



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA  Facultat de Medicina i Odontologia

PROGRAMA DE DOCTORADO 3139 MEDICINA

Departamento de Microbiología y Parasitología Clínica

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD
NEUMOCÓCICA INVASIVA EN LA COMUNITAT
VALENCIANA (2007-2018)**

Juan Salvador Frasquet Artés

Licenciado en Medicina

Directora

Dra. María Dolores Gómez Ruiz.

Tutor

Francisco Javier Pemán García

Febrero 2023

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis ha sido para mí una experiencia inolvidable, no solo por todo lo que he aprendido de la investigación científica, sino por los ratos que he compartido con las personas que han formado parte de este trabajo.

Sin duda el primer agradecimiento y mi mayor reconocimiento es para todos los Servicios de Microbiología de los hospitales valencianos. Esta Tesis nace de la dedicación y generosidad de los compañeros que han estado trabajando todos estos años y han compartido su saber. Sin ellos esta Tesis no habría sido posible.

Mi más sincero agradecimiento a los doctores M^a Dolores Gómez y Javier Pemán por el gran trabajo que han realizado en la dirección de esta Tesis. Siempre dispuestos a escuchar y a aportar nuevas ideas. Ambos son un referente de como llegar a ser un microbiólogo brillante.

A la Dra. Ana Gil por su presencia y ayuda en este singular mundo del neumococo.

A todos mis compañeros del Servicio de Microbiología. A su Jefe de Servicio, el Dr. Jose Luis López-Hontangas, por permitir la realización de esta Tesis. A los Drs. Eva García, M^a Pilar Bosch y Patricio Favier por estar siempre disponibles en el laboratorio y ayudarme a buscar soluciones para mis dudas. Al personal de Enfermería y auxiliares siempre dispuestos a prestarme ayuda, y especialmente a los técnicos de laboratorio, que a lo largo de estos años han facilitado el desarrollo de este trabajo, especialmente en el área de biología molecular por su dedicación y paciencia.

A mi familia por todo su cariño y comprensión. A mis padres que habrían disfrutado mucho este momento. A mis hermanos M^a Isabel y Agustín por ser los mejores ejemplos de hermano mayor.

A Mónica y a nuestros hijos Mónica, Agustín Marta y Joan por ser el motor de mi vida, el que me hacen querer ser mejor persona cada día.

“Hay dos maneras de vivir una vida: La primera es pensar que nada es un milagro. La segunda es pensar que todo es un milagro. De lo que estoy seguro es que Dios existe”

Albert Einstein

“Los veterinarios lo tienen más fácil. Por lo menos, no son desorientados por las opiniones de sus pacientes”

Louis Pasteur

A Mónica

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
RESUMEN	17
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	21
I. INTRODUCCIÓN	26
1. IMPORTANCIA HISTÓRICA.	26
2. CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	27
3. FACTORES DE RIESGO.	29
4. FACTORES DE VIRULENCIA.	30
4.1. LA CÁPSULA POLISACÁRIDA.	30
4.2. ÁCIDOS TEICOICOS Y LIPOTEICOICOS.....	32
4.3. PROTEÍNAS DE SUPERFICIE.	32
5. PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA.	35
5.1. ADHESIÓN Y COLONIZACIÓN NASOFARÍNGEA.	36
5.2. INVASIÓN.	38
6. MECANISMOS DE DEFENSA DEL HOSPEDADOR.....	39
6.1. SISTEMA DEL COMPLEMENTO.	39
6.2. INACTIVACIÓN DIRECTA DE COMPONENTES DEL COMPLEMENTO.	43
6.3. INMUNIDAD CELULAR.	44
7. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA INVASIVA.	46
7.1. MUESTRAS.	46
7.2. CULTIVO.....	47
7.3. IDENTIFICACIÓN.....	49
7.4. NUEVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO.	50
7.5. SEROTIPADO.....	53
8. IMPORTANCIA DE LA VACUNACIÓN EN LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA INVASIVA	54
8.1. VACUNAS CONSTITUIDAS POR POLISACÁRIDO CAPSULAR.	55
8.2. VACUNAS CONJUGADAS.	56
8.3. VACUNAS BASADAS EN PROTEÍNAS.	57
8.4. INDICACIONES DE LA VACUNACIÓN.	58
9. TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO Y MECANISMOS DE RESISTENCIA.....	58
9.1. BETALACTÁMICOS.	59
9.2. MACRÓLIDOS.....	61
9.3. QUINOLONAS.....	63

II. OBJETIVOS.....	67
III. MATERIAL Y MÉTODOS.	71
1. DEFINICIÓN DE CASO.	71
2. CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LOS CASOS.	71
3. CONDICIONES DEL CULTIVO.....	72
4. TÉCNICA DE SEROTIPADO.	72
5. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA.....	75
6. TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	76
6.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	76
6.2. AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	76
6.3. SECUENCIACIÓN GENÓMICA.	81
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	82
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	85
1. DISTRIBUCIÓN DE LOS EPISODIOS DE ENI EN LA COMUNITAT VALENCIANA.....	85
2. EVOLUCIÓN DE LOS SEROTIPOS.	89
2.1. ETAPA PRE - PCV13 (2007-2010).	89
2.2. ETAPA POST-PCV13 (2011-2018).	93
2.4. SEROTIPOS AISLADOS EN LCR.	103
3. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD.	105
3.1. ERITROMICINA.....	106
3.2. LEVOFLOXACINO.	110
3.3. PENICILINA.	113
3.4. CEFTRIAXONA.....	119
3.5. AISLADOS MULTIRRESISTENTES.	123
4. ESTUDIO GENÉTICO DE LOS AISLADOS RESISTENTES.	125
4.1. ERITROMICINA.....	125
4.2. LEVOFLOXACINO.	129
4.3. BETALACTÁMICOS.	133
V CONCLUSIONES	141
VI. BIBLIOGRAFÍA.	146

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN Ácido desoxirribonucleico

ARN Ácido ribonucleico.

CBP Proteínas de unión a colina.

CMI Concentración Mínima Inhibitoria

Cols Colaboradores.

CV Comunitat Valenciana

ENI Enfermedad Neumocócica Invasiva.

EN LOC Enfermedad Neumocócica Localizada.

ES Electrospray.

FDA *US Food and Drugs*.

Ig Inmunoglobulinas.

H Hospital.

LCR Líquido cefalorraquídeo.

MALDITOF Matrix-assisted Laser Desorption ionisation Time Of Flight.

MASP Serínproteasa de la vía de las lectinas en el sistema del complemento.

MBL Lectina que se une a residuos glucídicos de N-acetilglucosamina o manosa.

MLST Tipado por secuenciación de múltiples loci.

NGS Técnicas de secuenciación de nueva generación.

OMS Organización Mundial de la Salud.

PAMPs *Pathogen-associated molecular patterns*.

PBPs *Penicillin binding proteins*.

PCR reacción en cadena de la polimerasa.

PCV7 Vacuna conjugada de siete serotipos.

PCV13 Vacuna conjugada de trece serotipos.

pIgR Receptor polimérico de inmunoglobulinas.

PRPs *Pattern-recognition receptors*.

rRNA Ácido ribonucleico ribosómico.

VNP23 Vacuna de polisacáridos 23-valente.

TAAN Técnicas de Amplificación de Ácidos Nucleicos.

VIH Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

RESUMEN

Los datos de prevalencia y distribución de los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* fueron muy útiles para la elaboración de estrategias de control de la infección por neumococo, especialmente con el desarrollo de vacunas conjugadas de los polisacáridos de la cápsula de los serotipos más prevalentes.

Con la comercialización de la vacuna PCV7 en el año 2000, se hizo, más necesario aún, el control de los serotipos circulantes de *S. pneumoniae* causantes de enfermedad neumocócica invasiva (ENI) por su elevada morbi-mortalidad.

En esta Tesis Doctoral se analiza la prevalencia y distribución de los serotipos causantes de ENI en el área de la Comunitat Valenciana durante los años 2007-2018, así como las tasas de sensibilidad a los antibióticos más usados en estos pacientes como eritromicina, levofloxacin, penicilina y especialmente ceftriaxona.

Se trata de un estudio retrospectivo de 3.829 aislados de *S. pneumoniae* de pacientes con ENI, a los que se les realizó el estudio de serotipado y sensibilidad, recogiendo variables demográficas. Posteriormente, en los aislados con sensibilidad disminuida se realizó un estudio mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) para determinar la causa de la resistencia a los distintos antibióticos ensayados.

Entre las características de la población se observó un incremento de ENI en los pacientes mayores de 65 años, pasando del 35,1% en 2007 al 58,4% en 2018, mientras que el grupo de 0-17 años disminuía su incidencia del 15,3% al 9%. Por el contrario, no se observó ninguna variación significativa en los grupos por sexo durante todo el período de estudio.

En la distribución de los serotipos destacan las altas tasas de los serotipos 7 (9,6%), 19A (9,3%), 1 (9,3 %), 14 (9,1%) y 3 (7%); cerca de la mitad de los casos de ENI en 2007 fueron causados por estos cinco serotipos. Entre estos serotipos, solo el 14 estaba incluido en la vacuna PCV7, siendo este el único serotipo de la PCV7 que alcanzó cifras relevantes. Por el contrario, serotipos que en años anteriores presentaron cifras más discretas, como el 1, 7 y 19A, son ahora los más frecuentes.

Con la comercialización de la PCV13 a partir de 2010, los serotipos 7 y 1, incluidos en la nueva vacuna, iniciaron un rápido descenso, algo más lento en el caso del 19A. Sin embargo, las ENI por el serotipo 3, también incluido en la PCV13 aumentaron significativamente. También se observó un importante aumento de ENI por serotipo 8, que antes de la PCV13 apenas tenía importancia, capitalizando el fenómeno de reemplazo casi de manera exclusiva, pasando de 26 (6,5%) casos en 2007 a 76 (18,6%) en 2018; presentando un incremento de casi el 300% en 12 años.

La comercialización de las vacunas PCV7 y PCV13, no solo tuvieron efecto sobre los serotipos circulantes, también fue importante el efecto sobre la tasa de sensibilidad de *S. pneumoniae*,

en concreto sobre penicilina y ceftriaxona. Mientras las tasas de sensibilidad a eritromicina y levofloxacino a penas variaron a lo largo del período de estudio, la tasa de sensibilidad a penicilina pasó del 64,4% en 2007 al 81,6% en 2018; en cambio, la de ceftriaxona se incrementó del 88,4% en 2007 al 96,4% en 2018. En contra de lo que se podría suponer, las tasas de sensibilidad a penicilina y ceftriaxona aumentaron en el transcurso de los años al incluir las vacunas serotipos con tasas de resistencia más altas como el 14 y el 19A. Con La introducción de la PCV7, que incluye el serotipo 14, y posteriormente la PCV13, que incluye a ambos serotipos, se observó una disminución de la resistencia de manera paralela a la disminución de la prevalencia de los serotipos 14 y 19A. Además, los serotipos que aumentaron después de la PCV13, en el llamado fenómeno de reemplazo, se caracterizaron por sus altas tasas de sensibilidad a penicilina, como los serotipos 3 y 8. Tan solo el serotipo 15A presentó mayores tasas de resistencia, pero su incidencia no alcanzó, por el momento, a los niveles de los serotipos 14 y 19A.

En los aislados resistentes a alguno de los cuatro antibióticos analizados se estudió el mecanismo de resistencia mediante TAAN. En los resistentes a eritromicina la presencia del gen *erm* fue la causa más frecuente de resistencia, destacando serotipos como 24B/F (71,4% de aislados resistentes a eritromicina), 15A (67,9%), 33F (66,1%) y 6C (59,3%). En estos cuatro serotipos, el gen *erm* fue detectado en más del 90% de los aislados, sobresaliendo el serotipo 24B/F donde de los 43 aislados analizados este gen fue detectado en 41 aislados (95,3%). Por el contrario, el gen *mef*, segunda causa de resistencia a eritromicina, presentó una fuerte asociación con el serotipo 14, aunque con datos mucho más discretos.

En el caso de levofloxacino, en tan solo 36 (2,3%) aislados la CMI de levofloxacino fue mayor de 2 mg/L. Este bajo índice de resistencias hace imposible sacar conclusiones respecto a serotipos relacionados con resistencia a quinolonas. Las mutaciones detectadas con mayor frecuencia fueron S81F para el gen *GyrA* y para el gen *ParC* S79F y K137N. Las mutaciones detectadas en *GyrB* y *ParE* no fueron relevantes.

Por último, en los aislados con sensibilidad disminuida a penicilina y ceftriaxona la presencia de mutaciones en la PBP 1a se asoció a tasas altas de resistencia a penicilina, así como a una elevación de las CMI de ceftriaxona, aunque la mayoría siguen siendo sensibles, mientras que con las PBP 2b y 2x no hubo ningún aislado resistente a penicilina, si bien las CMI en los aislados con 2b fueron más altas que las de los aislados con 2x, y solo un aislado con PBP 2x fue ceftriaxona-intermedia. Por serotipos destaca el 14, en el cual la mutación en la PBP 1a fue detectada en 10 (71,4%) aislados. La mutación en PBP 1a también fue la más detectada en el serotipo 11A con cuatro aislados de siete (71,4%). Un tercer serotipo con un marcado predominio de una PBP fue el serotipo 23B, en el cual, de seis aislados estudiados en cinco se detectó la PBP 2b.

Si comparamos las mutaciones en las PBP detectadas con las CMI de penicilina obtenidas destaca la PBP1a, en el cual, de los diecinueve aislados detectados en quince (78,9%) la CMI de penicilina fue >2 mg/L. Por el contrario, en los 24 aislados en los que se detectaron las otras PBP, ninguno de la CMI de penicilina fue >2 mg/L y permanecieron con sensibilidad intermedia, aunque con valores de CMI más elevados de lo habitual. Es importante destacar que de los 23 aislados en los que no se detectó ningún amplicón, en once (44%) la CMI de

penicilina fue >2 mg/L, casi todos a expensas del serotipo 19A. Las CMI de ceftriaxona también fueron elevadas, pero sin llegar al nivel de resistencia de la penicilina. De los veintiún aislados con PBP1a en un sólo aislado (serotipo 14) la CMI fue >2 mg/L en 9 aislados la sensibilidad fue intermedia y 11 fueron sensibles, aunque con CMI más elevadas de lo habitual.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características fenotípicas de <i>S. pneumoniae</i> en cultivo.	50
Tabla 2. Serotipos incluidos en los sueros polivalentes.	73
Tabla 3. Esquema de aglutinación de serogrupos con varios serotipos.	74
Tabla 4. Composición de la mezcla de reacción.	76
Tabla 5. Hospitales participantes en la red de vigilancia de ENI en la CV y número de aislados por año.	85
Tabla 6. Comparación serotipos más frecuentes con serotipos vacunales* en el año 2007.	90
Tabla 7. Evolución anual de episodios de ENI por los serotipos más frecuentes n (%).	92
Tabla 8. Evolución anual de los serotipos más frecuentes en LCR.	104
Tabla 9. Comparación de episodios de meningitis con ENI global.	104
Tabla 10. Sensibilidad a eritromicina de las cepas de <i>S. pneumoniae</i> recuperadas cada año.	107
Tabla 11. Evolución anual de la CMI ₉₀ y CMI ₅₀ de eritromicina en <i>S. pneumoniae</i>	108
Tabla 12. Sensibilidad a levofloxacino de las cepas de <i>S. pneumoniae</i> recuperadas cada año.	110
Tabla 13. Evolución anual de la CMI ₉₀ y CMI ₅₀ de levofloxacino en <i>S. pneumoniae</i>	111
Tabla 14. Sensibilidad a penicilina de las cepas de <i>S. pneumoniae</i> recuperadas cada año.	114
Tabla 15. Evolución anual de la CMI ₉₀ y CMI ₅₀ de penicilina en <i>S. pneumoniae</i>	115
Tabla 16. Sensibilidad a ceftriaxona de las cepas de <i>S. pneumoniae</i> recuperadas cada año.	120
Tabla 17. Evolución anual de la CMI ₉₀ y CMI ₅₀ de ceftriaxona en <i>S. pneumoniae</i>	121
Tabla 18. Sensibilidad <i>in vitro</i> de los serotipos multirresistentes a los 4 antibióticos analizados (S: sensible, I: intermedio, R: resistente).	124
Tabla 19. Correlación entre la CMI de eritromicina y la presencia de genes de resistencia.	126
Tabla 20. Serotipos de <i>S. pneumoniae</i> con el gen de resistencia <i>erm</i> detectado.	127
Tabla 21. Serotipos de <i>S. pneumoniae</i> con el gen de resistencia <i>mef</i> detectado.	128
Tabla 22. Mutaciones detectadas en aislados de <i>S. pneumoniae</i> resistentes a levofloxacino.	132
Tabla 23. Serotipos de <i>S. pneumoniae</i> con mutaciones detectadas en las PBPs.	137
Tabla 24. Correlación entre las mutaciones de las PBPs detectadas y la CMI de penicilina y ceftriaxona.	138

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen de <i>S. pneumoniae</i> en un hemocultivo positivo. Tinción de Gram (1000x).	27
Figura 2. Colonias de <i>S. pneumoniae</i> en agar sangre a las 24h de incubación en atmósfera con 10% de CO ₂	28
Figura 3. Halo de inhibición de <i>S. pneumoniae</i> generado por un disco de optoquina.	29
Figura 4. Esquema de la pared celular y cápsula del neumococo.	31
Figura 5. Esquema de las proteínas de membrana ancladas en membrana y pared celular del neumococo.	33
Figura 6. Patogenia de la enfermedad neumocócica.	36

