The corrected response for flow cell 2, in response units (RU), was obtained by subtraction of the RU detected in the reference channel (flow cell 1) and was characterized using the evaluation methods predefined by GE Healthcare (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

Statistical analysis. Results were analysed using the “ClickR” package (v0.4.3.2)³⁷. Spearman's rank correlation analyses were performed for the evaluation of the correlation between anti-PnPs IgGs concentrations (ELISA), and the binding response (SPR). ANOVA and Student's t-test were used to assess the statistical significance of the differences in SPR binding results among the groups of patients. A p value < 0.05 was considered significant.

Received: 23 September 2020; Accepted: 8 March 2021

Published online: 22 March 2021

References

- Kim, G. L., Seon, S. H. & Rhee, D. K. Pneumonia and Streptococcus pneumoniae vaccine. *Arch. Pharm. Res.* **40**, 885–893. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0933-y> (2017).
- Brooks, L. R. K. & Mias, G. I. Streptococcus pneumoniae's virulence and host immunity: Aging, diagnostics, and prevention. *Front. Immunol.* **9**, 1366. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01366> (2018).
- LaFon, D. C. & Nahm, M. H. Measuring immune responses to pneumococcal vaccines. *J. Immunol. Methods* **461**, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.08.002> (2018).
- Oesterreich, S. *et al.* Humoral response to a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in kidney transplant recipients. *Vaccine* **38**, 3339–3350. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.02.088> (2020).
- Alvarez Garcia, F. J. *et al.* Immunisation schedule of the Spanish Association of Paediatrics: 2020 recommendations. *An. Pediatr. (Barc)* **92**(52), 52.e1–52.e10. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2019.10.007> (2020).

6. Rappuoli, R., De Gregorio, E. & Costantino, P. On the mechanisms of conjugate vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **116**, 14–16. <https://doi.org/10.1073/pnas.1819612116> (2019).
7. Garcia, H. H. *et al.* Low sensitivity and frequent cross-reactions in commercially available antibody detection ELISA assays for *Taenia solium* cysticercosis. *Trop. Med. Int. Health* **23**, 101–105. <https://doi.org/10.1111/tmi.13010> (2018).
8. Allan, C. L. M., Keating, P. E., Smith, S. M., Spellerberg, M. B. & O'Donnell, J. L. Anti-pneumococcal antibody measurement: implications of discordance between second and third generation assays. *Pathology* **52**, 375–377. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2019.12.008> (2020).
9. Sakamoto, S. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J. Nat. Med.* **72**, 32–42. <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1144-z> (2018).
10. Daly, T. M. & Hill, H. R. Use and clinical interpretation of pneumococcal antibody measurements in the evaluation of humoral immune function. *Clin. Vaccine Immunol.* **22**, 148–152. <https://doi.org/10.1128/CI.00735-14> (2015).
11. Petersen, R. L. Strategies using bio-layer interferometry biosensor technology for vaccine research and development. *Biosensors (Basel)* **7**, 49. <https://doi.org/10.3390/bios7040049> (2017).
12. Patching, S. G. Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein–ligand interactions and its potential for drug discovery. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2013.04.028> (2014).
13. Amendola, V., Pilot, R., Frascioni, M., Marago, O. M. & Iati, M. A. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. *J. Phys. Condens. Matter* **29**, 203002. <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3> (2017).
14. Nguyen, H. H., Park, J., Kang, S. & Kim, M. Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications. *Sensors (Basel)* **15**, 10481–10510. <https://doi.org/10.3390/s150510481> (2015).
15. Tam, Y. J. *et al.* Wide dynamic range of surface-plasmon-resonance-based assay for hepatitis B surface antigen antibody optimal detection in comparison with ELISA. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **64**, 735–744. <https://doi.org/10.1002/bab.1528> (2017).
16. Yang, D. *et al.* Efficient qualitative and quantitative determination of antigen-induced immune responses. *J. Biol. Chem.* **291**, 16361–16374. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.736660> (2016).
17. Lynch, H. E., Stewart, S. M., Kepler, T. B., Sempowski, G. D. & Alam, S. M. Surface plasmon resonance measurements of plasma antibody avidity during primary and secondary responses to anthrax protective antigen. *J. Immunol. Methods* **404**, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.11.026> (2014).
18. Khurana, S. *et al.* Repeat vaccination reduces antibody affinity maturation across different influenza vaccine platforms in humans. *Nat. Commun.* **10**, 3338. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11296-5> (2019).
19. Karen, L. Cox, B., Devanarayan, V., Kriaiucinas, A., Manetta, J., Montrose, C. & Sittampalam, S. Immunoassay Methods. In: *Assay Guidance Manual [Internet]*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/> (2012) [Updated 2019 Jul 8].
20. Losoya-Leal, A., Estevez, M. C., Martinez-Chapa, S. O. & Lechuga, L. M. Design of a surface plasmon resonance immunoassay for therapeutic drug monitoring of amikacin. *Talanta* **141**, 253–258. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.04.009> (2015).
21. Janssen, J. M., Jackson, S., Heyward, W. L. & Janssen, R. S. Immunogenicity of an investigational hepatitis B vaccine with a toll-like receptor 9 agonist adjuvant (HBsAg-1018) compared with a licensed hepatitis B vaccine in subpopulations of healthy adults 18–70 years of age. *Vaccine* **33**, 3614–3618. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.05.070> (2015).
22. Uzun, L., Say, R., Unal, S. & Denizli, A. Production of surface plasmon resonance based assay kit for hepatitis diagnosis. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 2878–2884. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.02.021> (2009).
23. Visentin, J. *et al.* Overcoming non-specific binding to measure the active concentration and kinetics of serum anti-HLA antibodies by surface plasmon resonance. *Biosens. Bioelectron.* **117**, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.06.013> (2018).
24. Schneider, C. S. *et al.* Surface plasmon resonance as a high throughput method to evaluate specific and non-specific binding of nanotherapeutics. *J. Control Release* **219**, 331–344. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.048> (2015).
25. Masson, J. F. *et al.* Reduction of nonspecific protein binding on surface plasmon resonance biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 1951–1959. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0834-2> (2006).
26. Fitzgerald, J., Leonard, P., Darcy, E., Sharma, S. & O'Kennedy, R. Immunoaffinity chromatography: Concepts and applications. *Methods Mol. Biol.* **1485**, 27–51. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_3 (2017).
27. Kangwa, M., Yelemene, V., Ponnurangam, A. & Fernandez-Lahore, M. An engineered Staphylococcal Protein A based ligand: Production, characterization and potential application for the capture of Immunoglobulin and Fc-fusion proteins. *Protein Expr. Purif.* **155**, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.11.003> (2019).
28. Wu, Z. *et al.* Purification of antibody against Ara h 2 by a homemade immunoaffinity chromatography column. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **47**, 841–846. <https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1342265> (2017).
29. Nilvebrant, J. Kinetic analysis and epitope binning using surface plasmon resonance. *Methods Mol. Biol.* **1785**, 187–205. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7841-0_12 (2018).
30. Drake, A. W. & Klakamp, S. L. A strategic and systematic approach for the determination of biosensor regeneration conditions. *J. Immunol. Methods* **371**, 165–169. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.06.003> (2011).
31. van der Kant, R. *et al.* Prediction and reduction of the aggregation of monoclonal antibodies. *J. Mol. Biol.* **429**, 1244–1261. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.03.014> (2017).
32. Tighe, P. J., Ryder, R. R., Todd, I. & Fairclough, L. C. ELISA in the multiplex era: potentials and pitfalls. *Proteomics Clin. Appl.* **9**, 406–422. <https://doi.org/10.1002/prca.201400130> (2015).
33. Committee On Infectious, D. Recommended childhood and adolescent immunization schedules: United States, 2019. *Pediatrics* **143**, e20190065. <https://doi.org/10.1542/peds.2019-0065> (2019).
34. Panovska-Griffiths, J. *et al.* A method for evaluating and comparing immunisation schedules that cover multiple diseases: Illustrative application to the UK routine childhood vaccine schedule. *Vaccine* **36**, 5340–5347. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.083> (2018).
35. Schauer, U. *et al.* Levels of antibodies specific to tetanus toxoid, Haemophilus influenzae type b, and pneumococcal capsular polysaccharide in healthy children and adults. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**, 202–207. <https://doi.org/10.1128/cdli.10.2.202-207.2003> (2003).
36. Sanchez-Ramon, S. *et al.* Multicenter study for the evaluation of the antibody response against salmonella typhi Vi vaccination (EMPATHY) for the diagnosis of Anti-polysaccharide antibody production deficiency in patients with primary immunodeficiency. *Clin. Immunol.* **169**, 80–84. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.05.006> (2016).
37. Victoria Fornes Ferrer, D.H.M. Package 'clickR'. Available online.