Figura 7. Resumen de las acciones del sistema del complemento.....	40
Figura 8. Esquema de las tres vías de activación del complemento.....	41
Figura 9. Descripción general de los diferentes PRRs implicados en el reconocimiento de los PAMPs del neumococo. (Adaptado de Koppe <i>et al.</i> 2012).	45
Figura 10. Colonias mucosas de <i>S. pneumoniae</i> (serotipo 3).	47
Figura 11. Colonias de <i>S. pneumoniae</i> con depresión central por el fenómeno de autólisis y alfa-hemólisis alrededor de la colonia.	48
Figura 12. Observación de la variación de la fase neumocócica en la morfología de las colonias.	49
Figura 13. Detección de antígeno de <i>S. pneumoniae</i> por inmunocromatografía.....	51
Figura 14. Espectros generados por <i>S. pneumoniae</i> en la técnica MALDITOF.	53
Figura 15. Determinantes genéticos de la sensibilidad a betalactámicos y su posicionamiento relativo en el cromosoma de <i>S. pneumoniae</i>	60
Figura 16. Antibiograma de <i>S. pneumoniae</i> con la técnica E-test de una cepa resistente a eritromicina.	75
Figura 17. Amplificación de cepas de <i>S. pneumoniae</i> con resistencia a macrólidos.	78
Figura 18. Casos anuales de ENI en la CV durante el periodo del estudio.	86
Figura 19. Distribución por sexo de los episodios de ENI en el periodo de estudio.	87
Figura 20. Distribución por grupos de edad de los episodios de ENI en el periodo de estudio.	88
Figura 21. Distribución (%) por grupos de edad de los episodios de ENI.....	88
Figura 22. Evolución temporal de los serotipos incluidos en la vacuna PCV7.....	90
Figura 23. Comparación anual de los casos producidos por serotipos de la PCV7 con los casos totales.	91
Figura 24. Evolución anual (en %) de los casos producidos por serotipos de la PCV7.....	91
Figura 25. Evolución temporal (en %) de los casos producidos por los nuevos serotipos incluidos en la PCV13 antes de su comercialización (1, 3, 5, 6A, 7F y 19A).	93
Figura 26. Evolución anual de los serotipos incluidos en la vacuna PCV13 y del serotipo 8 en número de casos.....	94
Figura 27. Evolución anual de los episodios de ENI causados por el serotipo 1.	95
Figura 28. Evolución anual de los episodios de ENI causados por el serotipo 7F.....	95
Figura 29. Evolución anual de los episodios de ENI causados por el serotipo 19A.	96
Figura 30. Evolución anual de los episodios de ENI causados por el serotipo 14.....	96
Figura 31. Evolución temporal de los episodios de ENI causados por el serotipo 3.....	97
Figura 32. Evolución anual de los episodios causados por el serotipo 8.	98
Figura 33. Evolución anual de los nuevos serotipos (8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F y 33F) de la futura vacuna PCV20 aislados desde 2011 en nuestro estudio.	100
Figura 34. Evolución anual de los nuevos serotipos a incluir en la próxima vacuna PCV20.	101
Figura 35. Evolución anual de los serotipos 9N, 15A, 6C y 24BF, no incluidos en la futura vacuna PCV20.	102
Figura 36. Evolución de los aislamientos de los serotipos 6C, 9N, 15A y 24B/F de 2011 a 2018.	102
Figura 37. Aislamientos (n) en otros líquidos orgánicos.	103
Figura 38. Tasa de sensibilidad de <i>S. pneumoniae</i> a los antibióticos ensayados.	106
Figura 39. Evolución anual de la tasa de sensibilidad de <i>S. pneumoniae</i> a eritromicina.....	107
Figura 40. Principales serotipos <i>S. pneumoniae</i> resistentes a eritromicina.....	109

Figura 41. Tasas de resistencia de <i>S. pneumoniae</i> a eritromicina según serotipo.	109
Figura 42. Evolución anual de la tasa de sensibilidad de <i>S. pneumoniae</i> a levofloxacino.	111
Figura 43. Serotipos de <i>S. pneumoniae</i> con sensibilidad disminuida a levofloxacino.	112
Figura 44. Comparación de las tasas de resistencia a levofloxacino de los principales serotipos con los serotipos más resistentes.	112
Figura 45. Evolución anual de la tasa de sensibilidad de <i>S. pneumoniae</i> a penicilina.	114
Figura 46. Serotipos de <i>S. pneumoniae</i> resistentes a penicilina.....	116
Figura 47. Serotipos de <i>S. pneumoniae</i> con las tasas más altas de resistencia a penicilina. En azul resistentes.	116
Figura 48. Evolución anual de la tasa de sensibilidad a penicilina comparada con el número de aislados de los serotipos 14 y 19A.	117
Figura 49. Evolución anual de los serotipos con las tasas de resistencia a penicilina más elevadas.....	118
Figura 50. Comparativa de las tasas de sensibilidad de los serotipos más resistentes a penicilina con los serotipos 3 y 8.....	118
Figura 51. Evolución anual de la tasa de sensibilidad de <i>S. pneumoniae</i> a ceftriaxona.	120
Figura 52. Serotipos de <i>S. pneumoniae</i> resistentes a ceftriaxona.....	121
Figura 53. Comparativa entre el número de aislados de los serotipos 14 y 19A con sensibilidad disminuida a penicilina y la tasa de sensibilidad a ceftriaxona.	122
Figura 54. Serotipos de <i>S. pneumoniae</i> con aislados multirresistentes.....	123
Figura 55. Detección de los genes <i>mef</i> y <i>erm</i> en <i>S. pneumoniae</i>	127
Figura 56. Detección de mutación en gen <i>gyrA</i> de <i>S. pneumoniae</i> por técnica NGS.	130
Figura 57. Detección del cambio de aminoácido tras la mutación en gen <i>gyrA</i> de <i>S. pneumoniae</i> : mutación S81F.....	131
Figura 58. PBPs de <i>S. pneumoniae</i> detectadas.....	134
Figura 59. Detección de mutaciones en <i>pbp2x</i> de <i>S. pneumoniae</i> por las técnicas NGS.....	135
Figura 60. Detección del cambio de aminoácido generado tras la mutación en el gen <i>pbp2x</i> de <i>S. pneumoniae</i>	136

I INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. IMPORTANCIA HISTÓRICA.

Los primeros aislados de *Streptococcus pneumoniae* en muestras de pacientes datan de 1880 y se realizaron por Louis Pasteur y George M. Sternberg, a pesar de que el primero en visualizar un microorganismo de morfología compatible con *S. pneumoniae* en muestras de esputo y biopsia de pulmón fue Edwin Klebs en 1875¹. Pasteur y Sternberg describieron, de forma independiente y casi simultánea, el aislamiento de un microorganismo procedente de líquidos biológicos de pacientes fallecidos, capaz de causar enfermedad sistémica en conejos^{1,2}. Históricamente, esta bacteria ha recibido distintos nombres: *Micrococcus pasteurii* en 1881, *Micrococcus pneumoniae* (Klein, 1884), más tarde *Diplococcus pneumoniae* (Weichselbaum, 1886) y *S. pneumoniae* (Chester, 1901), si bien el término más usado fue *D. pneumoniae*, que permaneció vigente hasta 1974, cuando empieza a utilizarse el término *Streptococcus pneumoniae* por su disposición en cadenas. La definitiva denominación *S. pneumoniae* fue aceptada en 1980³.

Actualmente, *S. pneumoniae* (neumococo) es la principal causa de neumonía bacteriana adquirida en la comunidad, así como la causa más frecuente de meningitis bacteriana en adultos y en niños. A partir de la puerta de entrada respiratoria, es capaz de causar diversas infecciones que van desde infecciones relativamente leves, como la otitis media y la conjuntivitis, hasta cuadros más graves como neumonías invasivas, septicemia y meningitis.

Según los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la neumonía es la principal causa individual de mortalidad infantil en todo el mundo, siendo *S. pneumoniae* la causa más común de neumonía bacteriana en niños y el responsable de un millón de muertes al año⁴. Debido a las tasas de mortalidad y a la expansión de los mecanismos de resistencia del neumococo, la OMS consideró en 2017 al neumococo como un patógeno prioritario para el desarrollo de nuevos antimicrobianos.

Desde su descubrimiento, el neumococo ha despertado un gran interés para la realización de numerosos estudios encaminados a la prevención de la enfermedad neumocócica y su tratamiento. En 1891, Felix y George Klemperer⁵ observaron que el suero de conejos, previamente inoculados con neumococos inactivados por calor, era capaz de proteger frente a una reinfección con la misma cepa infectante pero no necesariamente frente a otros aislados clínicos; también observaron que cuando los animales no sensibilizados recibían una dosis de suero procedente de conejos inmunizados, la protección frente a la misma cepa aumentaba, introduciéndose así el concepto de inmunidad humoral.

En 1917 Avery y su equipo de investigación describieron “una sustancia soluble y elaborada de forma específica por *S. pneumoniae*, que se excreta en la orina de los pacientes con neumonía neumocócica”. Años después consiguieron aislar y precipitar dicha sustancia de un

neumococo, observando que se trataba de un polisacárido, convirtiéndose en el primer antígeno no proteico identificado⁶.

En 1928, Griffith demostró que una infección mixta con neumococos capsulados pero muertos por calor y neumococos vivos no capsulados (y, por tanto, avirulentos) causaba la muerte de algunos animales. Al estudiar las bacterias recuperadas de los animales muertos observó que la bacteria no capsulada había adquirido una cápsula serológicamente idéntica a la de las bacterias muertas⁷. Será Avery en los años siguientes quien determinará el papel del ADN en la transformación de las bacterias y no la sustancia de la cápsula⁸.

Tras este descubrimiento se realizaron estudios sobre el papel que jugaba esta molécula en la aglutinación frente a los antisueros descritos, llegando a la conclusión de que los anticuerpos generados frente a la cápsula eran los responsables de la inmunidad frente a la infección neumocócica. Así se abrió una nueva línea de investigación en torno a las características químicas y rutas de síntesis de los diferentes polisacáridos conocidos hasta el momento. Fueron necesarios aun varios años hasta definir los más de 90 serotipos que actualmente pueden diferenciarse tanto en la clasificación por el sistema americano, como en la clasificación danesa, desarrollada en el Statens Serum Institute en Copenhague (<http://www.ssi.dk/>).

2. CARACTERÍSTICAS GENERALES.

S. pneumoniae es una bacteria Grampositiva de 0,5-1 μm de longitud y de forma cocoide con extremos lanceolados. Generalmente se presenta en forma de diplococos, de ahí que hasta la década de los setenta se le denominaba *Diplococcus pneumoniae* (Figura 1). El hábitat natural del neumococo es la nasofaringe humana y la colonización puede tener lugar poco tiempo después del nacimiento.

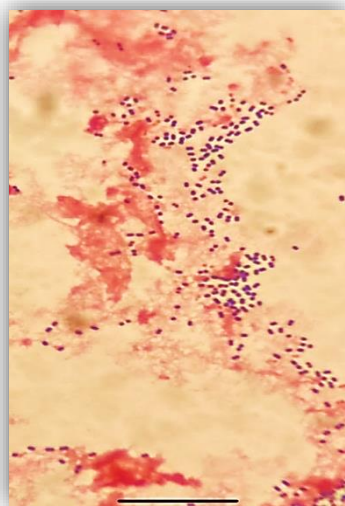


Figura 1. Imagen de *S. pneumoniae* en un hemocultivo positivo. Tinción de Gram (1000x).

S. pneumoniae es inmóvil, no forma esporas y es α -hemolítico, cuando se cultiva en agar sangre en aerobiosis, por oxidación de la hemoglobina formando metahemoglobina⁹ debido a la producción de peróxido de hidrógeno (Figura 2)¹⁰. Es microaerófilo (prolifera mejor a tensiones bajas de oxígeno), catalasa negativo y sensible a las sales biliares como el desoxicolato sódico^{11,12}, detergente que potencia la acción incontrolada de la principal autolisina (LytA) que degrada la pared celular; esta sensibilidad ha sido muy útil para su identificación.

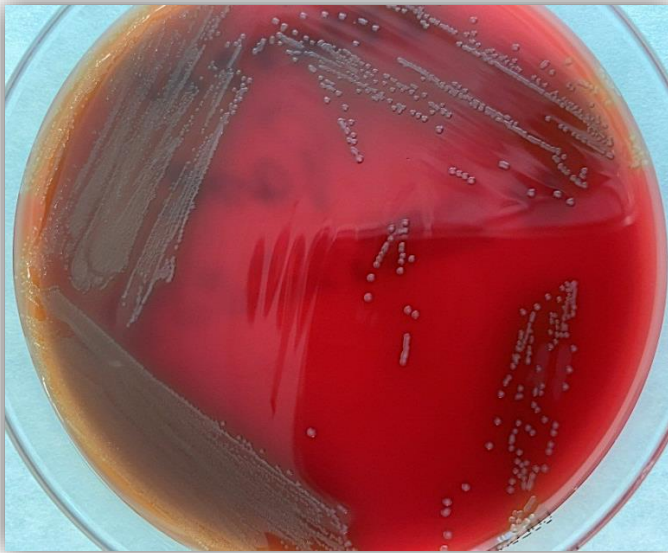


Figura 2. Colonias de *S. pneumoniae* en agar sangre a las 24h de incubación en atmósfera con 10% de CO₂.

La prueba clásica más utilizada para la identificación del neumococo en el laboratorio se basa en su sensibilidad a la optoquina¹³, un derivado de la quinina que actúa como inhibidor específico de determinadas proteínas que forman parte de la subunidad F₀ de la ATPasa protón-motriz del neumococo (Figura 3)^{14,15}.



Figura 3. Halo de inhibición de *S. pneumoniae* generado por un disco de optoquina.

3. FACTORES DE RIESGO.

Existe una gran variabilidad en las tasas de incidencia de la enfermedad neumocócica invasiva (ENI) en diferentes estudios y regiones geográficas, habiéndose reportado tasas que varían entre 68 y 7000 casos por 100.000 personas/año, dependiendo de la metodología utilizada y la población de estudio¹⁶.

La incidencia de la ENI es especialmente alta en ciertos grupos de edad, entre los que se encuentran los niños menores de 2 años y la población mayor de 65 años¹⁷. El sistema inmune de la población pediátrica, al no estar completamente desarrollado, tiene una menor capacidad para responder a los antígenos polisacáridos, lo que se manifiesta en una mayor vulnerabilidad a determinadas infecciones bacterianas.

Existen diversos factores de riesgo que predisponen a padecer ENI¹⁸: inmunodeficiencias congénitas¹⁹, infecciones respiratorias previas o concomitantes, especialmente las de origen vírico²⁰, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)²¹, leucemia y linfomas²², medicación inmunosupresora²³, alcoholismo y tabaquismo^{24,25}, deficiencias en diferentes componentes del complemento²⁶ o deficiencias genéticas en componentes relacionados con el reconocimiento de patógenos, lo que demuestra la importancia de los sistemas de detección y vigilancia del hospedador frente a *S. pneumoniae*²⁷. Además, es conocida la predisposición a la ENI de los pacientes esplenectomizados²⁸, ya que el bazo tiene un papel fundamental en la defensa del organismo frente a *S. pneumoniae*. Los neumococos que han sido opsonizados se

eliminan por el hígado, pero las células de *S. pneumoniae* que han sido capaces de escapar a la opsonización se eliminan por el bazo donde se prolonga el contacto de los microorganismos con las células del sistema reticuloendotelial en los cordones de Billroth. Por ello, la vacunación frente a neumococo está altamente recomendada en estos pacientes.

4. FACTORES DE VIRULENCIA.

Tanto si se presentan de manera aislada o simultánea, los factores de virulencia permiten a los microorganismos colonizar e invadir al hospedador facilitando su adhesión a los tejidos, así como dotarle de la capacidad de invasión o de evasión del sistema inmune del hospedador. En el neumococo los factores de virulencia más conocidos son la cápsula polisacárida y determinadas proteínas de superficie²⁹⁻³².

4.1. La cápsula polisacárida.

La cápsula polisacárida es el principal factor de virulencia del neumococo. Confiere al microorganismo una importante capacidad de evasión fagocítica³³. Entre otras funciones de esta estructura está la de mantener hidratada la célula y, gracias a su naturaleza polianiónica, modula la entrada y salida de iones y nutrientes del microorganismo, favorece la adherencia a superficies orgánicas e inorgánicas y también está implicada, aunque existen otros mecanismos coadyuvantes, en la formación de biopelículas. La cápsula del neumococo está formada por polímeros de alto peso molecular, de oligosacáridos repetidos, formados por entre 2 y 8 monosacáridos, unidas al peptidoglicano o a componentes de la membrana celular. Tanto la naturaleza de los azúcares que la componen, como el tipo de unión química que hay entre ellos define la estructura para cada serotipo (Figura 4). Está presente alrededor de toda la bacteria y es soluble en soluciones polares; por tanto, es soluble en suero y orina.

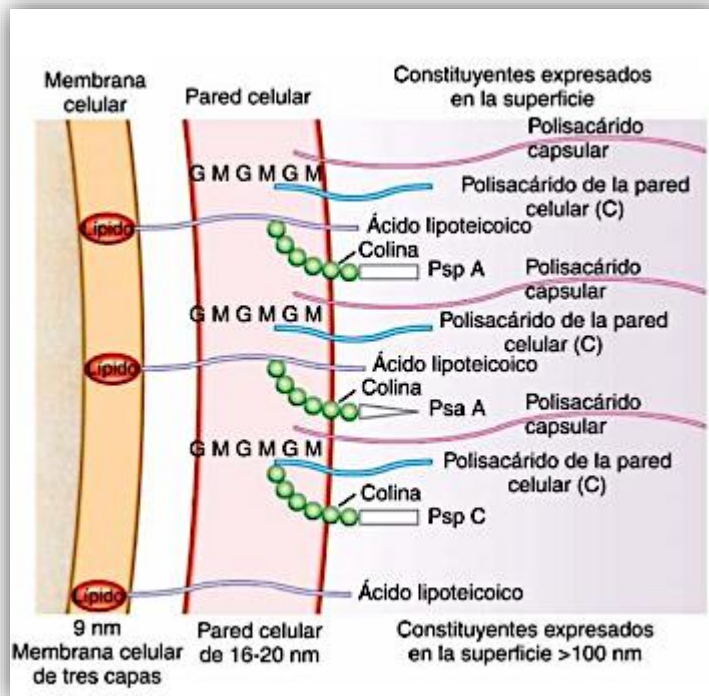


Figura 4. Esquema de la pared celular y cápsula del neumococo (Modificado de Drijconingen & Rohde. Clin Microbiol Infect, 2014).

En 1902, Neufeld desarrolló un método para diferenciar el neumococo de otros estreptococos que consistía en enfrentarlo a sueros de conejos inmunizados con sangre de diferentes pacientes y observar la aglutinación característica, técnica a la que denominó “Quellung test”. Gracias a esta técnica, se estableció la primera clasificación en función de la respuesta del neumococo frente a diferentes sueros, describiéndose en un primer momento cuatro serotipos o tipos: I, II, III y IV³⁴.

En la actualidad se han caracterizado más de 100 serotipos capsulares inmunológicamente diferentes³⁵, 90 de los cuales ya estaban descritos en 1995³⁶. Los serotipos capsulares se agrupan en 46 serogrupos numerados del 1 al 48 (los serotipos 26 y 30 no se utilizan). Algunos serogrupos (1, 2 y 3) contienen un único serotipo, mientras que el serogrupo 11 contiene hasta 6 serotipos. Normalmente el primer serotipo descrito en un serogrupo con varios serotipos se identifica con la letra F (de la palabra inglesa *first*) y los siguientes con las letras A, B, C, etc. Existen 3 excepciones sin letra F: el serogrupo 6 que contiene cuatro serotipos 6A, 6B, 6C y 6D; el 20 con los serotipos 20A y 20B; y el serogrupo 9 cuyos tres primeros serotipos descritos³⁷ hacen referencia a personajes históricos (L por Lederle, N por Neufeld y V por Valdemar, un príncipe danés muerto en 1938 por una neumonía bacteriémica y del que se aisló el primer neumococo de este serotipo³⁶).