Acknowledgements

This work was supported by the Generalitat Valenciana and European Regional Development Fund (FEDER) funds (PO FEDER of Comunitat Valenciana 2014–2020). Post-residence contract of The Health Research Institute Hospital La Fe (IIS La Fe) is acknowledged. The authors express their sincere gratitude to all subjects included in the study. They are also grateful to Néstor Santiago Gonzalvo (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) for providing excellent support with setting up SPR experiments.

Author contributions

Conceptualization, A.P.-L., J.M.S.-A. and J.P.-G.; methodology, M.G.-J., L.O.-P., M.C.M.-G., J.M.-M., C.L.-S., A.G.-B., J.L.L.-H. and J.M.B.-G.; formal analysis, A.P.-L., L.P.-C. and M.G.-J.; writing—original draft preparation, A.P.-L., J.G.-P., L.P.-C. and M.G.-J.; writing—review and editing, A.P.-L. and L.P.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85958-0>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.P.-G. or A.P.-L.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

scientific reports

Supplementary information

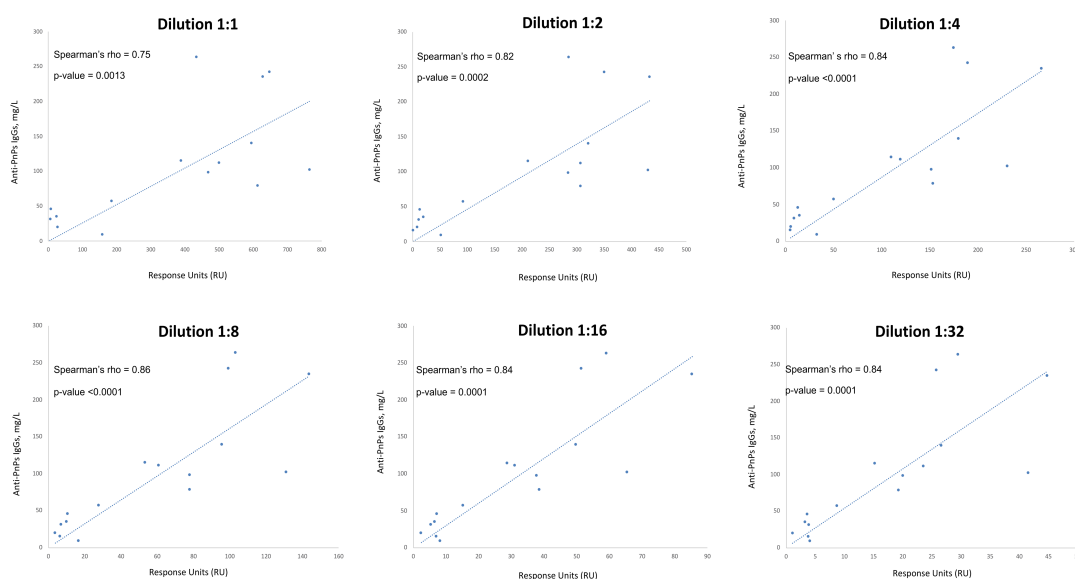


Figure S1. Spearman's rank correlation analysis between SPR response (RU) and serum anti-PnPs IgGs levels determined by ELISA (mg/L) for all samples included in the study with a serum anti-PnPs IgGs concentration below 270mg/L, as determined by ELISA (SPR results for all the sample dilutions assayed in the study (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32)).

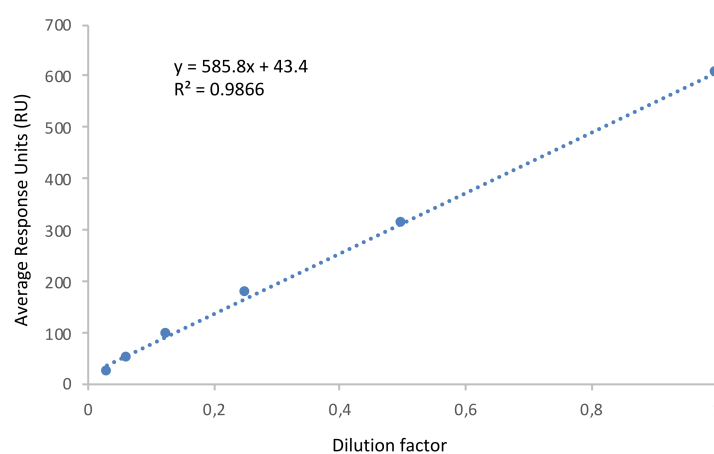


Figure S2. Linear correlation analysis between average SPR signal and sample dilution coefficient for all the serum samples included in the study.

scientific reports

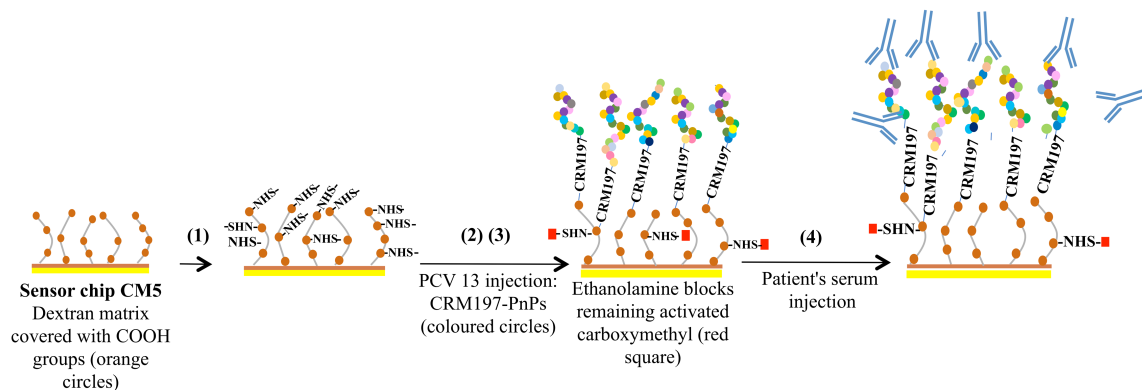


Figure S3. Scheme of the PCV13 immobilization using amine chemistry. The immobilization process consisted in three steps: (1) NHS/EDC were injected to activate the surface of the CM5 chip by modification of the carboxymethyl groups to N-Hydroxysuccinimide esters (-NHS-); (2) Diluted PCV13 was injected and the N- Hydroxysuccinimide esters spontaneously reacted with the amine groups in lysine residues of CRM197 to form covalent links between the PCV13 molecules and the CM5 chip surface; (3) Ethanolamine was injected to block free activated carboxymethyl groups and avoid non-specific binding in the SPR experiments; (4) Anti-PnPs IgGs generated by patients against the different epitopes present in the PCV13 are detected by SPR (anti-PnPs IgGs and CRM197).



5. Discusión

Pese a la extensa utilización de las vacunas antineumocócicas, la ENI continúa siendo una de las primeras causas de morbi-mortalidad en niños pequeños y adultos con patología de base. En este contexto surge la necesidad de realizar el presente trabajo, estudiando la ENI desde tres enfoques distintos: i) epidemiológico, a nivel de uso y eficacia de las vacunas, ii) clínico, al centrarse en niños con ID, los cuales presentan un riesgo aún más elevado de padecer episodios de ENI con peor curso clínico y pronóstico, y iii) experimental, al validar la RPS como técnica novedosa para medir los anti-PnPs IgGs.

En nuestra serie, la ENI afecta negativamente a la población pediátrica, especialmente a los varones menores de 2 años, al igual que lo observado en otros estudios¹¹¹. La implantación de la VNC13 en el calendario de vacunación infantil ha tenido un impacto positivo en la tasa global de cobertura vacunal, aumentando del 60% al 87%, al igual que en otras series^{112,113}. Además, se han reducido marcadamente los casos de ENI por serotipos incluidos en la VNC13, con excepción del serotipo 3, que permanece estable, en concordancia con lo descrito por otros autores^{114,115}. No obstante, al igual que en otros estudios, se ha observado un aumento de la incidencia de ENI por serotipos no vacunales^{116,117}.

En nuestro trabajo, los serotipos 19A, 3, 24B/F, 33F y 10A son los mayoritarios, coincidiendo con otras series¹¹⁸, especialmente los serotipos 19A y 3. Asimismo, estos dos serotipos se asocian con tasas elevadas de fallos vacunales a la VNC13. La cápsula hipermucosa característica del serotipo 3 le permite evadir la respuesta inmune, lo que podría explicar su implicación en los fallos vacunales; además, ensayos clínicos de inmunogenicidad de la VNC13 han demostrado que la respuesta humoral frente a este serotipo es inferior a la del resto^{119,9,10}. Por otra parte, el aumento significativo de la prevalencia del serotipo 19A junto con su resistencia antibiótica, lo convierten en uno de los serotipos de especial vigilancia¹²⁰.

Como era de esperar, la neumonía fue la forma clínica mayoritaria entre los niños con ENI, especialmente en aquellos sin enfermedades crónicas de base y en los que presentan dolencias respiratorias crónicas, a pesar de que la neumonía es la forma de presentación más común entre los adultos¹²¹.

De acuerdo con otras publicaciones^{109,122}, las tasas de meningitis más elevadas se observan en niños con alguna enfermedad neurológica de base (implante coclear, epilepsia, fístula de LCR, etc.). Asimismo, este grupo de pacientes presenta secuelas importantes y mayor mortalidad asociada, con diferencias estadísticamente significativas ($p=0,024$). Estos hallazgos concuerdan con series previas que reportan una mortalidad asociada a meningitis neumocócica de hasta un 30%, y hasta un 50% de secuelas en los pacientes que sobreviven¹²³.

En términos generales, el riesgo de ENI es mayor en pacientes con enfermedades crónicas de base que en la población sana, tal y como aparece reflejado en nuestro estudio, donde más de la mitad de los pacientes (50,4%) presenta alguna afección subyacente¹⁰⁹. Estas enfermedades crónicas suelen ir acompañadas de afectación inmunológica lo que explicaría que en nuestro estudio el 63% de los fallos vacunales se produjesen en pacientes con afecciones de base¹²⁴. No obstante, la relación entre un estado inmunitario deficiente con una mayor probabilidad de fallo vacunal no parece ser tan clara en algunas publicaciones¹²⁵. Una explicación plausible sería que la mayoría de estos estudios excluyen a pacientes con comorbilidades, puesto que representan una fuente sustancial de variabilidad en términos de susceptibilidad a la infección¹²⁶. En cualquier caso, son necesarios futuros estudios con mayor número de pacientes para poder extraer conclusiones con superior potencia estadística.

Como era de esperar, los dos pacientes de nuestro estudio con ENI recurrente tenían una ID subyacente, coincidiendo con algunas series que refieren que hasta el 75% de pacientes con episodios de ENI recurrentes presentan alguna ID^{109,127}. Nuestros hallazgos respaldan la importancia de realizar evaluaciones inmunológicas completas en niños sin una predisposición conocida que debutan o que presentan episodios repetidos de ENI. En los últimos años se ha observado un incremento en la prevalencia de ID en población pediátrica, debido precisamente a las mejoras en el diagnóstico.

Los métodos serológicos son útiles para medir la eficacia vacunal, así como para el diagnóstico de posibles ID. Actualmente, en estudios de inmunogenicidad y autorización de vacunas neumocócicas se utiliza el ELISA de la OMS, que mide IgG

específicas de cada serotipo, en combinación con ensayos OPA. No obstante, ambas técnicas presentan inconvenientes que limitan su utilización en la práctica habitual, como la necesidad de realizar un ELISA de cada uno de los serotipos por separado, o la tediosidad que caracteriza a los ensayos OPA^{55,56,67}. En este contexto surge la idea de poder utilizar el título de anti-PnPs IgG global, tras vacunación con VCN13, junto con otros parámetros fácilmente medibles en el laboratorio (niveles plasmáticos de poblaciones leucocitarias o de subclases de IgG, entre otros) para completar la evaluación diagnóstica de pacientes con distintos tipos de ID.

Nuestros hallazgos ponen de manifiesto el papel de la ID en la respuesta a la VNC13, puesto que, tras una pauta de vacunación completa, más de la mitad de los pacientes (54%) presentan títulos anti-PnPs IgG por debajo del umbral protector, coincidiendo con lo ya publicado^{109,128}. Además, ninguno de los pacientes con ID y tratamiento inmunosupresor crónico alcanza dicho umbral, debido a la hiporreactividad inmunológica inducida por estos fármacos¹²⁹. En general, los inmunosupresores bloquean la expansión clonal de los linfocitos T y B y, consecuentemente, los anticuerpos vacunales se producen en menor cantidad y calidad¹³⁰. Por esta razón en niños con ID, especialmente si están bajo terapia inmunosupresora, deben utilizarse pautas de vacunación especiales con refuerzos frecuentes para lograr una respuesta vacunal óptima⁹⁷.

De igual forma, la protección inducida tras la vacunación está mediada por la interacción compleja entre la inmunidad innata y la inmunidad celular/humoral¹³¹. Por tanto, los pacientes con disfunción o recuentos bajos de los componentes del sistema inmunitario suelen producir respuestas vacunales de mala calidad, como en nuestra cohorte^{132,133}. En este sentido los pacientes que responden a la VNC13 tienen concentraciones más elevadas de neutrófilos, leucocitos y linfocitos, con diferencias estadísticamente significativas para linfocitos TCD4+/CD8+ y CD56+/CD16+¹³⁴.

Sorprendentemente, encontramos una relación inversa entre niveles elevados de IgG4 y la respuesta a la VNC13, puesto que los pacientes que tenían títulos de IgG4 elevados presentaron peor respuesta a la inmunización.

Estudios recientes sugieren que esta inmunoglobulina podría estar involucrada en procesos de respuesta inflamatoria aberrante, lo que explicaría su participación en enfermedades como la pancreatitis autoinmune o la colangitis asociada a IgG4¹³⁴. Por otra parte, otras publicaciones sugieren que la IgG4 tiene un efecto antiinflamatorio e inductor de tolerancia lo que le conferiría a esta subclase de inmunoglobulina un papel patógeno y a la vez protector de la respuesta inmune^{135,136}. En cualquier caso, son necesarias nuevas investigaciones con mayores cohortes de pacientes que aclaren el papel de la IgG4 en la respuesta vacunal.