Los anticuerpos anticapsulares fueron descritos como protectores en modelos animales, convirtiendo a la cápsula en un objetivo prometedor para el desarrollo de vacunas. Sin

embargo, la elevada diversidad capsular junto con las variaciones existentes en la capacidad inmunógena de los distintos polisacáridos ha complicado la elaboración de vacunas basadas en el polisacárido capsular.

4.2. Ácidos teicoicos y lipoteicoicos.

Son moléculas de estructura polisacárida que incluyen una cadena lipídica en su composición. Normalmente la unión de la zona lipídica se produce por un enlace fosfodiéster a un grupo glicerol fosfato, que en el caso de *S. pneumoniae* se une un ribitol fosfato que además lleva intercalados residuos de tetrasacáridos como componentes de la membrana; por tanto, la estructura molecular de estos compuestos en el neumococo es específica y diferente a la estructura en otras bacterias Gram positivas.

El ácido teicoico se describió por primera vez en 1930 como el polisacárido C soluble. Presenta dos residuos de fosfatidilcolina y se encuentra expuesto en la superficie, anclado a la pared celular.

Además de comportarse como moléculas inductoras de la respuesta humoral, los ácidos teicoicos y lipoteicoicos promueven la activación de la cascada del complemento y la regulación de la distribución de las enzimas autolíticas (como la neumolisina) en la célula, para las cuales es imprescindible la presencia de colina.

4.3. Proteínas de superficie.

Además de los polisacáridos de la cápsula, el neumococo sintetiza una gran variedad de proteínas de superficie, muchas de las cuales son consideradas factores de virulencia ya que son esenciales en la patogénesis de la infección neumocócica.

Hasta el momento se han identificado cuatro grupos principales de proteínas de superficie³²: proteínas de unión a colina, proteínas LPXTG, lipoproteínas y proteínas atípicas de superficie o *moonlighting*³⁸ (Figura 5).

4.3.1. Proteínas de unión a colina (cbp).

Las CBPs se encuentran ancladas de un modo específico a los residuos de colina de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos neumocócicos. La familia de las CBP incluye algunos factores de virulencia involucrados en la adhesión celular y la colonización.

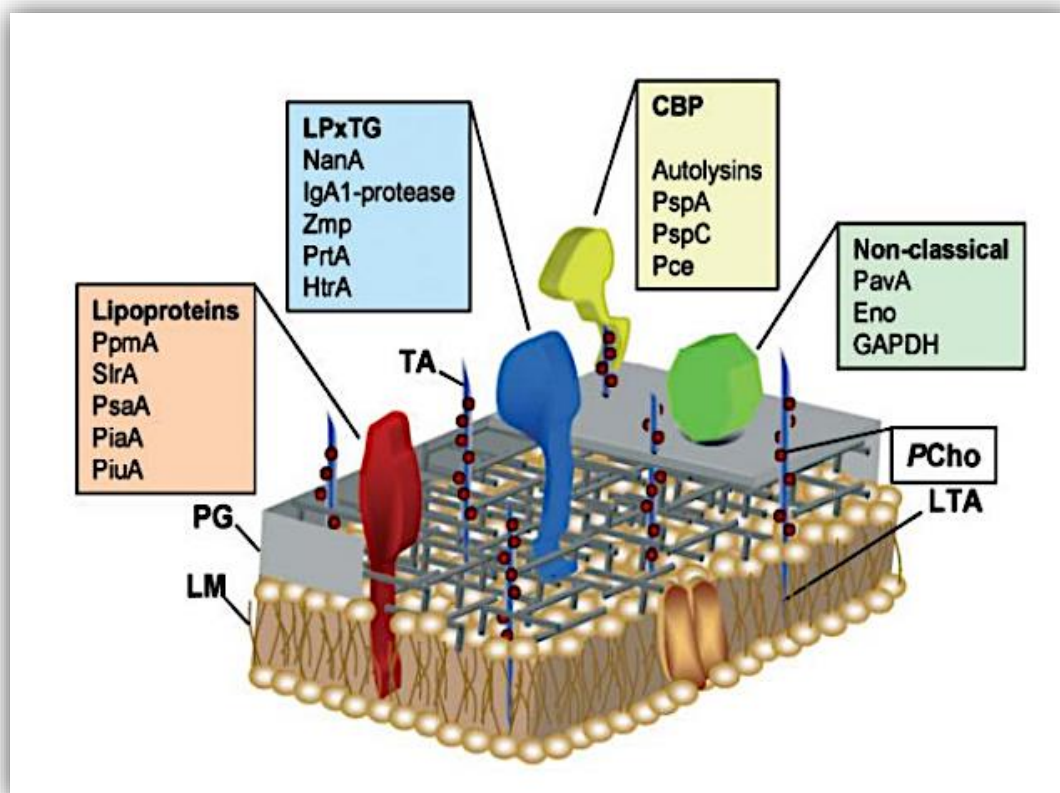


Figura 5. Esquema de las proteínas de membrana ancladas en membrana y pared celular del neumococo (de Bergmann S & Hammerschmidt S. Microbiology, 2006).

De entre los aproximadamente 16 tipos de CBPs descritos en el neumococo algunas pueden causar eventualmente la lisis y, por tanto, muerte de la bacteria, en cuyo caso se llaman autolisinas. La NAM-Amidasa LytA³⁹ y la lisozima LytC⁴⁰ son las dos únicas autolisinas conocidas del neumococo. LytA está considerada como uno de los factores de virulencia más importantes de la bacteria debido a su capacidad de producir autólisis espontánea y la consiguiente liberación de la neumolisina Ply al medio extracelular^{41,42}. El papel de esta proteína en la virulencia y patogénesis ha sido demostrado en diferentes modelos animales de infección^{41,43}. LytA es también responsable de la intensa respuesta inflamatoria característica de la infección neumocócica al liberar componentes altamente proinflamatorios como fragmentos de la pared celular, ácidos teicoicos y lipoteicoicos, tras la lisis bacteriana⁴⁴. Asimismo, se considera que LytA participa indirectamente en la evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador mediada por el sistema del complemento y la fagocitosis al liberar la neumolisina Ply⁴⁵. Por otra parte, se ha demostrado que la administración parenteral de LytA es capaz de reducir los

niveles bacterianos en un modelo de sepsis⁴⁶ e incluso de desintegrar con gran eficacia las biopelículas producidas *in vitro* por el neumococo⁴⁷. Además, la inmunización con LytA ha demostrado poseer un efecto protector frente a una posterior infección neumocócica, lo que posibilita nuevas dianas para posibles vacunas⁴⁸.

La lisozima LytC se comporta como una autolisina a 30°C, lo cual sugiere un papel importante en el tracto respiratorio superior⁴⁰. Además, es esencial en un proceso característico del neumococo que le permite lisar a neumococos no competentes⁴⁹.

LytB es una CBP con actividad N-acetilglucosaminidasa que está implicada en la separación de las células hijas al final de la división celular⁵⁰ y, posiblemente, en la adhesión del neumococo a las células de la nasofaringe humana⁵¹. También es importante para la formación de biopelículas⁵².

PspC, también conocida como CbpA, SpsA y PbcA, es la CBP más abundante en el neumococo y participa en la patogénesis gracias a distintos mecanismos⁵³. Está implicada en la adherencia a las células del hospedador y en la colonización bacteriana⁵⁴. Se han identificado posibles epítopos de unión al factor H en la región N-terminal de PspC^{55,56}. Cuando el factor H se une a la superficie del neumococo vía PspC se incrementa la adhesión del microorganismo a las células del hospedador. Además del factor H, el PspC es capaz de reclutar otro regulador negativo del complemento, en este caso de la ruta clásica, la proteína de unión al factor Cab del complemento o C4BP, lo que permitiría al neumococo evadir eficazmente la activación del componente C3b^{57,58}.

Otras CBPs con importantes funciones incluyen:

- PspA, participa en patogénesis al facilitar la evasión de la activación de la vía alternativa de complemento y previniendo los efectos bactericidas de la lactoferrina humana^{59,60}.
- Fosforilcolín esterasa Pce o CbpE, participa en la adhesión a las células de la nasofaringe humana⁶¹.
- PcpA, inicialmente propuesta como adhesina⁶², se ha demostrado que, usándola como vacuna, protege significativamente utilizando modelos murinos de neumonía y sepsis⁶³. También participa en la adherencia del neumococo a células epiteliales de nasofaringe y pulmón⁶⁴ y es capaz de inducir la formación de anticuerpos funcionales en humanos⁶⁵.

4.3.2. Proteínas LPXTG.

Este grupo de proteínas las podemos encontrar en otras bacterias Gram positivas y contienen un motivo LPXTG responsable de su unión covalente a la pared celular.

Más de 18 proteínas de este tipo han sido descritas en *S. pneumoniae*, aunque este número puede variar en las distintas cepas, la mayoría de las cuales posee actividad enzimática, son adhesinas o ambas³². Las adhesinas ayudan al patógeno a unirse a las células y tejidos al

reconocer receptores del huésped en un paso que es crítico para establecer con éxito una infección⁶⁶. Hay un total de seis glicosil hidrolasas (StrH, NanA, BgaA, EndoD, SpuA y Eng), una enzima con actividad polisacárido liasa (SpnHL) y cuatro proteasas (ZmpA, ZmpB, ZmpC y PtrA). Sus sustratos son glicoproteínas, que son fundamentales para la mayoría de los procesos biológicos, incluido el sistema inmune humano. Por lo tanto, la hidrólisis de estos sustratos puede tener efectos muy importantes como comprometer el sistema inmunitario del huésped, promoviendo la adherencia y migración por los tejidos del huésped o creando una fuente de nutrientes para el patógeno⁶⁷.

4.3.3. Lipoproteínas.

Las lipoproteínas bacterianas se modifican en su grupo N-terminal con la adición de un grupo N-acil diacilglicerilo que las ancla a la membrana lo que refleja el papel esencial de estas lipoproteínas en la supervivencia bacteriana.

Hay aproximadamente 50 descritas, de las cuales unas 25 son transportadores, otras participan en el proceso de plegamiento de proteínas y, en otras, sigue sin conocerse su función fisiológica en el neumococo⁶⁸.

4.3.4. Proteínas atípicas de superficie.

Son proteínas intracelulares que no deberían establecer relación directa con el hospedador; sin embargo, son accesibles desde el exterior y pueden facilitar la adhesión a las células del hospedador²⁹. Entre ellas destacan PavA (*pneumococcal adhesion and virulence protein A*) y PavB, adhesinas con un papel importante en la colonización.

5. PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA.

Una vez establecida la colonización nasofaríngea, la enfermedad neumocócica se produce cuando la bacteria se disemina hasta el oído medio, el tracto respiratorio inferior o el torrente circulatorio, provocando otitis media, neumonía o sepsis, respectivamente (Figura 6). Además, el neumococo es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica produciendo meningitis asociada a graves secuelas neurológicas. Las neumonías bacteriémicas, la sepsis y las meningitis se consideran ENI y están asociadas a una elevada mortalidad a pesar del tratamiento antibiótico. Esta realidad demuestra la importancia de la relación entre patógeno y hospedador en el establecimiento de la ENI⁶⁹, así como el papel de la microbiota⁷⁰.

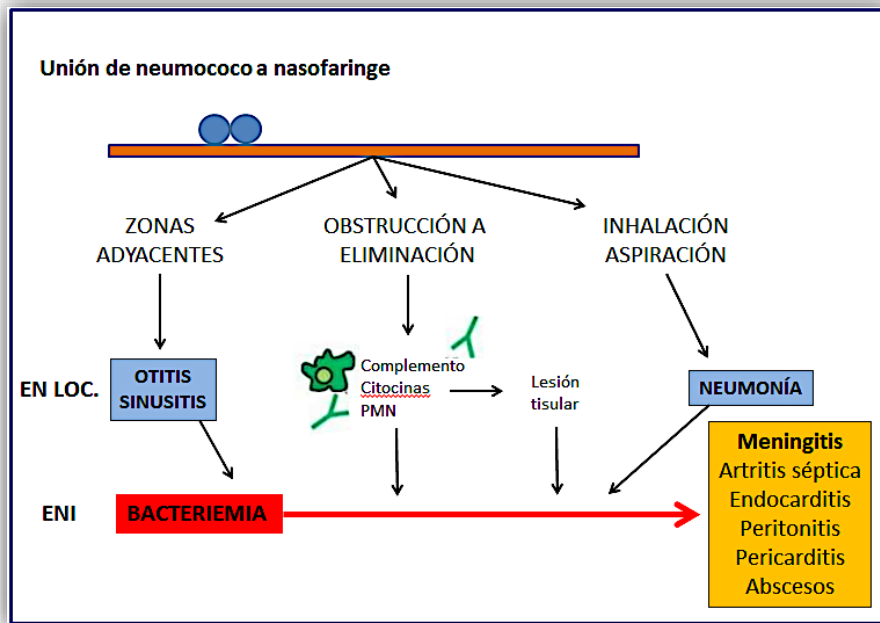


Figura 6. Patogenia de la enfermedad neumocócica.

Uno de los principales factores que determinan el tipo de relación hospedador-patógeno es el serotipo capsular⁷¹ de modo que los neumococos de los serotipos 3, 6B y 19F se han descrito como los más virulentos en adultos; mientras que los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F afectan principalmente a niños^{72,73}. Además, existen otros factores del hospedador que también influyen en la interrelación con el patógeno, uno es la edad (en la que destacan dos picos de incidencia, en menores de 5 años y en adultos mayores de 65 años) y el otro es el estado inmunológico (las personas inmunodeprimidas son más susceptibles a desarrollar ENI).

La infección previa del aparato respiratorio por otros patógenos, como es el caso del virus de la gripe, potencia la capacidad del neumococo para colonizar y desarrollar la enfermedad⁷⁴; además, la presencia de ciertos factores genéticos también aumenta la susceptibilidad del hospedador a sufrir una infección neumocócica⁷⁵.

En el proceso de patogénesis de la ENI se pueden distinguir 3 etapas: colonización, invasión y enfermedad.

5.1. Adhesión y colonización nasofaríngea.

La colonización asintomática del tracto respiratorio superior por *S. pneumoniae* precede tanto a la infección localizada como a la ENI⁷⁶. Es lo que se conoce como estado de portador. Este

estado de portador supone el principal factor de transmisión horizontal de la enfermedad neumocócica⁷⁷.

La colonización por *S. pneumoniae* es muy frecuente en la población mundial, con tasas superiores al 40%, y puede coexistir más de un serotipo colonizando simultáneamente al mismo individuo⁷⁸. En la población adulta, los anticuerpos serotipo-específicos se producen después de la adquisición del neumococo, pero la colonización puede durar más de un año⁷⁹. Este estado de portador es más prevalente en la población infantil, con más de un 50% de niños menores de 5 años colonizados, probablemente como consecuencia de la inmadurez de su sistema inmune y del alto grado de contacto entre individuos. El proceso de colonización, a pesar del avance en el conocimiento de los mecanismos, sigue sin estar del todo explicado, siendo un proceso muy complejo en el que intervienen mecanismos de la propia bacteria para facilitar la adhesión, otros para evitar la eliminación por parte del hospedador, la competencia con otras especies bacterianas para poder sobrevivir o la interacción con enfermedades víricas que favorecerán la colonización.

La adhesión al epitelio es vital para la persistencia del neumococo en la nasofaringe. La unión del neumococo a las células nasofaríngeas está mediada, en gran parte, por interacciones específicas entre la bacteria y el hospedador. La cápsula es uno de los factores que influyen en la capacidad de adhesión, ya que en presencia de anticuerpos anticapsulares se reduce la adhesión a la nasofaringe, lo que demuestra que la cápsula se expresa y es necesaria en este ambiente. Sin embargo, la presencia de grandes cantidades de cápsula inhibe la adhesión del neumococo⁸⁰.

La expresión de exoglicosidasas, como NanA, BgaA y StrH, parece actuar de modo secuencial sobre los distintos residuos glicosilados eliminando los residuos de ácido siálico, galactosa y N-acetilglicosamina, respectivamente⁸¹. La capacidad de desglicosidar estos residuos de manera secuencial es la que permite hacer accesibles los receptores glicosilados facilitando el proceso de adhesión a las células del epitelio. Entre las proteínas que actúan en el proceso de adhesión destacan PavA y PavB que presentan alta afinidad para la unión con fibronectina y plasminógeno⁸².

Otro grupo de proteínas con un papel importante en la colonización son las que tienen actividad proteasa, como HtrA, y otras de la superficie bacteriana, como PspC, CbpG, BgaC, o las hidrolasas de pared celular LytB, LytC y Pce.

La presencia de pili en algunas cepas de neumococo también es importante en el proceso de adhesión a las células epiteliales pulmonares⁸³ favoreciendo, además, el proceso inflamatorio de la enfermedad. Cuando el neumococo ya está en sangre, la presencia de pili parece agravar el proceso infeccioso⁸⁴.

Las infecciones virales incrementan la posibilidad de colonización y también facilitan la posibilidad de aspiración hacia las vías respiratorias inferiores⁸⁵, siendo de gran relevancia la infección por virus de la gripe. Además, las infecciones virales causan pérdida de la integridad del epitelio respiratorio, incrementan la secreción de citoquinas proinflamatorias y por tanto el aporte de nutrientes lo que facilitará el crecimiento del neumococo y su migración a vías inferiores⁸⁶.

El paso de colonización a invasión es un proceso que va a depender de factores derivados tanto del neumococo como del huésped y de factores ambientales.

5.2. Invasión.

El proceso de invasión y diseminación de la ENI generalmente ocurre después de la adquisición de un nuevo serotipo y raramente se asocia a un estado de portador prolongado. La invasión tiene lugar directamente desde la nasofaringe al torrente sanguíneo⁸⁷.

Hay descritos varios mecanismos mediante los cuales el neumococo es capaz de atravesar el epitelio:

5.2.1. Mecanismo mediado por el receptor del factor de activación plaquetario rPAF.

Este receptor reconoce una fosforilcolina (PCho) que está presente en los ácidos teicoicos y lipoteicoicos del neumococo. El rPAF es una potente quimioquina con actividad proinflamatoria cuya estructura molecular consiste en un fosfolípido de gran similitud con la PCho que, al unirse a su receptor, provoca un aumento de la permeabilidad endotelial y una extravasación de leucocitos. Debido a la similitud entre el PAF y la PCho del neumococo, la bacteria puede unirse al rPAF y atravesar las células epiteliales del hospedador produciendo la invasión y diseminación característica de la ENI⁸⁸. Mediante estudios experimentales sobre ratones deficientes en rPAF se demostró la reducción tanto de la colonización neumocócica como del desarrollo de neumonía y ENI⁸⁹.

En este sentido hay que destacar que, como consecuencia de la infección por virus como el de la gripe o el virus respiratorio sincitial, se produce un incremento muy marcado en la síntesis de rPAF⁹⁰ que podría estar relacionado con la elevada incidencia de ENI en pacientes que están infectados o convalecientes por estas viriasis.

5.2.2. Unión de la proteína PspC a la porción SC del plgR.

El receptor plgR (*polymeric immunoglobulin receptor*) está presente en la cara interna de las células epiteliales. En este punto, plgR es capaz de unirse a las IgA o IgM mediante un mecanismo de transcitosis para, posteriormente, llevar todo el complejo IgA-plgR hasta la cara

externa de la célula epitelial, donde será liberada la IgA o IgM^{91,92}. Por tanto, es un receptor que se encarga de la captación de inmunoglobulinas en la cara basal y transportarlas hasta el lumen apical a través del epitelio respiratorio. Una vez liberada la inmunoglobulina en la cara superficial, el receptor pIgR permanece en la cara exterior donde se une el neumococo a través de la proteína de superficie PspC, lo que ocasionará un mecanismo de transcitosis inversa, internalizando la bacteria a través de las capas epiteliales.

5.2.3. Invasión mediada por la unión del neumococo al plasminógeno.

El neumococo contiene varias proteínas que pueden unirse al plasminógeno favoreciendo la adhesión de la bacteria a la superficie celular. Además, la activación de plasminógeno a plasmina por el neumococo permite degradar la cadherina (glucoproteínas transmembranales responsables de las uniones célula-célula para mantener la integridad de los tejidos) del endotelio vascular, posibilitando el acceso del neumococo a la membrana basal y por tanto el desarrollo de la ENI⁹³.

6. MECANISMOS DE DEFENSA DEL HOSPEDADOR.

6.1. Sistema del complemento.

El sistema de complemento constituye una de las primeras líneas de defensa del ser humano frente a microorganismos patógenos y desempeña un papel fundamental en la respuesta inmune. Está compuesto por más de 30 proteínas, tanto plasmáticas como de superficie celular que, tras reconocer al microorganismo, activan una cascada de reacciones. Las 9 proteínas fundamentales se designan de C1 a C9, según el orden cronológico de su descubrimiento. Estas proteínas forman parte de tres vías diferentes de activación: vía clásica, vía alterna y vía de las lectinas. Las 3 vías son reacciones proteolíticas en cadena. Aunque las tres vías difieren en su modo de activación, todas convergen en la formación de C3b, el cual se asocia con C5b, C6 y C9 para formar el complejo de ataque a la membrana celular, ocasionando la formación de poros en la membrana opsonizada.

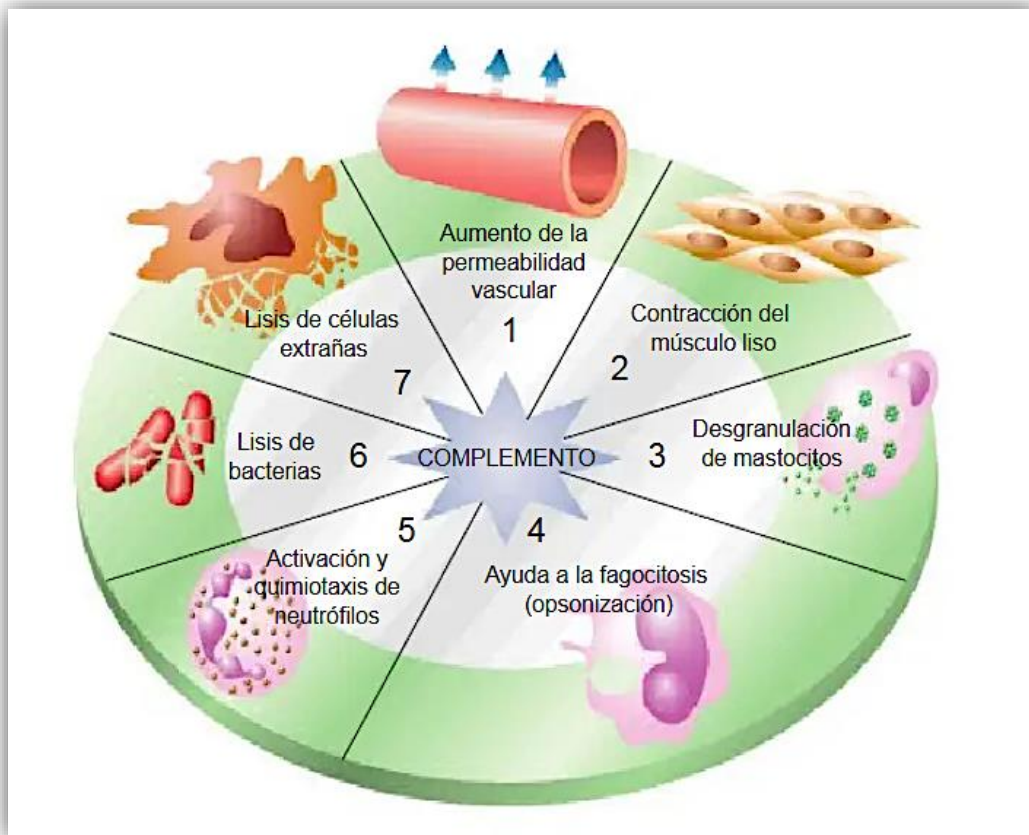


Figura 7. Resumen de las acciones del sistema del complemento.

Entre otras funciones del sistema del complemento está la de facilitar la fagocitosis al unirse el componente C3b a receptores presentes en las células fagocíticas; también es importante en la inducción de la respuesta inflamatoria, mediada por los componentes C3a, C4a y C5a (llamadas anafilotoxinas) que aumentan la permeabilidad y vasoconstricción vascular, favoreciendo la migración de las células fagocitarias al sitio de infección (Figura 7).

6.1.1. La vía clásica.

Se activa por la unión de la región Fc de las Igs a los dominios globulares de C1, complejo formado por C1q, C1r y C1s. El componente C1 puede unirse a las bacterias directamente, mediante unión previa a la proteína C reactiva; además, las IgM naturales se pueden unir a los ácidos teicoicos⁹⁴ del neumococo. Todas estas uniones provocan la desestabilización de C1q originando la activación de C1r y ésta a su vez activa la C1s la cual hidroliza C4 en C4a y C4b. C4b se une a C2 para poder generar la convertasa de C3 (C4bC2b) que convertirá el C3 en C3b, el cual es capaz de unirse a la superficie de la bacteria funcionando como una opsonina. El

depósito de múltiples moléculas de C3b da lugar a un cambio en la especificidad del sustrato originando la convertasa de C5 (unión de C3b a la convertasa de C3), que se encarga de convertir el C5 a C5b. Esto permite que se formen potentes anafilotoxinas como C3a, C4a y C5a⁹⁵. Los compuestos resultantes poseen actividad antibacteriana por sí mismos. Se ha demostrado que la vía del complemento es una de las principales en la inmunidad innata frente al neumococo, lo que confirma su importancia, tanto en el reconocimiento del patógeno como en su eliminación^{96,97}.

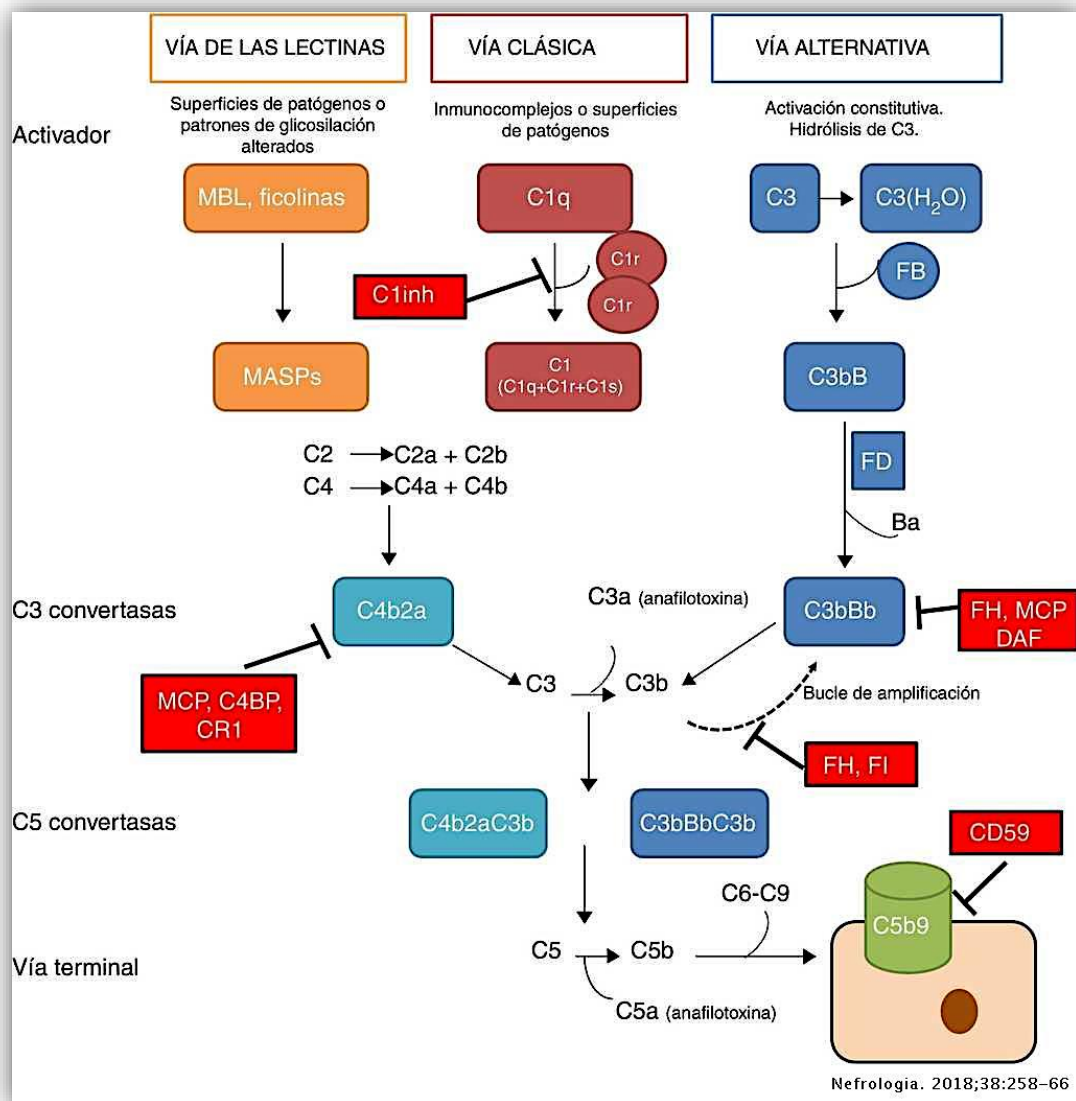


Figura 8. Esquema de las tres vías de activación del complemento (de Corvillo & López-Trascasa, Nefrología 2018).

6.1.2. La vía alterna.

Se activa por la unión del componente C3b, generado espontáneamente en el suero en condiciones normales por la hidrólisis de C3, al factor B que es una serín-proteasa. Una vez producida esta unión, el factor D, otra serín-proteasa, se encarga de hidrolizar al factor B para formar la convertasa de la vía alterna (C3bBb), moléculas adyacentes de C3b se unen a la convertasa de la vía alterna para formar la convertasa C5 de la vía alterna. La properdina que es el regulador positivo de la vía alterna se encarga de estabilizar la convertasa C3bBb para prolongar su actividad. Esta vía se encuentra activada de forma constante, aunque de un modo muy débil.

La importancia de la vía alterna en la opsonización y eliminación del neumococo se pudo demostrar utilizando ratones con deficiencias en los factores B y D⁹⁶.

6.1.3. La vía de las lectinas.

Se inicia cuando las lectinas (proteínas que se unen a azúcares con una alta especificidad para cada tipo) se unen a carbohidratos que contienen residuos de N-acetilglucosamina o manosa (lectina MBL). Las lectinas se unen preferentemente a los extremos de manosa, fucosa y glucosamina de polisacáridos o glucoproteínas de membrana de gran variedad de bacterias. El proceso de activación es similar al de la vía clásica, actuando la lectina de modo similar a lo que ocurre con el complejo C1, de hecho, las lectinas y la C1q son moléculas estructuralmente parecidas. Al activarse, las lectinas sufren un cambio conformacional que a su vez activa a su serín-proteasa (MASP) que permiten actuar secuencialmente sobre C4 y C2 originando, posteriormente, la misma convertasa de C3 producida a partir de la vía clásica (Figura 8).

En el caso del neumococo, se ha observado que un tipo de lectinas es capaz de unirse a determinados serotipos como el 11F, 11A y 11D, reconociendo determinados componentes del polisacárido del serogrupo 11, ya que en ausencia de cápsula no se observó ningún tipo de unión⁹⁸. En cambio, otro tipo de lectinas se unen al polisacárido de los serotipos 19A y 19F⁹⁹ lo que demuestra la alta especificidad entre la unión de las lectinas y los azúcares de las bacterias.

Hasta hace poco se consideraba que la vía de las lectinas desempeñaba un papel poco relevante en el desarrollo de la ENI. Sin embargo, investigaciones más recientes han encontrado una asociación entre la susceptibilidad a la ENI y la homocigosis para uno de los tres polimorfismos del gen MBL2⁹⁸. Otros estudios realizados en ratones deficientes en

diversas lectinas han confirmado que estos animales tienen una mayor susceptibilidad a la infección neumocócica. Resultados similares se han encontrado en humanos^{100,101}.

6.1.4. Regulación del sistema del complemento.

El sistema del complemento es un mecanismo de defensa muy eficaz para la eliminación de microorganismos patógenos. No obstante, la activación descontrolada es nociva para el hospedador y, por lo tanto, todo el sistema debe estar sujeto a una regulación. Existen diferentes reguladores negativos para prevenir la activación continua del sistema. Estos reguladores son sustancias solubles localizadas en el plasma y proteínas asociadas a membranas celulares.

El principal regulador negativo de la vía clásica y de la vía de las lectinas es el C4BP que es una glicoproteína plasmática que se une a C4b y actúa como cofactor del factor I en la hidrólisis de C4b a C4d que es inactivo. Además, C4BP puede producir una disociación irreversible de la convertasa de C3 de la vía clásica, inactivando la vía clásica y la de las lectinas a la vez.

El factor H es el principal regulador negativo de la vía alterna, controlando la activación del sistema del complemento mediante 3 mecanismos. Como cofactor del factor I en la ruptura e inactivación de C3b a iC3b que no puede actuar en la formación de la convertasa C3. También actúa al disociar la convertasa de C3 de la vía alterna en C3b y factor Bb. Y finalmente, el factor H es capaz de competir con el factor B por la unión a C3b, impidiendo la activación de la vía alternativa.

Muchos microorganismos han desarrollado factores de virulencia que actúan como análogos funcionales de los inhibidores del sistema del complemento para poder evadir la inmunidad del sistema del complemento. El mecanismo más utilizado es la interacción con el factor H y C4BP (los principales reguladores negativos). Así, el neumococo es capaz de unir estos reguladores negativos, principalmente mediante la proteína PspC¹⁰² pero debido al elevado polimorfismo de la proteína PspC, la unión a estos reguladores negativos varía mucho entre distintos aislados de neumococos. La asociación de determinados serotipos con su invasividad podría deberse a que algunos oligosacáridos capsulares estuvieran afectando la interacción de la bacteria con el factor H³³.

6.2. Inactivación directa de componentes del complemento.

Uno de los mecanismos de evasión del sistema del complemento es la producción, por parte del microorganismo, de proteasas capaces de degradar diferentes componentes del sistema que ocasionaría una inactivación de la cascada.

El C3 es la proteína clave del sistema. Está compuesta por dos cadenas (α y β) unidas covalentemente, por lo que su hidrólisis resulta de gran relevancia. En *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* los procesos de degradación ya están descritos; sin embargo, en el caso del neumococo se sugiere que podría degradar el C3¹⁰³ aunque las proteínas implicadas no han sido identificadas.

6.3. Inmunidad celular.

Las células del sistema inmune innato expresan una gran variedad de receptores de reconocimiento de patrones (*pattern-recognition receptors*; PRRs) que detectan moléculas características de los agentes patógenos denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*; PAMPs). Los PAMPs no solo son esenciales para el establecimiento de la infección sino también para la supervivencia del patógeno. El reconocimiento del PAMPs por los PRRs activa un conjunto de respuestas inmunes antimicrobianas mediante la producción de citoquinas inflamatorias, quimioquinas e interferones tipo I, también da lugar al comienzo de una respuesta inmune de tipo adaptativo que involucra a los linfocitos B y T. Los PRRs incluyen varias familias de moléculas, pero en el caso del neumococo, se admite que los receptores de tipo TOLL¹⁰⁴ y tipo NOD¹⁰⁵ son los que están más implicados en la defensa inmune¹⁰⁶. Una vez que los componentes de la pared celular y posiblemente PLY son reconocidas por TLR2 y -4 respectivamente, *S. pneumoniae* es internalizado por las células fagocíticas y degradado en los fagosomas que induce liberación de ácidos nucleicos y peptidoglicanos bacterianos. El ADN es detectado por TLR9 en los endosomas. Los fragmentos de peptidoglicano son detectados por NOD2 en el citosol. Además, el ADN neumocócico es detectado por AIM2 y por un PRR citosólico adicional. Los TLR y NOD2 estimularán la producción de Citocinas (KC) dependientes de NF- κ B que incluyen TNF α , IL-6, KC y pro-IL-1b. Mientras que TNF α , IL-6 y KC funcionales se liberan después de la traducción, la producción de IL-1b requiere una segunda señal. Esto lo proporcionan los inflammasomas NLRP3 y AIM2 activados por PLY y ADN bacteriano, respectivamente, que median la escisión de pro-IL-1b en IL-1b madura. Detección del ADN de *S. pneumoniae* por el receptor citosólico activa el adaptador STING y transcripción del factor IRF3, y estimula las respuestas de IFN tipo I (Figura 9).