Finalmente, validamos la técnica de RPS para la medición en suero de IgG anti-PnPs con la finalidad de incorporar esta novedosa metodología en la práctica clínica habitual⁷⁴, ya que la RPS puede presentar interesantes ventajas respecto a los kits de ELISA comerciales, como la capacidad de regeneración del sensor o la posibilidad de analizar más de 200 muestras con un mismo chip. Hasta donde sabemos, nuestro estudio demuestra por primera vez que los métodos basados en RPS proporcionan mediciones fiables y precisas de los niveles séricos de IgG anti-PnPs en un tiempo experimental muy corto (2 min).

Para asegurar la especificidad de la señal de UR durante el experimento y minimizar las posibles interacciones con otras proteínas presentes en el suero, se purificaron las IgG totales mediante FPLC^{137,138} y se inmovilizó la vacuna mediante acoplamiento amino con la superficie de un chip CM5 facilitándose la interacción de las IgG anti-PnPs presentes en el suero con los PnPs presentes en la VNC13, los cuales estaban libres en la superficie del chip¹³⁹. Además, se diseñó un protocolo de regeneración eficaz, puesto que se consiguió eliminar entre muestras de pacientes distintos las IgG anti-PnPs unidas en la superficie del chip, sin dañar la estructura de la VNC13¹⁴⁰.

Finalmente, encontramos una correlación robusta entre la concentración de IgG anti-PnPs medidas por ELISA y la señal de UR obtenidas por RPS, con buena sensibilidad y niveles óptimos de reproducibilidad, especialmente para la dilución 1:16. No obstante, estos hallazgos deben ser corroborados en otras vacunas neumocócicas y en cohortes más amplias de pacientes.

Por tanto, los resultados de nuestro estudio piloto muestran claramente que la RPS es una herramienta muy valiosa para medir la respuesta vacunal a VNC13 en la práctica clínica habitual. En el futuro, las RPS podría representar una metodología muy prometedora para evaluar y medir la efectividad de diferentes vacunas con distintos serotipos de una forma sencilla y coste-efectiva.



6. Conclusiones

1. Durante el periodo de estudio, la mayoría de casos de ENI se registraron en niños menores de 5 años y del sexo masculino, indicando una mayor vulnerabilidad en este grupo etario y género.
2. La implementación de la VNC13 en el calendario de vacunación infantil de la Comunidad Valenciana consiguió una reducción significativa de los casos de ENI causados por serotipos vacunales, con excepción del serotipo 3.
3. Los pacientes con enfermedades crónicas subyacentes, especialmente con algún tipo de inmunodeficiencia, presentan más riesgo de ENI, sobre todo por los serotipos 3 y 19A.
4. En los niños con enfermedades neurológicas de base se observan las tasas más altas de secuelas y mortalidad tras ENI, lo que subraya la vulnerabilidad de este grupo frente a la infección.
5. Los pacientes diagnosticados con algún tipo de inmunodeficiencia, especialmente los que recibieron terapia inmunosupresora y los trasplantados de progenitores hematopoyéticos, presentan mayor tasa de hipo-respuesta vacunal.
6. Existe una asociación estadísticamente significativa entre niveles plasmáticos normales de linfocitos T CD4+/CD8+ y células NK CD56+/CD16+ con una respuesta vacunal óptima a la VNC13.
7. Se observa una correlación robusta entre la señal en UR obtenida por RPS y la concentración de los niveles séricos de IgG anti-PnPs medidos mediante ELISA, especialmente para la dilución 1:16.
8. La tecnología basada en RPS proporciona una valiosa herramienta para caracterizar de forma fiable la interacción entre IgGs anti-PnPs y VNC13 en un tiempo de realización muy corto.



7. Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

1. Watson DA, Musher DM, Jacobson JW, Verhoef J. A Brief History of the *Pneumococcus* in Biomedical Research: A Panoply of Scientific Discovery. *Clinical Infectious Diseases*. 1993 Nov 1;17(5):913–24.
2. Gray BM, Musher DM. The History of Pneumococcal Disease. In: Siber G. R., Klugman K. P. and Mäkelä P. H. eds. *Pneumococcal Vaccines: the Impact of Conjugate Vaccine*. ASM Press, Washington, D. C. 2008; 3-17.
3. Dion CF, Ashurst JV. *Streptococcus pneumoniae*. 2022 Aug 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan—.PMID: 29261971.
4. Bean B, Tomasz A. Choline metabolism in pneumococci. *J Bacteriol*. 1977 Apr;130(1):571–4.
5. Arbique JC, Poyart C, Trieu-Cuot P, Quesne G, Carvalho M da GS, Steigerwalt AG, *et al*. Accuracy of Phenotypic and Genotypic Testing for Identification of *Streptococcus pneumoniae* and Description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. *J Clin Microbiol*. 2004 Oct;42(10):4686–96.
6. Chamorro G, Kawabata A, Carvalho M da G, Pimenta FC, Lessa FC, Torres C, *et al*. Nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* in children and adults before the introduction of the 10-valent conjugate vaccine, Paraguay. Das A, editor. *PLoS ONE*. 2023 Feb 16;18(2):e0280722.
7. Paton JC, Trappetti C. *Streptococcus pneumoniae* Capsular Polysaccharide. Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Braunstein M, Rood JI, editors. *Microbiol Spectr*. 2019 Apr 12;7(2):7.2.33.
8. Valentino MD, McGuire AM, Rosch JW, Bispo PJM, Burnham C, Sanfilippo CM, *et al*. Unencapsulated *Streptococcus pneumoniae* from conjunctivitis encode

- variant traits and belong to a distinct phylogenetic cluster. *Nat Commun*. 2014 Nov 12;5(1):5411.
9. Méndez-Lage S, Losada-Castillo I, Agulla-Budiño A. *Streptococcus pneumoniae*: distribución de serotipos, sensibilidad antibiótica, factores de riesgo y mortalidad en Galicia en un periodo de 2 años. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2015 Nov;33(9):579–84.
 10. Izquierdo C, Ciruela P, Hernández S, García-García JJ, Esteva C, Moraga-Llop F, *et al*. Pneumococcal serotypes in children, clinical presentation and antimicrobial susceptibility in the PCV13 era. *Epidemiol Infect*. 2020 Nov 5;1–37.
 11. Hanquet G, Krizova P, Dalby T, Ladhani SN, Nuorti JP, Danis K, *et al*. Serotype Replacement after Introduction of 10-Valent and 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccines in 10 Countries, Europe. *Emerg Infect Dis*. 2022 Jan;28(1):137–8.
 12. Janoff EN, Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell GL; Bennet JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 9th ed. New York: Churchill Livingstone, 2020; 2473–2491.
 13. Mitchell AM, Mitchell TJ. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010 May;16(5):411–8.
 14. Ramos-Sevillano E, Moscoso M, García P, García E, Yuste J. Nasopharyngeal Colonization and Invasive Disease Are Enhanced by the Cell Wall Hydrolases LytB and LytC of *Streptococcus pneumoniae*. Aguilar L, editor. *PLoS ONE*. 2011 Aug 23;6(8):e23626.
 15. Ramos-Sevillano E, Urzainqui A, Campuzano S, Moscoso M, González-Camacho F, Domenech M, *et al*. Pleiotropic Effects of Cell Wall Amidase LytA on

- Streptococcus pneumoniae* Sensitivity to the Host Immune Response. Pirofski L, editor. Infect Immun. 2015 Feb;83(2):591–603.
16. Eldholm V, Johnsborg O, Haugen K, Ohnstad HS, Håvarstein LS. Fratricide in *Streptococcus pneumoniae*: contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC. Microbiology. 2009 Jul 1;155(7):2223–34.
 17. Gil E, Noursadeghi M, Brown JS. *Streptococcus pneumoniae* interactions with the complement system. Front Cell Infect Microbiol. 2022 Jul 28;12:929483.
 18. Haleem KS, Ali YM, Yesilkaya H, Kohler T, Hammerschmidt S, Andrew PW, *et al.* The Pneumococcal Surface Proteins PspA and PspC Sequester Host C4-Binding Protein to Inactivate Complement C4b on the Bacterial Surface. Pirofski L, editor. Infect Immun. 2019 Jan;87(1):e00742-18.
 19. Appelbaum PC. Antimicrobial Resistance in *Streptococcus pneumoniae*: An Overview. Clinical Infectious Diseases. 1992 Jul 1;15(1):77–83.
 20. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0, 2023. <http://www.eucast.org>.
 21. van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. Lancet. 2009 Oct 31;374(9700):1543-56. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61114-4. PMID: 19880020.
 22. Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. Nat Rev Microbiol. 2018 Jun;16(6):355-367. doi: 10.1038/s41579-018-0001-8. PMID: 29599457; PMCID: PMC5949087.
 23. Esposito S, Mari D, Bergamaschini L, Orenti A, Terranova L, Ruggiero L, *et al.* Pneumococcal colonization in older adults. Immun Ageing. 2016 Dec;13(1):2.

24. Tigoi CC, Gatakaa H, Karani A, Mugo D, Kungu S, Wanjiru E, *et al.* Rates of Acquisition of Pneumococcal Colonization and Transmission Probabilities, by Serotype, Among Newborn Infants in Kilifi District, Kenya. *Clinical Infectious Diseases*. 2012 Jul 15;55(2):180–8.
25. Koliou MG, Andreou K, Lamnisos D, *et al.* Risk factors for carriage of *Streptococcus pneumoniae* in children. *BMC Pediatr*. 2018 Apr 26;18(1):144. doi: 10.1186/s12887-018-1119-6. PMID: 29699525; PMCID: PMC5921789.
26. Atkinson W, Wolfe S, Hamborsky J. Pneumococcal disease. In: Centers for Disease Control and Prevention, editor. *Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases*. 12th ed. Washington; 2011. p. 233–48.
27. Sexton D. Invasive pneumococcal (*Streptococcus pneumoniae*) infections and bacteremia [Internet]. UpToDate. 2013 [cited 2013 Oct 27]. Available from: www.uptodate.com.
28. Serrano-Heranz R, Sicilia-Urbán JJ, Sanz-Rojas P. Infecciones por neumococo. Clasificación. Factores predisponentes. Aspectos patogénicos de relevancia clínica o diagnóstica. Manifestaciones clínicas. Formas de comienzo. *Medicine (Madr)*. 2010 Mar;10(50):3352-3359. Spanish. doi: 10.1016/S0304-5412(10)70042-1. Epub 2010 Mar 20. PMID: 32287886; PMCID: PMC7143697.
29. Servicio de Vigilancia Epidemiológica y Enfermedades Transmisibles. Red de Vigilancia Epidemiológica de Castilla y León. Informe sobre la enfermedad invasora por neumococo en Castilla y León [Internet]. Valladolid; 2011. Available from: <https://www.saludcastillayleon.es/profesionales/es/infepidemiologicos/informes-epidemiologicoscastilla-leon/informes-enfermedad-invasora-neumococo-ein>.
30. Dirección General de Atención Primaria. Informe de la enfermedad neumocócica invasor en la comunidad de Madrid, CMBD 2011. 2012.

-
31. Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública. Informe Enfermedad Neumocócica Invasora (ENI) C.V. 2007-2021.
 32. Giannella M, Pinilla B, Capdevila JA, Martinez Alarcon J, Munoz P, Lopez Alvarez J, *et al.* Pneumonia treated in the internal medicine department: focus on healthcare-associated pneumonia. *Clin Microbiol Infect.* England; 2012 Aug;18(8):786–94.
 33. Gil-Prieto R, Garcia-Garcia L, Alvaro-Meca A, Mendez C, Garcia A, de Miguel AG. The burden of hospitalisations for community-acquired pneumonia (CAP) and pneumococcal pneumonia in adults in Spain (2003-2007). *Vaccine.* Netherlands; 2011 Jan;29(3):412–6.
 34. Pineda Solas V. Vacunas conjugadas. *Rev Pediatría Atención Primaria.* 2005;VII (Suplemento 4).
 35. Stein KE. Thymus-Independent and Thymus-Dependent Responses to Polysaccharide Antigens. *J Infect Dis.* Oxford University Press; 1992;165:S49S52.
 36. Álvarez García FJ, Cilleruelo Ortega MJ, Álvarez Aldeán J, Garcés-Sánchez M, Garrote Llanos E, Iofrío De Arce A, *et al.* Calendario de inmunizaciones de la Asociación Española de Pediatría: recomendaciones 2023. *Anales de Pediatría.* 2023 Jan;98(1):58.e1-58.e10.
 37. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report for 2015 Invasive pneumococcal disease. 2017;(November).
 38. Bouza E, Grau I, Torres A. Clinical presentations and serotypes causing community- acquired healthcare-associated or nosocomial invasive pneumococcal disease un adults in a multicenter clinical surveillance in Spain (2010-2012). Berlin; 2013.

-
39. Moberley S, Holden J, Tatham DP, Andrews RM. Vaccines for preventing pneumococcal infection in adults. Cochrane Acute Respiratory Infections Group, editor. Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]. 2013 Jan 31 [cited 2023 May 5]; Available from: <https://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD000422.pub3>.
40. Watera C, Nakiyingi J, Miiro G, Muwonge R, Whitworth JAG, Gilks CF, *et al.* 23-Valent pneumococcal polysaccharide vaccine in HIV-infected Ugandan adults: 6-year follow-up of a clinical trial cohort. *AIDS*. England; 2004 May;18(8):1210–3.
41. Fiorino G, Peyrin-Biroulet L, Naccarato P, Szabo H, Sociale OR, Vetrano S, *et al.* Effects of immunosuppression on immune response to pneumococcal vaccine in inflammatory bowel disease: a prospective study. *Inflamm Bowel Dis*. United States; 2012 Jun;18(6):1042–7.
42. Andrews NJ, Waight PA, George RC, Slack MPE, Miller E. Impact and effectiveness of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine against invasive pneumococcal disease in the elderly in England and Wales. *Vaccine*. Netherlands; 2012 Nov;30(48):6802–8.
43. Poolman J, Borrow R. Hyporesponsiveness and its clinical implications after vaccination with polysaccharide or glycoconjugate vaccines. *Expert Review of Vaccines*. 2011 Mar;10(3):307–22.
44. Miller E, Andrews NJ, Waight PA, Slack MPE, George RC. Effectiveness of the new serotypes in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Vaccine*. 2011 Nov;29(49):9127–31.
45. Jackson LA, Gurtman A, van Cleeff M, Jansen KU, Jayawardene D, Devlin C, *et al.* Immunogenicity and safety of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine compared to a 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in pneumococcal vaccine-naïve adults. *Vaccine*. 2013 Aug;31(35):3577–84.