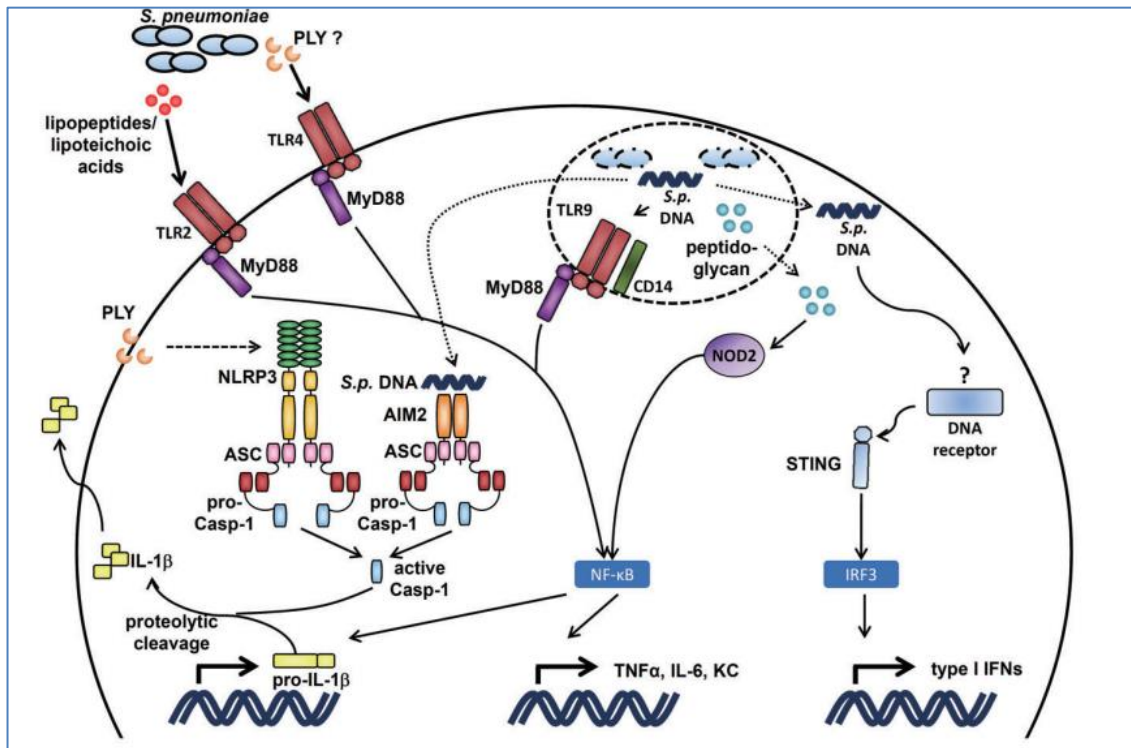


Figura 9. Descripción general de los diferentes PRRs implicados en el reconocimiento de los PAMPs del neumococo. (Adaptado de Koppe *et al.* 2012).

Receptores tipo TOLL.

Son un grupo de receptores transmembranales que reconocen una gran variedad de PAMPs de distintos microorganismos patógenos e inducen la activación del sistema inmune innato. En humanos el grupo de estos receptores está constituido por 10 tipos, divididos en dos subgrupos dependiendo de su localización celular y del ligando. Uno de los grupos está compuesto por proteínas de superficie celular que reconocen componentes de la membrana microbiana como lípidos, lipopolisacáridos y proteínas, mientras que el otro grupo se localiza exclusivamente en vesículas intracelulares y reconocen ácidos nucleicos microbianos^{104,106}.

Varios de estos receptores participan en el reconocimiento y fagocitosis del neumococo. Esto ha sido demostrado con ratones carentes de estos receptores, como en el caso del receptor 9, que son más sensibles a la infección diseminada¹⁰⁷. Resultados similares han sido observados en niños¹⁰⁸.

Receptores tipo NOD.

En seres humanos este grupo de receptores está conformado por 22 proteínas citosólicas. Algunos están implicados en la activación de la respuesta inflamatoria, donde se ha demostrado que NOD2 activa la fagocitosis de neumococo por un mecanismo relacionado con el reconocimiento del peptidoglicano bacteriano¹⁰⁹.

Estas proteínas citosólicas regulan la maduración y liberación de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a patógenos. Los componentes bacterianos con propiedades activadoras de este complejo incluyen el ADN y toxinas bacterianos.

6.3.1. Fagocitosis.

Los neutrófilos y macrófagos desempeñan un papel esencial en la eliminación de las infecciones producidas por muchos microorganismos mediante su fagocitosis y posterior eliminación. Tras un primer contacto con el microorganismo, los fagocitos internalizan los patógenos en vacuolas formadas a partir de la membrana plasmática denominadas fagosomas. Estos fagosomas sufrirán un proceso de maduración uniéndose con endosomas y lisosomas para dar lugar, finalmente, a los fagolisosomas. En estos, los patógenos son degradados por una combinación de mecanismos en un medio muy ácido, pH en torno a 4,5, y rico en hidrolasas.

7. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA INVASIVA.

El diagnóstico microbiológico de la infección por *S. pneumoniae* es fácilmente accesible en un Servicio de Microbiología convencional, ya que puede realizarse adecuadamente con las técnicas microbiológicas habituales, aunque también es útil disponer de nuevas técnicas que permitan reducir los tiempos de detección.

7.1. Muestras.

Las muestras clínicas más indicadas para el diagnóstico de la ENI son el hemocultivo y las muestras del posible foco infeccioso que van desde líquido cefalorraquídeo (LCR), en el caso de meningitis, a cualquier otro líquido orgánico que en condiciones normales sea estéril. El procedimiento para la identificación de *S. pneumoniae* en todas las muestras es el mismo.

Al ser muestras que en condiciones normales son estériles la presencia de cualquier colonia en el cultivo microbiológico es criterio diagnóstico y debe procederse a su identificación.

7.2. Cultivo.

S. pneumoniae puede cultivarse en medios como agar sangre o agar chocolate, el crecimiento es óptimo entre 25 y 42°C, por lo que se considera mesófilo. Algunas cepas son capnófilas y requieren una atmósfera más rica en dióxido de carbono (5%).

En los medios con sangre (agar sangre y agar chocolate) produce α -hemólisis, reconocible por el halo verde característico, si se realiza en condiciones aerobias y se debe a la acción del peróxido de hidrógeno que las bacterias liberan al medio. Si se hace en anaerobiosis, se produce β -hemólisis y se observa un halo transparente debido a la acción de la enzima neumolisina O. Cuando la cepa tiene cápsula, forma colonias grandes —no tanto en el agar chocolate—, redondas y mucoides (Figura 10); si no la posee, son planas y más pequeñas. Las colonias no están pigmentadas y a las 48 horas pueden mostrar una depresión central debido a la autólisis de las células (Figura 11).



Figura 10. Colonias mucosas de *S. pneumoniae* (serotipo 3).

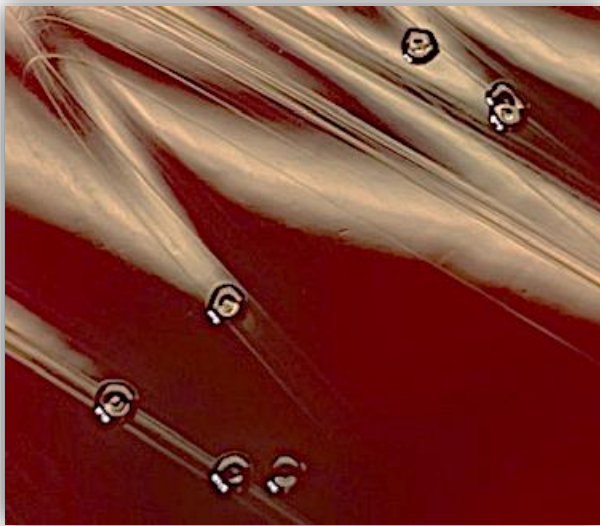


Figura 11. Colonias de *S. pneumoniae* con depresión central por el fenómeno de autólisis y alfa-hemólisis alrededor de la colonia.

Existe un fenómeno llamado variación de fase en el que las colonias se observan con distinta opacidad cuando se visualizan a través de una luz oblicua en una superficie transparente (Figura 12). Las formas opacas, más virulentas en modelos animales, tienen más cápsula y menos ácido teicoico y provocarían más enfermedad invasiva en pulmones y torrente sanguíneo; en las transparentes ocurre lo contrario y están más adaptadas al ambiente de la nasofaringe, que colonizan¹¹⁰.

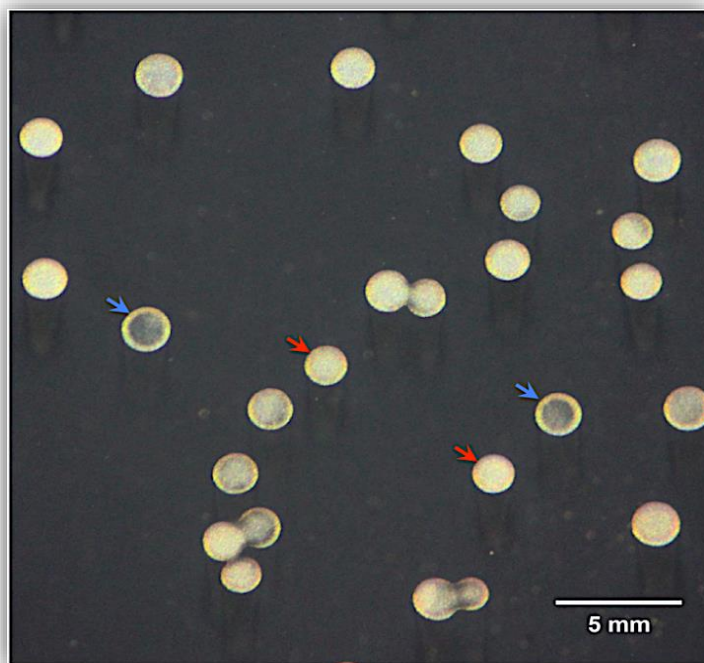


Figura 12. Observación de la variación de la fase neumocócica en la morfología de las colonias (de Li, J. et al., 2017).

7.3. Identificación.

Las características fenotípicas de las colonias de *S. pneumoniae* tras su cultivo en placas de agar sangre en condiciones habituales (48 horas de incubación a 35°C y 5% CO₂) se resumen en la Tabla 1, entre ellas destacan las pruebas clásicas de identificación: sensibilidad a la optoquina y la solubilidad en bilis. Estas características pueden verse afectadas por las condiciones ambientales en las que se realice el cultivo como, por ejemplo, la concentración de CO₂. Asimismo, se han descrito variantes de colonias de *S. pneumoniae* (no umbilicadas y rugosas) con morfología atípica que se asocian con alteraciones genotípicas relacionadas con la selección de cepas resistentes a los antimicrobianos. En ocasiones las colonias de *S. pneumoniae* tienen un aspecto mucoso característicamente asociadas al serotipo 8 y especialmente al 3.

Tabla 1. Características fenotípicas de *S. pneumoniae* en cultivo.

α -hemólisis en agar sangre	Positiva
Catalasa	Negativa
Sensibilidad a la optoquina	Positiva
Solubilidad en bilis (desoxicolato)	Positiva

7.4. Nuevas técnicas de diagnóstico.

En el caso de la infección invasiva causada por *S. pneumoniae*, el diagnóstico precoz es particularmente importante dada la alta mortalidad asociada. Asimismo, la demora en el diagnóstico condiciona el retraso en la instauración del tratamiento antibiótico y en la elección adecuada del mismo. Esta situación no solo genera la aparición de complicaciones graves, sino que también influye en la selección de determinados clones multirresistentes.

La aparición de nuevas técnicas de laboratorio, denominadas “de diagnóstico rápido” y *point of care* para la detección de *S. pneumoniae* ha supuesto un avance en el diagnóstico etiológico de la infección neumocócica, así como en la instauración adecuada del tratamiento antimicrobiano precoz. Es importante recordar que las técnicas de diagnóstico convencionales (tinción de Gram y cultivo) siguen constituyendo las pruebas de diagnóstico de referencia o *gold-standard* y que el resultado de toda técnica de diagnóstico rápido debe ser confirmado con posterioridad con técnicas de diagnóstico tradicionales.

7.4.1. Inmunocromatografía.

Representa el ejemplo más claro de las técnicas de diagnóstico rápido. Esta técnica se fundamenta en la detección del polisacárido C capsular de *S. pneumoniae* con propiedades antigénicas. Este antígeno es soluble en determinados líquidos o fluidos como la orina y el LCR. El polisacárido C está presente como componente de la cápsula neumocócica independientemente del serotipo del microorganismo. El desarrollo de esta prueba se realiza sobre una membrana de nitrocelulosa a la que se encuentra adsorbido el anticuerpo específico frente al polisacárido C de *S. pneumoniae*. Al entrar en contacto el antígeno soluble presente en la muestra del paciente, este se conjuga con el anticuerpo específico, produciéndose una precipitación, en forma de banda, que puede observarse a simple vista sobre la membrana de nitrocelulosa (Figura 13). Las muestras biológicas sobre las que se ha validado esta técnica son la orina y el LCR. El polisacárido C una vez excretado en orina es estable al menos 48h y puede ser detectado en pacientes bajo tratamiento antimicrobiano¹¹¹.



Figura 13. Detección de antígeno de *S. pneumoniae* por inmunocromatografía.

Existen varios estudios que avalan la utilidad de esta prueba en la detección de antígenos en otras muestras clínicas como el líquido pleural, sobre todo en pacientes con empiema y derrame pleural. A pesar de ser una muestra para la cual la técnica no está plenamente validada se han señalado varias ventajas, entre las que destacan una elevada sensibilidad, incluso superior al cultivo convencional. También se ha demostrado su utilidad en pacientes que han recibido antibioterapia previa al empiema. Entre las desventajas se encuentra su falta de validación y de especificidad (reacción cruzada con polisacárido C de *Streptococcus oralis* y de *Streptococcus mitis*)^{111, 112}.

7.4.2. Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN).

La TAAN más empleada para el diagnóstico etiológico precoz de la neumonía adquirida en la comunidad es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Con esta técnica se puede detectar la presencia de material genético (ADN o ARN) de un microorganismo en la muestra de estudio. Según el tipo de TAAN empleada es posible tanto amplificar material genético para su posterior identificación mediante comparación con secuencias de diferentes microorganismos almacenadas en bases de datos, como amplificar material genético específico de un microorganismo que sólo se encuentra presente en el genoma de éste.

Las TAAN más empleadas en el diagnóstico de la infección por *S. pneumoniae* y de sus complicaciones asociadas son la amplificación del gen que codifica la subunidad 16s del rRNA y la amplificación de genes específicos de *S. pneumoniae* como los que codifican para los genes de autolisina (gen *lytA*) o neumolisina (gen *ply*)¹¹³.

También se ha descrito la posibilidad de determinar la presencia de neumococo en muestras en las que el cultivo fue negativo, así como su serotipo mediante técnicas que combinan amplificación de los genes implicados en la síntesis de los polisacáridos que determina la estructura concreta de cada serotipo e hibridación de cada uno de ellos mediante sondas específicas (sondas TaqMan). Con esta técnica se ha conseguido diferenciar los serotipos o serogrupos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F/A, 8, 9V/N/L, 14, 15B/C, 18C/B, 19A, 19F/B/C, 23A y 23F de muestras en las que el cultivo fue estéril¹¹⁴.

Asimismo, se han desarrollado TAAN específicas directamente aplicadas en muestras de sangre, sin necesidad de cultivo previo, para la detección de microorganismos con gran relevancia patogénica, entre los que se encuentra *S. pneumoniae*. Para ello se utiliza la técnica de PCR en tiempo real detectando una secuencia del gen 16s rARN. Recientemente se han publicado la utilidad de técnicas que combinan la amplificación y la utilización de microarray con buenos resultados, tanto para la detección de *S. pneumoniae* como para la determinación de los serotipos¹¹⁵.

Las TAAN, además de permitirnos la detección del genoma de *S. pneumoniae* en múltiples muestras, nos permiten diseñar PCR específicas para conocer mecanismos de resistencia o factores de virulencia. Si además añadimos la secuenciación Sanger, nos proporciona información epidemiológica (MLST), de gran interés en el estudio de brotes.

La utilización de PCR específicas y secuenciación Sanger para la caracterización completa de una cepa bacteriana conlleva una elevada carga de trabajo, la aparición de la segunda y tercera generación de secuenciación (NGS) permite secuenciar el genoma completo y múltiples muestras a la vez.

La introducción de NGS en el ámbito de la microbiología asistencial permite disponer de una valiosísima información para un mejor manejo de nuestros pacientes.

7.4.3. Espectrometría de masas.

Esta técnica se desarrolló inicialmente para identificar moléculas orgánicas de pequeño tamaño en el seno de mezclas complejas. Las variantes de la técnica que más se emplean como método de diagnóstico en microbiología son ES (Electrospray) y MALDITOF (*Matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight*). Mediante radiación láser se ioniza una suspensión de los aislados a estudiar en una matriz específica, que se somete a un campo magnético lo que provoca que las moléculas ionizadas liberadas sean captadas en diferente tiempo a lo largo de un conductor, en función de su tamaño y carga. El análisis de las señales de estas proteínas ribosómicas genera espectros complejos que son característicos de cada especie bacteriana y, mediante la comparación con los espectros almacenados en la librería del instrumento, se consigue la identificación del aislado (Figura 14). Otra aplicación importante de esta técnica es el análisis de moléculas de ADN concretas, como podrían ser elementos de resistencia a los antimicrobianos. Esta técnica se ha empleado para diagnóstico

clínico, especialmente a partir de colonia, aunque la identificación de estreptococos en general ha de realizarse siempre con apoyo de otras técnicas¹¹⁶. También se ha propuesto su aplicación para la identificación de serotipos¹¹⁷ y de mecanismos de resistencia.

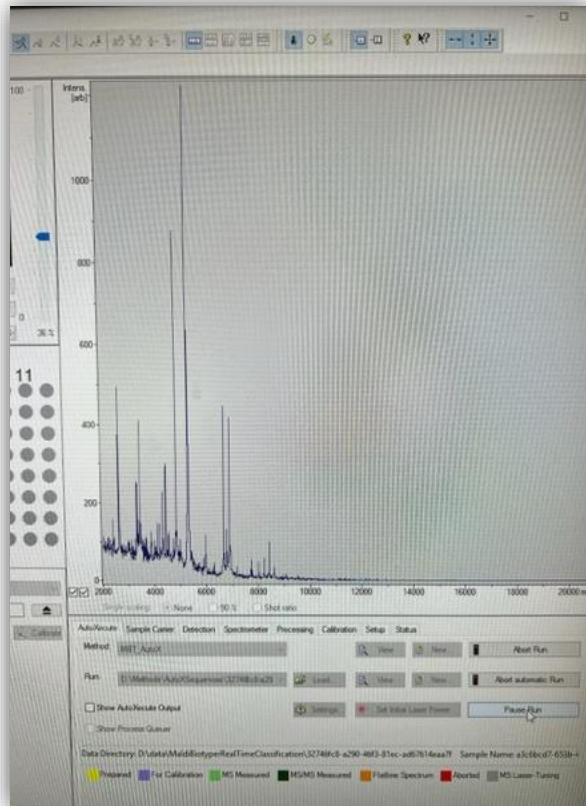


Figura 14. Espectros generados por *S. pneumoniae* en la técnica MALDI-TOF.

7.5. Serotipado.

El serotipado fue la primera técnica que se utilizó para clasificar y agrupar los aislados de *S. pneumoniae*. Se basa en la capacidad que tiene la cápsula de aglutinar en presencia de antiseros específicos. Según esta técnica, se asigna un número en función del número del antisuero frente al cual la aglutinación haya sido positiva. Existen dos sistemas de nomenclatura: el americano y el danés. El sistema americano asigna números correlativos a los antiseros en función de la capacidad de aglutinación e independientemente de que algunos antiseros presenten reacciones cruzadas o difíciles de distinguir. El sistema danés, sin

embargo, asigna números correlativos a los antisueros, pero establece grupos de antisueros según la capacidad de la reacción inmunológica, la cual se diferencia por letras, es decir, establece los serogrupos que agrupan a diferentes serotipos. Así, por ejemplo, dentro del serogrupo 6 según el sistema danés, el serotipo 6A se corresponde con el serotipo 6 del sistema americano y el serotipo 6B del sistema danés se corresponde con el serotipo 26 del sistema americano, ya que fue descrito con posterioridad. El sistema más comúnmente empleado es el sistema danés.

La utilización de los serotipos como herramienta para clasificar y agrupar aislados de neumococo se ha usado desde el descubrimiento de la capacidad inmunógena de la cápsula y ha servido para asociar a determinados serotipos propiedades tales como la virulencia o la resistencia a antibiótica. Así, diferentes estudios asocian los serotipos 1, 5, 7 y 14 con enfermedad invasiva, mientras que los serotipos predominantes en los estudios de colonización nasofaríngea son el 6, 18, 19 y 23; mientras que la resistencia a betalactámicos y macrólidos se asocia con los serotipos 14, 19 y 23 principalmente.

Dado que las vacunas se diseñan en función de los serotipos que se asocian más con enfermedad o colonización, es recomendable realizar estudios de serotipado a todos los aislados de *S. pneumoniae* procedentes de muestras clínicas y, a su vez, realizar estudios de prevalencia, con objeto de poder hacer un seguimiento de la acción de la vacuna y poder estudiar fenómenos de reemplazamiento de serotipos.

8. IMPORTANCIA DE LA VACUNACIÓN EN LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA INVASIVA

Los primeros estudios para prevenir la ENI mediante la utilización de vacunas fueron realizados a comienzos del siglo pasado con trabajadores de las minas de oro en Sudáfrica¹¹⁸ y, posteriormente, con militares en EE.UU.¹¹⁹. Estos estudios, que utilizaban mezclas de neumococos muertos por calor, tuvieron un éxito limitado al desconocer la gran variabilidad de serotipos.

Los estudios sobre vacunas fueron retomados a partir de las investigaciones de Avery y colaboradores, los primeros en aislar e identificar la cápsula del neumococo como una sustancia de naturaleza polisacárida que cubría la superficie bacteriana¹²⁰. Durante el desarrollo de vacunas eficaces contra el neumococo fue esencial el reconocimiento de que los anticuerpos contra un serotipo capsular protegían de una infección posterior causada por cepas del mismo serotipo o de serotipos que presentasen alguna reacción cruzada con aquel¹²¹. Estos trabajos dieron como resultado una vacuna antineumocócica 4-valente que incluía los polisacáridos de los serotipos 1, 2, 5 y 7¹²²; vacuna que, sin embargo, fue muy poco

utilizada debido a gran eficacia de la penicilina descubierta unos años antes. La introducción de la penicilina de forma rutinaria en el tratamiento de las infecciones por neumococo dio como resultado un descenso casi total del interés por la vacunación en la enfermedad neumocócica. Sin embargo, en la década de los 60, a pesar de la aparente eficacia *in vitro* de la penicilina, la neumonía neumocócica seguía causando más muertes en EE.UU. que ninguna otra enfermedad infecciosa¹²³. Esta observación y, especialmente la emergencia de neumococos multirresistentes, dieron lugar a un nuevo interés por la vacunación frente a neumococo.

8.1. Vacunas constituidas por polisacárido capsular.

Debido a que ciertos serotipos eran los más frecuentes en la ENI, se desarrolló una vacuna con los serotipos capsulares más prevalentes, que en un principio constaba de 14¹²⁴ y, más tarde, de 23 polisacáridos capsulares. La actual vacuna de polisacáridos 23-valente (VNP23), contiene 25 microgramos de cada uno de estos serotipos: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14,15B, 17F, 18C, 19A, 19F,20, 22F, 23F y 33F.

Esta vacuna reduce el riesgo de infección sistémica en la población adulta y se sigue utilizando en la actualidad en la inmunización de adultos. Sin embargo, no se utiliza en niños menores de 2 años (uno de los principales grupos de riesgo de ENI) ya que los niños de ese grupo de edad no responden a los polisacáridos capsulares por ser antígenos de tipo T-independientes¹²⁵.

Por otra parte, hay estudios que sugieren que la utilización previa de VNP23 podría condicionar negativamente la respuesta inmune a las vacunas conjugadas cuando estas últimas se administran con menos de un año de intervalo¹²⁶. Este hecho ha motivado que, con datos muy limitados, se acepte mayoritariamente un intervalo de al menos un año entre la recepción de las vacunas antineumocócicas polisacáridas simples y las conjugadas y que algunos autores o instituciones recomienden que se amplíe el mismo hasta los tres años¹²⁷. Por el contrario, la vacunación con VNP23 a partir de las ocho semanas tras recibir la vacuna conjugada trecevalente (PCV13), genera una respuesta secundaria T-dependiente para los antígenos comunes a ambas y una primovacuna T-independiente para los exclusivos de la vacuna polisacárida simple, lo que provocaría un efecto aditivo de las dos vacunas, aunque está por demostrarse desde el punto de vista clínico. El intervalo VNC13-VNP23 más comúnmente aceptado es el de al menos 8 semanas.

En España, se autorizó la vacuna VNP23 en 1999 y se establecieron unas recomendaciones de utilización de la vacuna en grupos de riesgo en el año 2000.

8.2. Vacunas conjugadas.

Las vacunas conjugadas utilizan como antígeno un oligosacárido o polisacárido capsular, al que se une de forma covalente una fracción proteica para aumentar su capacidad inmunógena.

Esta unión transforma el comportamiento T-independiente del polisacárido en T-dependiente, lo que posibilita una respuesta inmune efectiva a partir de los dos meses de vida y una memoria permanente¹²⁸. Las proteínas que se suelen utilizar en la conjugación suelen ser el toxoide diftérico CRM₁₉₇ (mutante no tóxica de la toxina diftérica) o el toxoide tetánico. De esta manera, las vacunas conjugadas se diferencian de las no conjugadas en los siguientes aspectos:

- Producen una respuesta inmunológica T-dependiente con inducción de memoria inmunológica mediada por células B.
- Se produce un rápido e intenso incremento en el título de anticuerpos tras la administración de una dosis de recuerdo de vacuna conjugada.
- La inducción de IgG, con niveles elevados de IgG1 (la IgG1 fija bien el complemento, de importancia capital para la fagocitosis bacteriana) superiores a los de IgG2.
- No provocan fenómeno de tolerancia: baja respuesta tras dosis repetidas.
- Producen memoria comunitaria o de grupo por disminuir el estado de portador.
- Son activas a partir de los 2 meses de edad.

En febrero del año 2000, la *US Food and Drugs Administration* (FDA) aprobó la vacuna neumocócica conjugada heptavalente (PCV7), en la que se incluye la proteína transportadora CRM₁₉₇, para su uso en población pediátrica. Esta vacuna (Prevenar®, Pfizer, Nueva York, EE.UU.) incluía los serotipos que producían aproximadamente el 80% de ENI en todo el mundo (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F). En España, la comercialización se inició en junio de 2001. La introducción de esta vacuna en el calendario vacunal infantil de EE.UU. y Europa permitió una rápida disminución tanto de los casos de otitis media aguda¹²⁹ como los de ENI provocados por los serotipos incluidos en la vacuna¹³⁰. Sin embargo, los casos de colonización por neumococo no disminuyeron significativamente debido a la aparición de un fenómeno de reemplazo de los serotipos, anteriormente más frecuentes, por serotipos no incluidos en la PCV7, especialmente el serotipo 19A cuya prevalencia en enfermedad infantil se incrementó considerablemente¹³¹.

Es importante destacar que la pertenencia a un mismo serogrupo no garantiza protección clínica frente a los serotipos integrantes del mismo. Varios estudios clínicos y de laboratorio han mostrado que la vacuna PCV7 no proporcionaba protección cruzada frente al serotipo 19A mientras que la mayoría sí ha constatado inmunidad o protección, al menos parcial, frente al serotipo 6A¹³². Hasta la fecha los estudios disponibles sugieren que tampoco proporciona protección frente al 6C¹³³.

Para evitar el fenómeno de reemplazo por otros serotipos se inició el desarrollo de vacunas con una mejor cobertura, culminando en la comercialización de las vacunas diezvalente (Synforix®: GlaxoSmithKline) (PCV10) y trecevalentevalente (Prevenar-13®; Pfizer) (PCV13). Estas vacunas contienen además de los serotipos de la PCV7, los serotipos 1, 5 y 7F en la PCV10 y los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F y 19A en la PCV13.

La vacuna PCV10 fue autorizada en 2009 por el ministerio de Sanidad y Consumo. Está constituida por polisacáridos de los serotipos neumocócicos antes mencionados unidos covalentemente (conjugados) con proteína D de *Haemophilus influenzae* no tipable; excepto los serotipos 18C, unido a toxoide tetánico, y 19F unido a toxoide diftérico.

La PCV13 se comercializó en la UE en el año 2010. Contiene 2,2 microgramos de los polisacáridos capsulares de los serogrupos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F y 4,4 microgramos del polisacárido 6B, conjugados covalentemente con la proteína transportadora CRM₁₉₇. Inicialmente se comercializó con la indicación de uso para niños pequeños, pero en 2011 se autorizó para su uso frente a ENI en población mayor de 50 años; en 2012 para su uso entre los 6 y los 18 años y en 2013 se amplió a las edades comprendidas entre 19 y 50 años. Además de para prevenir ENI, está indicada para la prevención de la neumonía y otitis media aguda desde las 6 semanas hasta los 17 años. Posteriormente se autorizó la extensión de la indicación frente a la neumonía en mayores de 17 años, incluyendo a los adultos de edad avanzada.

Actualmente se siguen desarrollando nuevas vacunas conjugadas con la inclusión de más serotipos. Entre ellas la vacuna 15-valente de Merck (Darmstadt, Alemania), que incluye los mismos serotipos que la PCV13 junto con dos nuevos serotipos, 22F y 33F y la vacuna 20-valente de Pfizer que incluye siete serotipos más (8, 10A, 11A, 12F, 15BC, 22F y 33F) que la PCV13.

8.3. Vacunas basadas en proteínas.

Las vacunas polisacáridas y conjugadas de neumococo proporcionan protección sólo frente a determinados serotipos (los incluidos en la misma y, solo en contadas ocasiones alguno más con reacción cruzada); por otra parte, el número de polisacáridos diferentes que se pueden conjugar es limitado. A esto hay que añadir los elevados costes de la vacuna que impiden su puesta en marcha en la mayoría de los países en desarrollo.

Por estas razones hay varios grupos de estudio cuyas investigaciones están centradas en la búsqueda de la vacuna ideal de neumococo basada en proteínas de la bacteria que sean comunes a todos los aislados clínicos, estén bien conservadas y confieran inmunidad.

Varias proteínas antigénicas del neumococo han sido descritas como posibles candidatas a formar parte de una vacuna de naturaleza proteica: Ply, PspC, PspA, PsaA, PiaA, PhtB, PhtE y NanA¹³⁴. Sin embargo, ninguna de ellas ha sido considerada como una candidata adecuada para proporcionar protección suficiente cuando se utilizan de forma individualizada, probablemente por el marcado polimorfismo de alguna de ellas. En cualquier caso, la combinación de proteínas se considera que es el futuro, ya que existen evidencias que demuestran que ciertas combinaciones de proteínas proporcionan un efecto aditivo o incluso sinérgico en términos de inmunoprotección¹³⁴.

8.4. Indicaciones de la vacunación.

Actualmente hay disponibles dos vacunas frente a neumococo para su utilización en España. El Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud recomienda la utilización de VNP23 en personas de grupos de riesgo y mayores. Además, algunas Comunidades Autónomas han incorporado la PCV13 en ciertos grupos de riesgo. Aunque existen algunas diferencias en las recomendaciones realizadas por algunos organismos de países de nuestro entorno, aquellos que han realizado una evaluación coinciden en los principales grupos de riesgo a los que recomendar la vacunación con PCV13.

En España se establecen recomendaciones de vacunación frente a neumococo en personas de grupos de riesgo con 5 y más años y en mayores de 64 años, detallando la vacuna o vacunas a utilizar y la pauta recomendada. Se recomienda la utilización de PCV13 en las personas de los siguientes grupos de riesgo:

- Inmunodepresión: inmunodeficiencias humorales y celulares, deficiencias del complemento y trastornos de la fagocitosis, leucemia, linfoma, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin, otras neoplasias, infección por VIH, insuficiencia renal crónica, tratamiento inmunosupresor, trasplante de progenitores hematopoyéticos, trasplante de órgano sólido y asplenia anatómica o funcional.
- Personas inmunocompetentes con ciertas enfermedades crónicas: fístula de LCR, portadores de implantes cocleares, antecedentes de enfermedad neumocócica invasora y cirrosis hepática.

Además, se recomienda fortalecer la vigilancia epidemiológica de la enfermedad neumocócica y establecer los indicadores pertinentes para disponer de información sobre coberturas de vacunación frente a neumococo.

9. TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO Y MECANISMOS DE RESISTENCIA.

Antes del descubrimiento de los antibióticos se habían ensayado múltiples remedios frente a la neumonía neumocócica, todos ellos con poco éxito. Los primeros avances se observaron al tratar pacientes con neumonía con un compuesto derivado de la quinina, la dietilcupreína más conocida como optoquina, compuesto que actualmente se utiliza para diferenciar el neumococo de otros estreptococos en el laboratorio. Se utilizó masivamente y sin control de dosificación, hasta que se recogieron datos en los que se indicaba que producía neuropatía óptica como efecto adverso grave, momento desde el cual, se desechó su utilización en humanos.

La exposición de las bacterias a los antibióticos conlleva la adquisición de resistencias. La primera resistencia detectada en *S. pneumoniae* fue frente a la optoquina en 1912 en unos

ensayos con ratones tratados con esta sustancia. Cinco años más tarde se aisló una cepa de *S. pneumoniae* de un paciente resistente a la optoquina¹³⁵. En las últimas tres décadas, las resistencias antimicrobianas se han incrementado de un modo dramático. Este es un hecho muy importante en el neumococo ya que posee capacidad transformante de modo natural para adquirir resistencias por transferencia horizontal de genes, permitiendo una rápida diseminación¹³⁶. A esto se le suma la alta capacidad que tiene para colonizar la nasofaringe humana durante meses y por tanto la posibilidad de exposición a diferentes antibióticos frente a los que puede desarrollar resistencias.

La introducción de la PCV7 se asoció a un significativo descenso en las tasas de resistencia de *S. pneumoniae*. Sin embargo, en los siguientes años se produjo un incremento de los serotipos no incluidos en esa vacuna, especialmente el serotipo 19A que está frecuentemente asociado a resistencia antibiótica¹³⁷.

9.1. Betalactámicos.

El hallazgo del primer antibiótico betalactámico se remonta a 1928, cuando Fleming descubrió que un hongo del género *Penicillium* (*Penicillium notatum*) producía una sustancia, llamada penicilina por el mismo, capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus*. En 1948 Brotzu obtuvo la primera cefalosporina, una sustancia activa frente a *S. aureus*, a partir del hongo *Cephalosporium acremonium*.

Penicilinas y cefalosporinas conforman el grupo de antibióticos más numeroso y de mayor importancia en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Su relevancia radica en su potente acción bactericida, el amplio espectro antibacteriano de sus derivados, la existencia de preparados que generalmente resisten la inactivación enzimática inducida por las bacterias, sus características farmacocinéticas favorables (buena absorción oral, buena difusión tisular o notable aumento de la semivida en algunos derivados) y, por último, los escasos efectos adversos asociados a su uso.

La resistencia de *S. pneumoniae* a betalactámicos se produce por alteración de las proteínas fijadoras de penicilina, conocidas como PBPs (*penicillin binding proteins*) que catalizan diferentes pasos en la formación del peptidoglicano. Los betalactámicos forman una unión covalente con las PBPs dependientes de serina, así, cuando se producen alteraciones en la secuencia de los genes que codifican para las PBPs, se modifica la estructura de la proteína de forma que estos antibióticos pierden afinidad por las PBPs y su acción disminuye; siendo necesarias, por tanto, mayores concentraciones de fármaco.

La similitud estructural que existe entre el anillo betalactámico y el sustrato de la transpeptidación (el extremo carboxi-terminal de los péptidos del peptidoglicano, D-alanil-D-alanina) permite al antibiótico bloquear la síntesis de la pared celular.

En esta familia de antibióticos destacan la amoxicilina, como el antibiótico más utilizado del grupo de las penicilinas, y también ceftriaxona y cefotaxima por su amplia utilización en el tratamiento hospitalario de la ENI.

S. pneumoniae contiene seis PBPs, cinco de ellas de alto peso molecular (1a, 1b, 2a, 2x, 2b) que actúan como transpeptidasas en la síntesis de la pared celular; la PBP restante (PBP3), de bajo peso molecular, tiene actividad carboxipeptidasa regulando el grado de entrecruzamiento del peptidoglucano.

Los neumococos no sensibles a penicilina se caracterizan por mosaicismos de los genes *pbp2x*, *pbp2b* y *pbp1a* generados como consecuencia de la recombinación con especies estrechamente relacionadas que también habitan en la orofaringe humana, como *S. oralis* y *S. mitis*, el grado de alcance de estas alteraciones determina las concentraciones de β -lactámicos a los que el genotipo no es sensible.