-
46. Sinisalo M, Vilpo J, Itälä M, Väkeväinen M, Taurio J, Aittoniemi J. Antibody response to 7-valent conjugated pneumococcal vaccine in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Vaccine*. 2007 Dec;26(1):82–7.
 47. Evers SMAA, Ament AJHA, Colombo GL, Konradsen HB, Reinert RR, Sauerland D, *et al*. Cost-effectiveness of pneumococcal vaccination for prevention of invasive pneumococcal disease in the elderly: an update for 10 Western European countries. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Aug;26(8):531–40.
 48. Kuhlmann A, Theidel U, Pletz MW, von der Schulenburg JMG. Potential cost-effectiveness and benefit-cost ratios of adult pneumococcal vaccination in Germany. *Health Econ Rev*. 2012 Dec;2(1):4.
 49. LaFon DC, Nahm MH. Measuring immune responses to pneumococcal vaccines. *Journal of Immunological Methods*. 2018 Oct;461:37–43.
 50. Schiffman G, Douglas RM, Bonner MJ, Robbins M, Austrian R. A radioimmunoassay for immunologic phenomena in pneumococcal disease and for the antibody response to pneumococcal vaccines. I. Method for the radioimmunoassay of anticapsular antibodies and comparison with other techniques. *Journal of Immunological Methods*. 1980 Mar;33(2):133–44.
 51. Webster AD, Latif AA, Brenner MK, Bird D. Evaluation of test immunisation in the assessment of antibody deficiency syndromes. *BMJ*. 1984 Jun 23;288(6434):1864–6.
 52. Ryu WS. Diagnosis and Methods. In: *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses* [Internet]. Elsevier; 2017 [cited 2023 May 7]. p. 47–62. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128008386000047>.

-
53. Ammann AJ, Pelger RJ. Determination of Antibody to Pneumococcal Polysaccharides with Chromic Chloride-Treated Human Red Blood Cells and Indirect Hemagglutination.
 54. Wernette CM, Frasch CE, Madore D, Carlone G, Goldblatt D, Plikaytis B, *et al.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Quantitation of Human Antibodies to Pneumococcal Polysaccharides. *Clin Vaccine Immunol.* 2003 Jul;10(4):514–9.
 55. Plikaytis BD, Goldblatt D, Frasch CE, Blondeau C, Bybel MJ, Giebink GS, *et al.* An Analytical Model Applied to a Multicenter Pneumococcal Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Study. *J CLIN MICROBIOL.* 2000;38.
 56. Jódar L, Butler J, Carlone G, Dagan R, Goldblatt D, Käyhty H, *et al.* Serological criteria for evaluation and licensure of new pneumococcal conjugate vaccine formulations for use in infants. *Vaccine.* 2003 Jul;21(23):3265–72.
 57. World Health Organization, Recommendations for the production & control of pneumococcal conjugate vaccines. 2003.
 58. Siber GR, Chang I, Baker S, Fernsten P, O'Brien KL, Santosham M, *et al.* Estimating the protective concentration of anti-pneumococcal capsular polysaccharide antibodies. *Vaccine.* 2007 May;25(19):3816–26.
 59. Balmer P, Borrow R, Findlow J, Warrington R, Frankland S, Waight P, *et al.* Age-Stratified Prevalences of Pneumococcal-Serotype-Specific Immunoglobulin G in England and Their Relationship to the Serotype-Specific Incidence of Invasive Pneumococcal Disease Prior to the Introduction of the Pneumococcal 7-Valent Conjugate Vaccine. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Nov;14(11):1442–50.
 60. Pickering JW, Martins TB, Greer RW, Schroder MC, Astill ME, Litwin CM, *et al.* A Multiplexed Fluorescent Microsphere Immunoassay for Antibodies to

- Pneumococcal Capsular Polysaccharides. *Am J Clin Pathol*. 2002 Apr;117(4):589–96.
61. Lal G, Balmer P, Stanford E, Martin S, Warrington R, Borrow R. Development and validation of a nonaplex assay for the simultaneous quantitation of antibodies to nine *Streptococcus pneumoniae* serotypes. *Journal of Immunological Methods*. 2005 Jan;296(1–2):135–47.
62. Waterboer T, Sehr P, Pawlita M. Suppression of non-specific binding in serological Luminex assays. *Journal of Immunological Methods*. 2006 Feb;309(1–2):200–4.
63. Biagini RE, Schlottmann SA, Sammons DL, Smith JP, Snawder JC, Striley CAF, *et al*. Method for Simultaneous Measurement of Antibodies to 23 Pneumococcal Capsular Polysaccharides. *Clin Vaccine Immunol*. 2003 Sep;10(5):744–50.
64. Borgers H, Moens L, Picard C, Jeurissen A, Raes M, Sauer K, Proesmans M, De Boeck K, Casanova JL, Meyts I, Bossuyt X. Laboratory diagnosis of specific antibody deficiency to pneumococcal capsular polysaccharide antigens by multiplexed bead assay. *Clin Immunol*. 2010 Feb;134(2):198–205. doi: 10.1016/j.clim.2009.10.006. Epub 2009 Nov 13. PMID: 19914139.
65. Goldblatt D, Ashton L, Zhang Y, Antonello J, Marchese RD. Comparison of a New Multiplex Binding Assay versus the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Measurement of Serotype-Specific Pneumococcal Capsular Polysaccharide IgG. *Clin Vaccine Immunol*. 2011 Oct;18(10):1744–51.
66. Campanero-Rhodes MA, Lacombe A, Prat C, García E, Solís D. Development and Evaluation of a Microarray Platform for Detection of Serum Antibodies Against *Streptococcus pneumoniae* Capsular Polysaccharides. *Anal Chem*. 2020 Jun 2;92(11):7437–43.

-
67. Romero-Steiner S, Frasch CE, Carlone G, Fleck RA, Goldblatt D, Nahm MH. Use of Opsonophagocytosis for Serological Evaluation of Pneumococcal Vaccines. *Clin Vaccine Immunol*. 2006 Feb;13(2):165–9.
68. Lee H, Nahm MH, Burton R, Kim KH. Immune Response in Infants to the Heptavalent Pneumococcal Conjugate Vaccine against Vaccine-Related Serotypes 6A and 19A. *Clin Vaccine Immunol*. 2009 Mar;16(3):376–81.
69. Song JY, Moseley MA, Burton RL, Nahm MH. Pneumococcal vaccine and opsonic pneumococcal antibody. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2013;19(3):412–25.
70. Seidel MG, Kindle G, Gathmann B, Quinti I, Buckland M, Van Montfrans J, *et al*. The European Society for Immunodeficiencies (ESID) Registry Working Definitions for the Clinical Diagnosis of Inborn Errors of Immunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2019 Jul;7(6):1763–70.
71. Borgers H, Moens L, Picard C, Jeurissen A, Raes M, Sauer K, *et al*. Laboratory diagnosis of specific antibody deficiency to pneumococcal capsular polysaccharide antigens by multiplexed bead assay. *Clinical Immunology*. 2010 Feb;134(2):198–205.
72. Hansen AT, Söderström A, Jørgensen CS, Larsen CS, Petersen MS, Bernth Jensen JM. Diagnostic Vaccination in Clinical Practice. *Front Immunol*. 2021 Sep 30;12:717873.
73. Englebienne P, Hoonacker AV, Verhas M. Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences. *Spectroscopy*. 2003;17(2–3):255–73.
74. Mariani S, Minunni M. Surface plasmon resonance applications in clinical analysis. *Anal Bioanal Chem*. 2014 Apr;406(9–10):2303–23.