Además, *pbp2x* y *pbp1a* flanquean estrechamente el locus de síntesis de polisacáridos de la cápsula que determina el serotipo neumocócico¹³⁸. Por lo tanto, las recombinaciones de "cambio de serotipo" que permiten el escape de la vacuna también pueden afectar a *pbp2x* y *pbp1a*. Experimentos de laboratorio han demostrado que una sola gran recombinación homóloga mediada por transformación puede disminuir la sensibilidad a la penicilina y cambiar el serotipo de un aislado¹³⁹. Por el contrario, los cambios de serotipo en una cepa no sensible pueden hacer que *pbp2x* y *pbp1a* vuelvan a convertirse en alelos asociados a la sensibilidad¹⁴⁰ (Figura 15).

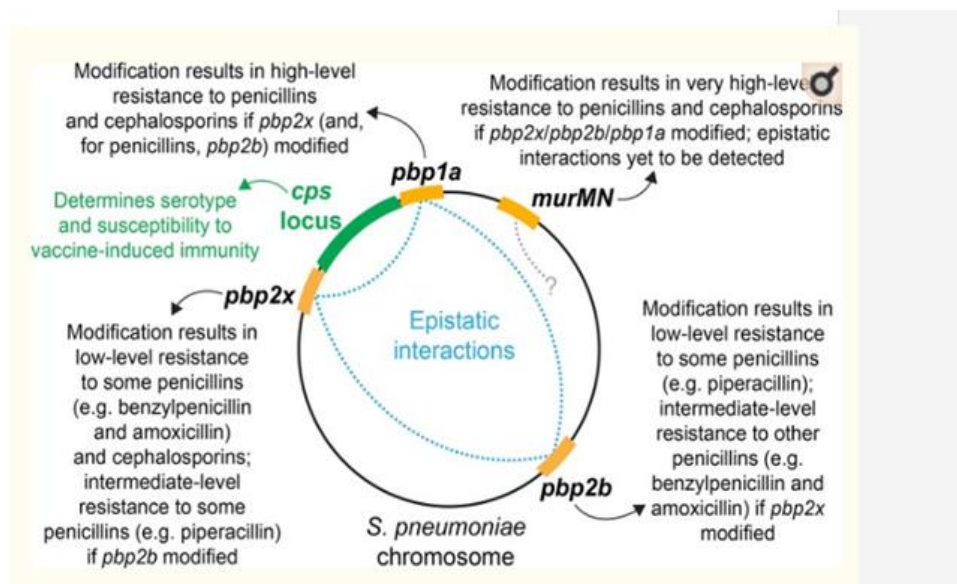


Figura 15. Determinantes genéticos de la sensibilidad a betalactámicos y su posicionamiento relativo en el cromosoma de *S. pneumoniae*, (adaptado de Dewé et al, 2019).

Para la vigilancia del impacto de la PCV en la enfermedad neumocócica algunos países ya están realizando la secuenciación rutinaria del genoma completo. Sin embargo, la diversidad de los alelos *pbp2x* / *2b* / *1a* hace que la predicción de la no sensibilidad a la penicilina del genoma sea un desafío, especialmente considerando la importancia de determinar con precisión las CMI de múltiples betalactámicos¹⁴¹.

La definición de resistencia a penicilina ha cambiado con los años, e incluso, actualmente, depende del foco de la infección. Los puntos de corte publicados en la edición de 2008 del *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) eran distintos para infección meningea y también en función de la vía de administración de la penicilina, con puntos de corte más altos para la administración oral.

Las alteraciones de las PBP2b y PBP1a se asocian más a un alto nivel de resistencia a penicilina y las de la PBP2x a resistencias de bajo nivel.

Para la expresión de la resistencia a betalactámicos se requiere la presencia de un gen *murM* funcional¹⁴². Este gen está implicado en la síntesis de un sustrato fisiológico alternativo para las PBPs. El nivel de resistencia a betalactámicos debido a la baja afinidad de las PBPs puede ser incrementado por la presencia de genes *murM* en mosaico. La adquisición de resistencia a penicilina ha sido gradual y ha necesitado un largo período de evolución hasta la aparición de cepas con alto nivel de resistencia.

Las PBPs alteradas tienen disminuida su afinidad por todos los antibióticos betalactámicos. Aunque la ceftriaxona, cefotaxima y los carbapenemes son los menos afectados¹³⁷ y son generalmente los compuestos más activos¹⁴³. El primer neumococo no sensible a penicilina fue descrito en Australia en 1967 en un paciente pediátrico¹⁴⁴, en los siguientes años se fueron identificando cepas resistentes a penicilina incluso en pacientes que no habían estado expuestos a terapias con penicilina¹⁴⁵. El primero caso de resistencia a penicilina descrito en España fue en 1979¹⁴⁶.

Además, estas cepas suelen ser resistentes a otras familias de antibióticos y la mayoría pertenecen a los serotipos 6A, 6B, 14, 19, y 23F. Excepto para las fluoroquinolonas, cuyas tasas de resistencia en todo el mundo son inferiores al 2,5%, la actual resistencia antibiótica de *S. pneumoniae* depende de factores geográficos, consumo de antibióticos y de la introducción de las vacunas conjugadas.

9.2. Macrólidos.

Son un grupo de antibióticos que se caracterizan por tener un anillo macrocíclico de lactona, el cual varía en el número de átomos de carbono, desde 12 a 16. El primer macrólido descubierto fue la eritromicina en 1952 por McGuire en los productos metabólicos de una cepa de *Streptomyces erythreus* (hoy *Saccharopolyspora erythraea*), llegando a ser el antibiótico de elección en pacientes alérgicos a la penicilina.

Los macrólidos inhiben la síntesis proteica mediante la unión reversible a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, inhibiendo la translocación del aminoacil-tARN. Pueden tener un efecto bacteriostático o bactericida, según la especie bacteriana, la concentración del antibiótico alcanzada en el foco de la infección o la fase de crecimiento en que se encuentran las bacterias. Los macrólidos ejercen su efecto en bacterias que se encuentran en proceso de replicación y penetran mejor en bacterias Gram positivas.

Claritromicina y azitromicina son derivados sintéticos de la eritromicina con modificaciones estructurales que les permiten una mayor actividad frente a bacterias Gram negativas, además de resistir mejor la degradación por pH gástrico y penetrar mejor en los tejidos.

En *S. pneumoniae*, la resistencia al grupo de los macrólidos puede ser debida a tres mecanismos:

- **Modificación enzimática de la diana ribosomal.** La presencia de metilasas tipo *erm* que metilan el residuo adenina de la posición 2458 del ARNr 23S impide la unión eficaz de estos antibióticos a su diana. La presencia de estas metilasas es el mecanismo más frecuente de resistencia a macrólidos de *S. pneumoniae* en nuestro país. Esta alteración codificada por el gen *erm* tiene tendencia a generar un alto nivel de resistencia a macrólidos, con CMI generalmente >32 mg/L¹⁴⁷. En neumococo se han detectado dos tipos de metilasas: *ermA*, descrita inicialmente en *S. pyogenes* y extremadamente rara en neumococo, y *ermB*. Estas metilasas confieren el fenotipo MLS_B de resistencia, que puede ser inducible o constitutivo, afectando además de a los macrólidos a lincosamidas y estreptograminas.
- **Presencia de bombas de expulsión activa de la familia *mef*.** Estas bombas disminuyen la concentración intracitoplasmática del antibiótico. Son un sistema de bomba de flujo codificado por el gen *mef*¹⁴⁸ y pueden ser de tres tipos: *mefE* (la más frecuente), *mefA* y *mefI*. Confieren el fenotipo M de resistencia que se caracteriza por resistencia a macrólidos de 14 y 15 átomos y sensibilidad a macrólidos de 16 átomos, lincosamidas, estreptograminas y cetólidos. La presencia de una bomba Mef conlleva generalmente una resistencia a eritromicina con CMIs de 8-32 mg/L, aunque pueden oscilar entre 0,5-125 mg/L.
- **Modificaciones en la diana ribosomal.** Puede modificarse debido a mutaciones en los genes que codifican las proteínas ribosomales (L4 y L22) o por alteraciones en el rARN. Este mecanismo es muy raro y confiere elevada resistencia a eritromicina y clindamicina.

La frecuencia de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a macrólidos ha ido aumentando en las tres últimas décadas hasta alcanzar cifras del 20-30% en infecciones graves. Más del 90% de los aislamientos de *S. pneumoniae* con resistencia a macrólidos en nuestro país presentan el fenotipo MLS_B¹⁴⁹. La presencia del fenotipo M ha aumentado desde el 3% en los años 90 hasta el 10% en la actualidad¹⁵⁰.

Los genes que codifican la resistencia a macrólidos se localizan en transposones conjugativos, lo que ha facilitado la diseminación de la resistencia a este grupo de antibióticos.

9.3. Quinolonas.

Las primeras quinolonas que se utilizaron en clínica fueron el ácido nalidíxico y el ácido pipemídico. Luego se introdujeron norfloxacin, ciprofloxacino y, más tarde, levofloxacino y moxifloxacino. La diferencia fundamental entre las dos primeras y el resto es que aquellas solo actúan sobre bacterias Gram negativas.

Son antibióticos bactericidas de amplio espectro cuyo mecanismo de acción es interferir en la replicación del ADN al bloquear o inhibir la acción de la ADN girasa. Su uso se ha incrementado sustancialmente desde los 90 debido a su amplio espectro, excelente biodisponibilidad, buena accesibilidad, tanto vía oral como parenteral, y altos niveles de concentración en suero y tejidos¹⁴⁷. Sin embargo, en 2007, las guías para el manejo de la neumonía adquirida en la comunidad de la *Infectious Disease Society of America* (IDSA) consideraron a ciprofloxacino y a las quinolonas previas no recomendables para el tratamiento empírico de la infección respiratoria o causada por neumococo¹⁵¹.

El nivel de superenrollamiento del ADN está controlado por tres topoisomerasas (I, II y IV). La topoisomerasa tipo II o girasa y la topoisomerasa IV, son proteínas tetraméricas con dos subunidades: *GyrA* 2 *GyrB* 2 en girasa, y *ParC* 2 *ParE* 2 en Topo IV. La homeostasis del superenrollamiento se logra mediante las actividades competitivas de la girasa y la topoisomerasa I más IV; mientras la girasa introduce superenrollamientos negativos en el ADN, la topoisomerasa I relaja el ADN y la IV relaja el ADN y además participa en la partición cromosómica¹⁵². El lugar de acción de las quinolonas es nivel de las topoisomerasas tipos II y IV

El principal mecanismo de resistencia a quinolonas en *S. pneumoniae* son las mutaciones en las regiones determinantes de resistencia a fluoroquinolonas (QRDRs)¹⁵³: la ADN topoisomerasa IV (codificada por los genes *ParC* y *ParE*) y la ADN girasa (codificada por los genes *GyrA* y *GyrB*). Estas mutaciones pueden darse de forma combinada o por separado. La resistencia de bajo nivel a levofloxacino (CMI 4-16 mg/L) se debe a mutaciones puntuales en las QRDRs de una de las dos subunidades de la topoisomerasa IV: *ParC* (Ser79, Ser80 o Asp83), o *ParE* (Asp435). Mientras que la resistencia de alto nivel (CMI ≥ 32 mg/L) se debe a mutaciones en las dos QRDRs: topoisomerasa IV (*ParC*) y ADN girasa (*GyrA*, Ser81 y Glu85), o topoisomerasa IV (*ParE*) y ADN girasa (*GyrA*). Hay estudios que sugieren que la resistencia también puede ser adquirida por recombinación intra o interespecífica con estreptococos del grupo *mitis*^{153,154}.

La sobreexpresión de bombas de eflujo es otro de los mecanismos de resistencia a quinolonas en *S. pneumoniae*. La expresión de bombas de eflujo está regulada principalmente por el gen *PmrA*, aunque también han sido descritos otros genes como *PatA* y *PatB*¹⁵⁵. Sin embargo, la sensibilidad a la acción de las bombas de eflujo depende de la quinolona; así, levofloxacino presenta una baja sensibilidad a su sobreexpresión, mientras que ciprofloxacino es altamente sensible¹⁵⁶.

La frecuencia de resistencia a fluoroquinolonas en *S. pneumoniae* en España se sitúa alrededor del 5%, siendo más frecuente en mayores de 65 años, con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y que hayan recibido tratamientos previos con quinolonas. A pesar de la baja

resistencia detectada a fluoroquinolonas existen varios estudios en los que se han observado fallos terapéuticos¹³⁷.

Es muy importante la detección de las cepas con mutaciones en *ParC*, que confieren baja resistencia a quinolonas. Algunas de estas cepas tienen una CMI de levofloxacino de 2 mg/L y son aparentemente sensibles, pero en el curso de un tratamiento con fluoroquinolonas pueden seleccionar *in vivo* mutaciones en *GyrA* que confieren un alto nivel de resistencia y llevarían al fracaso terapéutico. En las dos últimas décadas se han descrito varios casos de fallo del tratamiento con fluoroquinolonas en pacientes infectados con cepas de *S. pneumoniae* aparentemente sensibles^{157,158}.

II OBJETIVOS

II. OBJETIVOS.

S. pneumoniae es uno de los principales patógenos causantes de enfermedad invasiva en todo el mundo, constituyendo un grave problema de salud pública. La mortalidad asociada a ENI oscila entre un 5% en la neumonía no complicada en el adulto hasta un 30% en cuadros graves en pacientes con enfermedades de base, ancianos, así como en casos de meningitis. Asimismo, *S. pneumoniae* es paradigma en el estudio de la evolución de la resistencia a los antimicrobianos y en el estudio de la estructura poblacional en los que la utilización de los antimicrobianos y la implantación de políticas de vacunación han determinado modificaciones relevantes en los últimos años.

Hasta hoy, se han identificado alrededor de 100 serotipos de *S. pneumoniae*, pero apenas 15 eran los responsables de la mayoría de las infecciones invasivas (bacteriemia, neumonía y meningitis) además de otras (otitis, sinusitis y neumonías sin bacteriemia). La hipótesis en la que se apoya este trabajo es que la prevalencia y distribución de los serotipos de *S. pneumoniae* causantes de ENI en la CV puede ser diferente a la de otros estudios nacionales o internacionales. Además, esta distribución de serotipos puede verse afectada por la introducción de las vacunas conjugadas que se han ido comercializando en los últimos años. Conocer estos datos, así como la tasa de resistencia del neumococo a los principales antibióticos y estudiar las estructuras genéticas responsables de la resistencia antibiótica en nuestro medio podría ayudar a planificar estrategias para el control y tratamiento de la ENI en nuestro entorno.

Los objetivos del presente estudio son:

1. Conocer la distribución de los serotipos capsulares de *S. pneumoniae* invasivos en la Comunitat Valenciana.
2. Determinar el impacto de las vacunas anti-neumococo en la distribución de los serotipos circulantes en nuestro medio.
3. Determinar la sensibilidad de *S. pneumoniae* a penicilina, ceftriaxona, levofloxacino y eritromicina mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria.
4. Describir los mecanismos de resistencia de *S. pneumoniae* a betalactámicos, macrólidos y quinolonas más importantes en nuestro medio.

III MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

El presente estudio se ha diseñado como una investigación de tipo descriptiva y experimental. Por una parte, se analizaron los serotipos circulantes en nuestro medio, su distribución por grupos de edad y sexo y, además, se caracterizaron los fenotipos y genotipos de resistencia a los antibióticos más utilizados.

Para ello, se incluyeron en el estudio todos los aislamientos invasores de *S. pneumoniae* en la CV durante el período 2007-2018 (3.829 cepas) procedentes de 31 hospitales como parte del programa de vigilancia de la ENI.

El Ministerio de Sanidad y Consumo en 2003 coordinó un estudio, cuyo objetivo era conocer la incidencia de la enfermedad invasora por *S. pneumoniae* en menores de cinco años, en el que participaron 15 CC. AA. Una de las conclusiones de este estudio fue la necesidad de incluir la enfermedad invasora en el sistema de vigilancia de las enfermedades de declaración obligatoria. De esta manera, la ENI pasó a ser una enfermedad de declaración obligatoria desde el 1 de enero de 2007. Desde entonces las cepas aisladas de muestras clínicas en los diferentes laboratorios de Microbiología de la CV, e incluidas en la definición de caso, se envían para su serotipado al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (HUyPLF) que actúa como laboratorio de referencia.

1. DEFINICIÓN DE CASO.

La definición de caso de ENI, para su inclusión en el registro de EDO, viene determinada por el aislamiento de *S. pneumoniae* en una localización normalmente estéril como sangre, LCR, líquido sinovial, exudado pleural, líquido pericárdico o ascítico.

2. CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LOS CASOS.

Clínicamente, los casos se han clasificado según la localización de la infección:

- **Neumonía:** Bacteriemia por *S. pneumoniae* con clínica de infección del tracto respiratorio inferior y presencia de un infiltrado en la radiografía de tórax.
- **Empiema pleural:** Aislamiento de *S. pneumoniae* en líquido pleural.
- **Meningitis:** Aislamiento de *S. pneumoniae* en LCR con síntomas clínicos de afectación meníngea.

- **Peritonitis:** Aislamiento de *S. pneumoniae* en líquido ascítico acompañado de síntomas clínicos compatibles con peritonitis.
- **Endocarditis:** Aislamiento de *S. pneumoniae* en sangre coincidente con signos de afectación valvular cardíaca.
- **Pericarditis:** Aislamiento de *S. pneumoniae* en líquido o tejido pericárdico acompañado de dolor torácico y ECG característico.
- **Artritis:** Aislamiento de *S. pneumoniae* en líquido sinovial acompañado de la correspondiente clínica articular. La artritis séptica neumocócica suele ser una complicación de una bacteriemia neumocócica en otro foco, en especial una meningitis o una endocarditis.
- **Sepsis:** Bacteriemia por *S. pneumoniae* acompañada síntomas o signos clínicos de gravedad (fiebre superior a 38°C, taquicardia, taquipnea o hipotensión).
- **Bacteriemia oculta:** La bacteriemia oculta es la presencia de una bacteria en el torrente sanguíneo de un niño que tiene fiebre pero buen aspecto y que no presenta una fuente evidente de infección. La causa más frecuente de bacteriemia oculta es *S. pneumoniae*.

3. CONDICIONES DEL CULTIVO.

Las muestras clínicas de los pacientes de nuestro hospital fueron procesadas según los procedimientos normalizados de trabajo de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)^{159,160}. Las muestras de sangre fueron inoculadas en frascos con caldo de tripticasa soja suplementado BACT/ALERT® FA PLUS y FN PLUS (BioMerieux, Lyon, Francia) en caso de pacientes adultos o PF PLUS (BioMerieux, Lyon, Francia) en pacientes pediátricos. Los frascos se incubaron a 37°C con monitorización continua en el sistema BACT/ALERT® VIRTUO® (BioMerieux, Lyon, Francia).