-
75. De Mol NJ, Fischer MJE. Surface Plasmon Resonance: A General Introduction. In: Mol NJ, Fischer MJE, editors. Surface Plasmon Resonance [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2010 [cited 2023 May 8]. p. 1–14. (Methods in Molecular Biology; vol. 627). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-670-2_1
 76. Schuck P. Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1997 Jun;26(1):541–66.
 77. Homola J, Yee SS, Gauglitz G. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 1999 Jan 25;54(1–2):3–15.
 78. Li Z, Leustean L, Inci F, Zheng M, Demirci U, Wang S. Plasmonic-based platforms for diagnosis of infectious diseases at the point-of-care. *Biotechnology Advances.* 2019 Dec;37(8):107440.
 79. Szunerits S, Saada H, Pagneux Q, Boukherroub R. Plasmonic Approaches for the Detection of SARS-CoV-2 Viral Particles. *Biosensors.* 2022 Jul 21;12(7):548.
 80. Takemura K, Adegoke O, Suzuki T, Park EY. A localized surface plasmon resonance-amplified immunofluorescence biosensor for ultrasensitive and rapid detection of nonstructural protein 1 of Zika virus. Xu B, editor. *PLoS ONE.* 2019 Jan 31;14(1):e0211517.
 81. Chou TH, Chuang CY, Wu CM. Quantification of Interleukin-6 in cell culture medium using surface plasmon resonance biosensors. *Cytokine.* 2010 Jul;51(1):107–11.
 82. Esbin MN, Whitney ON, Chong S, Maurer A, Darzacq X, Tjian R. Overcoming the bottleneck to widespread testing: a rapid review of nucleic acid testing approaches for COVID-19 detection. *RNA.* 2020 Jul;26(7):771–83.

-
83. Choi YH, Ko H, Lee GY, Chang SY, Chang YW, Kang MJ, *et al.* Development of a sensitive SPR biosensor for C-reactive protein (CRP) using plasma-treated parylene-N film. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2015 Feb;207:133–8.
84. Vaisocherová H, Faca VM, Taylor AD, Hanash S, Jiang S. Comparative study of SPR and ELISA methods based on analysis of CD166/ALCAM levels in cancer and control human sera. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009 Mar;24(7):2143–8.
85. Yasmeen A, Ringe R, Derking R, Cupo A, Julien JP, Burton DR, *et al.* Differential binding of neutralizing and non-neutralizing antibodies to native-like soluble HIV-1 Env trimers, uncleaved Env proteins, and monomeric subunits. *Retrovirology*. 2014 Dec;11(1):41.
86. Maskus DJ, Bethke S, Seidel M, Kapelski S, Addai-Mensah O, Boes A, *et al.* Isolation, production and characterization of fully human monoclonal antibodies directed to Plasmodium falciparum MSP10. *Malar J*. 2015 Dec;14(1):276.
87. Kanekiyo M, Bu W, Joyce MG, Meng G, Whittle JRR, Baxa U, *et al.* Rational Design of an Epstein-Barr Virus Vaccine Targeting the Receptor-Binding Site. *Cell*. 2015 Aug;162(5):1090–100.
88. Honda-Okubo Y, Ong CH, Petrovsky N. Advax delta inulin adjuvant overcomes immune immaturity in neonatal mice thereby allowing single-dose influenza vaccine protection. *Vaccine*. 2015 Sep;33(38):4892–900.
89. Facchini FA, Minotti A, Luraghi A, Romerio A, Gotri N, Matamoros-Recio A, *et al.* Synthetic Glycolipids as Molecular Vaccine Adjuvants: Mechanism of Action in Human Cells and In Vivo Activity. *J Med Chem*. 2021 Aug 26;64(16):12261–72.

-
90. Adjuvants in malaria vaccine development strategies: A review. *Pathog Infect Dis* [Internet]. 2015 Dec 12 [cited 2023 May 8];1. Available from: <http://www.smartscitech.com/index.php/pid/article/view/1259>.
91. Hearty S, Conroy PJ, Ayyar BV, Byrne B, O’Kennedy R. Surface plasmon resonance for vaccine design and efficacy studies: recent applications and future trends. *Expert Review of Vaccines*. 2010 Jun;9(6):645–64.
92. De Mol NJ, Fischer MJE. Surface Plasmon Resonance: A General Introduction. In: Mol NJ, Fischer MJE, editors. *Surface Plasmon Resonance* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2010 [cited 2023 Jun 3]. p. 1–14. (Methods in Molecular Biology; vol. 627). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-670-2_1.
93. O’Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, *et al.* Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *The Lancet*. 2009 Sep;374(9693):893–902.
94. Ladhani SN, Collins S, Djennad A, Sheppard CL, Borrow R, Fry NK, *et al.* Rapid increase in non-vaccine serotypes causing invasive pneumococcal disease in England and Wales, 2000–17: a prospective national observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018 Apr;18(4):441–51.
95. Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *The Lancet*. 2011 Dec;378(9807):1962–73.
96. Moraga-Llop FA. Enfermedad neumocócica en la era vacunal y emergencia de serotipos. ¿Tendencias temporales y reemplazo de serotipos? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2009 Jan;27(1):1–4.
97. Brodzki N, Frazer-Abel A, Grumach AS, Kirschfink M, Litzman J, Perez E, *et al.* European Society for Immunodeficiencies (ESID) and European Reference Network on Rare Primary Immunodeficiency, Autoinflammatory and Autoimmune

- Diseases (ERN RITA) Complement Guideline: Deficiencies, Diagnosis, and Management. *J Clin Immunol*. 2020;40(4):576-91.
98. Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood*. 2012;119(7):9.
99. van Wilder P, Odnoletkova I, Mouline M, de Vries E. Immunoglobulin Replacement Therapy is critical and cost-effective in increasing life expectancy and quality of life in patients suffering from Common Variable Immunodeficiency Disorders (CVID): A health-economic assessment. Lu K, ed. *PLoS ONE*. 2021;16(3):e0247941.
100. Chinn IK, Orange JS. Immunodeficiency Disorders. *Pediatr Rev* 2019; 40(5):229-42.
101. Oliveira JB, Fleisher TA. Laboratory evaluation of primary immunodeficiencies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(2):S297-S305.
102. Pulvirenti F, Milito C, Cavaliere FM, Mezzaroma I, Cinetto F, Quinti I. IGA Antibody Induced by Immunization With Pneumococcal Polysaccharides Is a Prognostic Tool in Common Variable Immune Deficiencies. *Front Immunol*. 2020;11:1283.
103. Patching, S. G. Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein–ligand interactions and its potential for drug discovery. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 43–55.(2014).
104. Patching SG. Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein–ligand interactions and its potential for drug discovery. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2014 Jan;1838(1):43–55.

-
105. Amendola V, Pilot R, Frascioni M, Maragò OM, Iatì MA. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. *J Phys: Condens Matter*. 2017 May 24;29(20):203002
 106. Shutt CK, Samore M, Carroll KC. Comparison of the Denka Seiken Slide Agglutination Method to the Quellung Test for Serogrouping of *Streptococcus pneumoniae* Isolates. *J Clin Microbiol*. 2004 Mar;42(3):1274–6.
 107. Mudany MA, Kikuchi K, Totsuka K, Uchiyama T. Evaluation of a new serotyping kit for *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Medical Microbiology*. 2003 Nov 1;52(11):975–80.
 108. Heininger U, Bachtar NS, Bahri P, Dana A, Dodoo A, Gidudu J, *et al*. The concept of vaccination failure. *Vaccine*. 2012;30:1265–8.
 109. Butters C, Phuong LK, Cole T, Gwee A. Prevalence of Immunodeficiency in Children With Invasive Pneumococcal Disease in the Pneumococcal Vaccine Era: A Systematic Review. *JAMA Pediatr*. 2019 Nov 1;173(11):1084.
 110. Brodzski N, Frazer-Abel A, Grumach AS, Kirschfink M, Litzman J, Perez E, *et al*. European Society for Immunodeficiencies (ESID) and European Reference Network on Rare Primary Immunodeficiency, Autoinflammatory and Autoimmune Diseases (ERN RITA) Complement Guideline: Deficiencies, Diagnosis, and Management. *J Clin Immunol*. 2020 May;40(4):576–91.
 111. Tan TQ. Pediatric Invasive Pneumococcal Disease in the United States in the Era of Pneumococcal Conjugate Vaccines. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Jul;25(3):409–19.
 112. De Oliveira LH, Camacho LAB, Coutinho ESF, Martinez-Silveira MS, Carvalho AF, Ruiz-Matus C, *et al*. Impact and Effectiveness of 10 and 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccines on Hospitalization and Mortality in Children

- Aged Less than 5 Years in Latin American Countries: A Systematic Review. Borrow R, editor. PLoS ONE. 2016 Dec 12;11(12):e0166736.
113. Domínguez Á, Ciruela P, Hernández S, García-García JJ, Soldevila N, Izquierdo C, *et al.* Effectiveness of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in preventing invasive pneumococcal disease in children aged 7-59 months. A matched case-control study. Melo-Cristino J, editor. PLoS ONE. 2017 Aug 14;12(8):e0183191.
114. Guevara M, Barricarte A, Torroba L, Herranz M, Gil-Setas A, Gil F, *et al.* Direct, indirect and total effects of 13-valent pneumococcal conjugate vaccination on invasive pneumococcal disease in children in Navarra, Spain, 2001 to 2014: cohort and case–control study. *Eurosurveillance* [Internet]. 2016 Apr 7 [cited 2023 Jun 1];21(14). Available from: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.14.30186>.
115. Picazo J, Ruiz-Contreras J, Casado-Flores J, Negreira S, Baquero F, Hernández-Sampelayo T, *et al.* Effect of the different 13-valent pneumococcal conjugate vaccination uptakes on the invasive pneumococcal disease in children: Analysis of a hospital-based and population-based surveillance study in Madrid, Spain, 2007-2015. Melo-Cristino J, editor. PLoS ONE. 2017 Feb 16;12(2):e0172222.
116. Naucler P, Galanis I, Morfeldt E, Darenberg J, Örtqvist Å, Henriques-Normark B. Comparison of the Impact of Pneumococcal Conjugate Vaccine 10 or Pneumococcal Conjugate Vaccine 13 on Invasive Pneumococcal Disease in Equivalent Populations. *Clinical Infectious Diseases*. 2017 Nov 13;65(11):1780-1790.e1.
117. Hu T, Song Y, Done N, Liu Q, Sarpong EM, Lemus-Wirtz E, *et al.* Incidence of invasive pneumococcal disease in children with commercial insurance or Medicaid coverage in the United States before and after the introduction of 7- and

- 13-valent pneumococcal conjugate vaccines during 1998–2018. BMC Public Health. 2022 Sep 5;22(1):1677.
118. Marimon JM, Ardanuy C. Epidemiology of pneumococcal diseases in Spain after the introduction of pneumococcal conjugate vaccines. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2021 Mar;39(3):142–50.
119. Antachopoulos C, Tsolia MN, Tzanakaki G, Xirogianni A, Dedousi O, Markou G, *et al.* Parapneumonic Pleural Effusions Caused by *Streptococcus pneumoniae* Serotype 3 in Children Immunized with 13-Valent Conjugated Pneumococcal Vaccine. Pediatric Infectious Disease Journal. 2014 Jan;33(1):81–3.
120. Mott MP, Caierão J, Cunha GR, Del Maschi MM, Pizzutti K, d'Azevedo P, *et al.* Emergence of serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* after PCV10 associated with a ST320 in adult population, in Porto Alegre, Brazil. Epidemiol Infect. 2019;147:e93.
121. Centers for Disease Control and Prevention. In: Hall E, Wodi AP, Hamborsky J, *et al.* eds. Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. 14th ed. Washington, DC: Public Health Foundation, 2021
122. Darmaun L, Levy C, Lagrée M, Béchet S, Varon E, Dessein R, *et al.* Recurrent Pneumococcal Meningitis in Children: A Multicenter Case–control Study. Pediatric Infectious Disease Journal. 2019 Sep;38(9):881–6.
123. Zainel A, Mitchell H, Sadarangani M. Bacterial Meningitis in Children: Neurological Complications, Associated Risk Factors, and Prevention. Microorganisms. 2021 Mar 5;9(3):535.
124. Hjuler T, Wohlfahrt J, Staum Kaltoft M, Koch A, Biggar RJ, Melbye M. Risks of Invasive Pneumococcal Disease in Children With Underlying Chronic Diseases. Pediatrics. 2008 Jul 1;122(1):e26–32.

-
125. Adebajo TA, Pondo T, Yankey D, Hill HA, Gierke R, Apostol M, *et al.* Pneumococcal Conjugate Vaccine Breakthrough Infections: 2001–2016. *Pediatrics*. 2020 Mar 1;145(3):e20190836.
126. Mungall BA, Hoet B, Nieto Guevara J, Soumahoro L. A systematic review of invasive pneumococcal disease vaccine failures and breakthrough with higher-valency pneumococcal conjugate vaccines in children. *Expert Review of Vaccines*. 2022 Feb 1;21(2):201–14.
127. Ingels H, Schejbel L, Lundstedt AC, Jensen L, Laursen IA, Ryder LP, *et al.* Immunodeficiency Among Children with Recurrent Invasive Pneumococcal Disease. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2015 Jun;34(6):644–51.
128. Pittet LF, Posfay-Barbe KM. Vaccination of immune compromised children—an overview for physicians. *Eur J Pediatr*. 2021 Jul;180(7):2035–47.
129. Erguven M, Kaya B, Hamzah OY, Tufan F. Evaluation of immune response to hepatitis A vaccination and vaccine safety in juvenile idiopathic arthritis. *Journal of the Chinese Medical Association*. 2011 May;74(5):205–8.
130. Le Ng X, Alikhan M, Stark JM, Mosquera RA, Shahrukh Hashmi S, Gonzales T, *et al.* Comparison of pneumococcal vaccination response in children with sickle cell disease: HbSS and HbSC. *Allergologia et Immunopathologia*. 2019 Nov;47(6):564–9.
131. Zimmermann P, Curtis N. Factors That Influence the Immune Response to Vaccination. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Mar 20;32(2):e00084-18.
132. Gonzalez-Rodriguez AP, Contesti J, Huergo-Zapico L, Lopez-Soto A, Fernández-Guizán A, Acebes-Huerta A, *et al.* Prognostic significance of CD8 and CD4 T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*. 2010 Oct;51(10):1829–36.

-
133. Liang F, Loré K. Local innate immune responses in the vaccine adjuvant-injected muscle. *Clin Trans Immunol*. 2016 Apr 29;5(4):e74.
134. Maslinska M, Dmowska-Chalaba J, Jakubaszek M. The Role of IgG4 in Autoimmunity and Rheumatic Diseases. *Front Immunol*. 2022 Jan 25;12:787422.
135. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010 Feb;125(2):S41–52.
136. Zen Y. Pathological characteristics and diagnosis of IgG4-related disease. *La Presse Médicale*. 2020 Apr;49(1):104014.
137. Fitzgerald J, Leonard P, Darcy E, Sharma S, O’Kennedy R. Immunoaffinity Chromatography: Concepts and Applications. In: Walls D, Loughran ST, editors. *Protein Chromatography* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2017 [cited 2023 Jun 3]. p. 27–51. (Methods in Molecular Biology; vol. 1485). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6412-3_3
138. Wu Z, Li K, Zhan S, Tong P, Li X, Yang A, *et al*. Purification of antibody against Ara h 2 by a homemade immunoaffinity chromatography column. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 2017 Sep 14;47(8):841–6.
139. Nilvebrant J. Kinetic Analysis and Epitope Binning Using Surface Plasmon Resonance. In: Rockberg J, Nilvebrant J, editors. *Epitope Mapping Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2018 [cited 2023 Jun 3]. p. 187–205. (Methods in Molecular Biology; vol. 1785). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7841-0_12
140. Drake AW, Klakamp SL. A strategic and systematic approach for the determination of biosensor regeneration conditions. *Journal of Immunological Methods*. 2011 Aug;371(1–2):165–9.