Las cepas remitidas desde los otros hospitales fueron subcultivadas en agar BD Columbia III® con 5% de sangre de cordero (Becton Dickinson, New Jersey, EE.UU.).

La preservación de las cepas se realizó preparando suspensiones densas de las cepas en glicerol y congeladas a -80°C.

4. TÉCNICA DE SEROTIPADO.

La serotipificación de todas las cepas aisladas se realizó mediante la técnica *Streptococcus pneumoniae* Antisera de Denka Seiken (Tokyo, Japón).

Esta técnica se basa en la observación de la reacción de Quellung, técnica “gold standard” para el serotipado del neumococo, que consiste en clasificar los aislados de *S. pneumoniae* en función de la aglutinación de los polisacáridos capsulares frente a antisueros específicos. Los criterios utilizados que definen los conceptos de serotipo y serogrupo en *S. pneumoniae* son los internacionalmente aceptados:

- **Serotipo:** tipo de antígeno que se encuentra en la cápsula de *S. pneumoniae*.
- **Serogrupo:** estructura antigénica que se comparte dentro de un grupo capsular. Por ejemplo, el serogrupo 19 incluye los serotipos 19A y 19F.

El principio de la técnica consiste en mezclar el reactivo con células de *S. pneumoniae*. Si estas presentan el antígeno correspondiente al anticuerpo del reactivo se produce una aglutinación observable macroscópicamente.

En nuestro estudio el reactivo utilizado fue *S. pneumoniae* Antisera (Denka Seiken, Tokyo, Japón) que contiene anticuerpos procedentes de conejos infectados con cepas de referencia. Todos los sueros están agrupados a su vez en sueros polivalentes de manera que primero se realiza la aglutinación con sueros polivalentes y cuando es positivo se realiza la aglutinación frente a todos los serogrupos incluidos en el polivalente, siguiendo el procedimiento que se describe en la Tabla 2.

Tabla 2. Serotipos incluidos en los sueros polivalentes.

Suero polivalente	Serotipo o serogrupo									
	Incluido en vacunas					No incluido en vacunas				
1	1	2	3	4	5					
2	6	8	9	10						
3	11	12	14	15		16				
4	17	18	22			21				
5	20	33				29	31	34	35	47
6	23					25	28	41	46	
7						27	32	36	38	39
8	7	19				24	40			
No incluido						37				

Una vez conocido el serogrupo debe tenerse en cuenta que muchos serogrupos están constituidos por 2 o más serotipos específicos por lo que debe realizarse una tercera aglutinación. El serotipo específico se detecta utilizando sueros de factores específicos que reconocen antígenos o grupos antigénicos cuyas reacciones se muestran en la Tabla 3¹⁶¹.

Tabla 3. Esquema de aglutinación de serogrupos con varios serotipos.

Serotipo específico	Reacción suero del factor específico			
Tipo 6 6A 6B	6b	6c		
	+	-		
	-	+		
Tipo 7 7A 7B 7C 7F	7b	7c	7e	7f
	+	+	-	-
	-	-	+	-
	-	-	-	+
	+	-	-	-
Tipo 9 9A 9V 9N 9L	9d	9e	9f	
	+	-	-	
	+	-	-	
	-	+	-	
	-	-	+	
Tipo 10 10A 10f	10b	10c		
	-	+		
	+	-		
Tipo 11 11A 11B 11C 11F	11c	11f	11g	
	+	-	-	
	-	+	+	
	+	+	-	
	-	-	+	
Tipo 15 15A 15B 15C 15F	15b	15e	15f	15g
	-	-	-	+
	+	+	-	-
	-	+	-	-
	+	-	+	-
Tipo 18 18A 18B 18C 18F	18c	18d	18e	18f
	-	+	-	-
	-	-	+	-
	+	-	+	-
	+	-	-	+
Tipo 19 19A 19B 19C 19F	19b	19d	19e	19f
	-	+	-	-
	-	-	+	-
	-	-	-	+
	+	-	-	+
Tipo 22 22A 22F	22b	22c		
	-	+		
	+	-		
Tipo 23 23A 23B 23F	23b	23c	23d	
	-	+	-	
	+	-	+	
	+	-	-	
Tipo 24 24A 24B 24F	24b	24c		
	-	+		
	+	-		
	+	-		
Tipo 32 32A 32F	32b			
	+			
	-			
Tipo 33 33A 33B 33C 33F	20b	33b	33e	33f
	+	-	-	-
	-	-	+	+
	-	-	+	-
	-	+	-	-
Tipo 35 35A 35B 35C 35F	20b	29b	35b	42 ^a
	+	-	-	-
	-	+	-	-
	+	-	-	+
	-	-	+	-

5. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA.

En todas las cepas se realizó un estudio de sensibilidad con la técnica de difusión en agar mediante tiras de ETEST®. Este método consiste en un gradiente predefinido de concentraciones de antibiótico dispuestas sobre una tira de plástico que se coloca encima de la placa de agar sembrada previamente con la cepa a estudio y que permite determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antibiótico (Figura 16).

El estudio de sensibilidad se realizó en agar MH-F (agar Mueller-Hinton con 5% de sangre de caballo desfibrinada y 20 mg/L de β -NAD). Tanto el agar MH-F como las tiras de ETEST fueron suministradas por BioMerieux (Lyon, Francia). Los antibióticos analizados en todos los aislamientos de neumococo incluidos en el estudio fueron penicilina, ceftriaxona, eritromicina y levofloxacin. Para clasificar cada aislado se siguieron los puntos de corte establecidos por el CLSI para los años que cubre el período de estudio (2007–2018).



Figura 16. Antibiograma de *S. pneumoniae* con la técnica E-test de una cepa resistente a eritromicina.

6. TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

Todas las cepas resistentes o con sensibilidad disminuida a los antibióticos estudiados fueron analizadas mediante TAAN para conocer el genotipo de resistencia.

6.1. Extracción de ácidos nucleicos.

Se realizó con una suspensión de las colonias de la cepa a estudiar en 0,5 mL de glicerol. Posteriormente se realizó una digestión proteolítica con tampón de digestión (Tris HCl 50mM, EDTA 1mM, SDS 0,5%, pH 8,5) y proteinasa K 20 mg/mL (QIAGEN®, Hilden, Alemania)) en proporción 10:1. A continuación, las muestras se agitaron en vórtex y se incubaron a 56 ° C en un termomezclador Eppendorf® de 1400 rpm hasta su completa lisis¹⁶².

La purificación del ADN se realizó de forma automatizada por el sistema QIAasympphony (QIAGEN®) siguiendo el protocolo complex con el kit mini (*virus and pathogens*) tomando 200 µL de la muestra obtenida tras el tratamiento con proteinasa K para obtener finalmente 60 µL de eluido.

6.2. Amplificación de ácidos nucleicos.

Composición de la mezcla de reacción.

La composición de la mezcla de reacción para la amplificación de ADN es la misma en todas las reacciones de amplificación que se detallan a continuación. La composición que se utilizó en los diferentes estudios moleculares se resume en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición de la mezcla de reacción.

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración final
Buffer (Go Taq Flexi Buffer) 5x	200	1x
MgCl ₂	120	3 mM
dATP	2	0,2 mM
dTTP	2	0,2 mM
dCTP	2	0,2 mM
dGTP	2	0,2 mM
Oligonucleotido/s F	4	0,4 µM
Oligonucleotido/s R	4	0,4 µM
H ₂ O para uso molecular	Hasta 800 µL	

Composición de la reacción de PCR.

En todos los casos se utilizó, por cada reacción de PCR, 40 µL de mezcla de reacción + 0,5 µL Taq polimerasa GoTaq (Promega, Madison, WI, EE.UU.) + 10 µL del eluido de ADN.

Visualización del producto amplificado por electroforesis.

Se realizó en un gel de agarosa al 2% previamente marcado con PeqGreen (PeqLab, Reino Unido) (6 µL por cada 100 mL de agarosa fundida). La duración habitual de la electroforesis fue de 40 minutos con un voltaje de 100 v. El marcador de peso molecular utilizado (Promega, Madison, WI, EE.UU.) genera 6 bandas a 50, 150, 300, 500, 750 y 1000 pb. La visualización de los geles se realizó en el sistema de visualización Proxima 2500-T (Isogen, Alemania) a 302 nm.

6.2.1. Macrólidos.

Para la amplificación de los genes *erm* y *mef* se utilizaron los siguientes cebadores:

- *erm*:
 - *ermF* 5'-₇₂₁CGT ACC TTG GAT ATT CAC CG₇₄₀-3'
 - *emrR* 5'-₉₄₄GTA AAC AGT TGA CGA TAT TCT CG₉₂₂-3'

Con un tamaño del amplicón de 224 pb.

- *mef*:
 - *mefF* 5'-₁₈₀CTG TAT GGA GCT ACC TGT CTG G₁₉₉-3'
 - *mefR* 5'-₅₈₁CCC AGC TTA GGT ATA CGT AC₅₆₇-3'

Con un tamaño del amplicón de 402 pb

Además, como marcador de especie de *S. pneumoniae*, se realizó la detección del gen *lytA* responsable de la autólisis, para lo cual se utilizaron como cebadores:

- *lytA*:
 - *lytAF* 5'-₆₈₁CAA CCG TAC AGA ATG AAG CGG₇₀₁-3'
 - *lytAR* 5'-₉₉₉TTA TTC GTG CAA TAC TCG TGC G₉₇₈-3'

Con un tamaño del amplicón de 319 pb.

Las reacciones de amplificación de los genes que confieren resistencia a los macrólidos se realizaron bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C (2 min) seguida de

30 ciclos de desnaturalización a 94°C (30 seg), hibridación a 53°C (45 seg) y elongación a 72°C (1 min) y una elongación final a 72°C (5 min).

Después de la amplificación, se tomaron 10 µL de cada muestra obtenida y se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Si las bacterias aisladas presentaban los genes *erm* y/o *mef* aparecían unas bandas en el gel. En cambio, el gen *lyt*, utilizado como marcador de especie, aparecía en todos los aislados, tal como se muestra en la Figura 17.

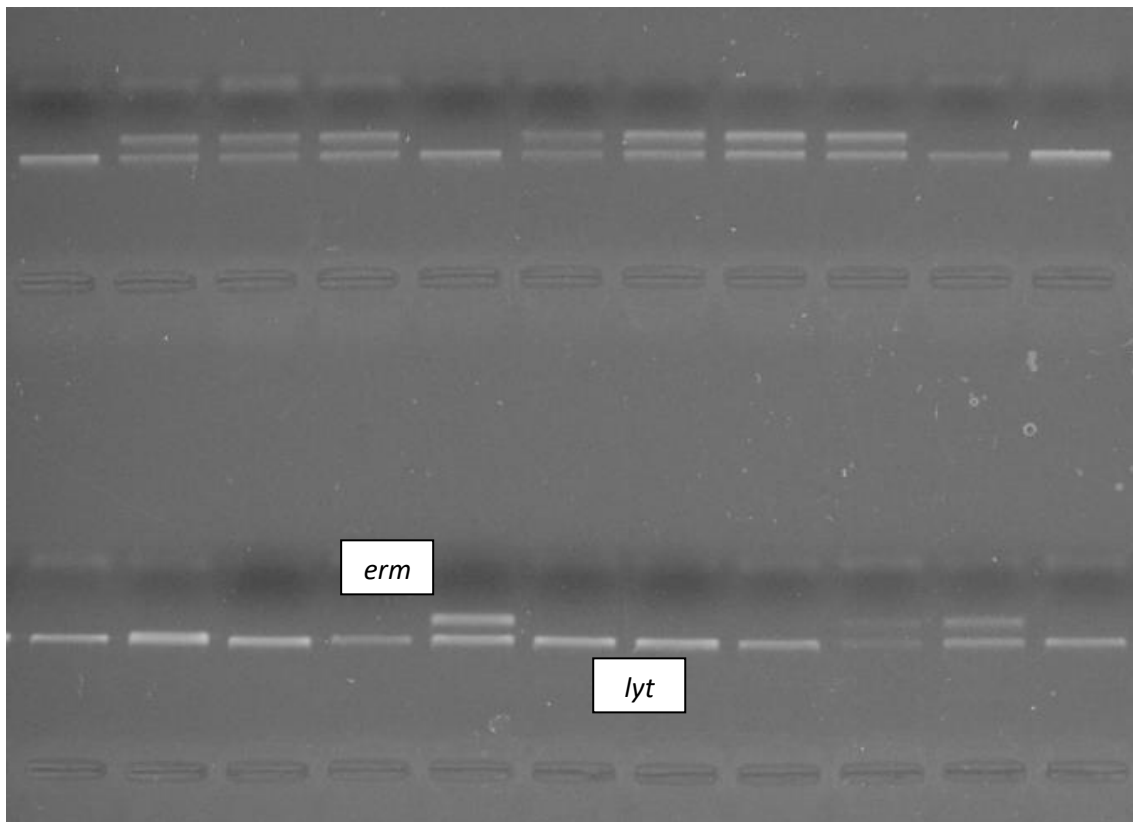


Figura 17. Amplificación de cepas de *S. pneumoniae* con resistencia a macrólidos. Banda que corresponde al gen *lyt* presente en todas las cepas. Banda del gen *erm* presente en algunas cepas.

6.2.2. Quinolonas.

Para evaluar si los aislados clínicos de *S. pneumoniae* resistente o con sensibilidad disminuida a quinolonas eran portadores de mutaciones en los genes, se amplificaron las secuencias de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*.

Los cebadores utilizados fueron:

- *gyrA*:
 - *gyrA*1 5'-CGT CGC ATT CTC TAC GGA-3'
 - *gyrA*2 5'-CGT TCG CAT TCT CTA CGG A-3'

Con un tamaño del amplicón de 235 pares de bases (de la 342 a 595) correspondiente a los aminoácidos de las posiciones 115-198.

- *gyrB*:
 - *gyrB*1 5'-CTC TTC AGT GAA GCC TTC TCC-3'
 - *gyrB*2 5'-CTC CAT CGA CAT CGG CAT C-3'

Tamaño del amplicón 453 bp (de 1080 a 1533) para los aminoácidos 361-511.

- *parC*:
 - *parC*1 5'-TGA CAA GAG CTA CCG TAA GTC G-3'
 - *parC*2 5'-TCG AAC CAT TGA CCA AGA GG-3'

Tamaño del amplicón 337 bp (de 164-501) para los aminoácidos 55-167.

- *parE*:
 - *parE*1 5'-ACG TAA GGC GCG TGA TGA G-3'
 - *parE*2 5'-CTA GCG GAC GCA TGT AAC G-3'

Tamaño del amplicón 413 bp (de 1175 a 1587) para los aminoácidos 392-529.

En el procesamiento de los cebadores y de las muestras se procedió de igual forma que en el estudio de la resistencia a los macrólidos.

La amplificación de los genes que confieren resistencia a quinolonas se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C (2 min), seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C (30 seg), hibridación a 52°C (45 seg) y una elongación a 72°C (1 min). Tras los 30 ciclos una elongación final a 72°C (5 min) ¹⁶³.

Después de la amplificación se tomaron 10 µL del amplificado y fue sometido a electroforesis en gel de agarosa para comprobar que la amplificación había sido correcta.

En aquellas muestras donde se constató la amplificación de los genes se procedió a la secuenciación de dichos amplicones por el método Sanger.

Para la secuenciación del genoma se realizó:

- Primero una purificación del ADN amplificado previamente. El proceso de purificación fue llevado a cabo mediante PCR Purification Kit QIAquick®.
- Una vez purificadas, se procedió a la medición de la cantidad de ADN Nanodrop.
- Posteriormente se realizó la reacción de secuenciación del material genético purificado utilizando Genome Lab DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter, CA, EEUU). Los cebadores utilizados fueron los mismos que los utilizados en la reacción de amplificación.
- Tras la purificación por columna de gel se procedió a la electroforesis capilar empleando el sistema GenomeLab®GeXP (Beckman Coulter, CA, Estados Unidos).
- El análisis de las secuencias obtenidas se realizó mediante el programa Sequencher (Gene Codes Corporation).

6.2.3. Betalactámicos

Para confirmar la presencia de mutaciones en *pbp1a*, *pbp2b* y *pbp2x* en las cepas con sensibilidad disminuida a penicilina y ceftriaxona se realizó la prueba de reacción en cadena de la polimerasa descrita por Jalal et al¹⁶⁴.

Los cebadores utilizados para los genes estudiados fueron los siguientes:

- *pbp2b*
 - B1 5'-ACT CAG GCT TAC GGT CAT T-3'
 - B2 5'-ACG AGG AGC CAC ACG AAC AC-3'Tamaño del amplicon: 359 pb.
- *pbp2x*
 - X1 5'-GCT ATG CTG GAG CCT AAA TT-3'
 - X2 5'-AAC CCG ACT AGA TAA CCA CC-3'Tamaño del amplicon: 277 pb.
- *Pbp1a*
 - A1 5'-AGG TCG GTC CTA GAT AGA GCT-3'
 - A2 5'-GAG CTA CAT AGC CAG TGT CTC-3'Tamaño del amplicón 423 pb.

La amplificación de los genes se realizó bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94°C (durante 2 min), seguido de 30 ciclos que constan cada uno de desnaturalización a 94°C (30 seg), hibridación a 59°C (45 seg) y una elongación a 72°C (2 min). Tras los 30 ciclos una elongación final a 72°C (7 min)¹⁶².

6.3. Secuenciación genómica.

Para obtener más información sobre los mecanismos de resistencias de quinolonas y betalactámicos relacionados con mutaciones en genes que codifican las dianas de estos antibióticos se realizó la secuenciación genómica de 35 cepas de *S. pneumoniae*.

Esta técnica nos permitió corroborar y ampliar la información de la resistencia de quinolonas ligadas a mutaciones en los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* que obtuvimos de la secuenciación Sanger de un fragmento de estos. Además, nos permitió conocer las mutaciones en los genes *pbp1b*, *pbp2a*, *pbp2b* y *pbp2x* de aquellas cepas detectadas por PCR a punto final.

Aunque no es el propósito de esta tesis, la secuenciación genómica también nos proporcionó información sobre mecanismos de resistencia asociadas a elementos genéticos móviles de otros grupos de antibióticos no estudiados, factores de virulencia y epidemiología molecular (MLST y cg-MLST).

La secuenciación genómica se realizó en nuestro Servicio de Microbiología, utilizando para preparar la librería el kit de Illumina DNA Prep Tagmentation y posteriormente la secuenciación se realizó utilizando lecturas 2x300 *paired-end* en el secuenciador de NGS MiSeq.

Los archivos *fastq* obtenidos fueron sometidos al programa Kraken¹⁶⁵ para identificar el genoma de referencia más cercano disponible y la evaluación del ensamblaje se realizó con el programa QUAST¹⁶⁶, posteriormente se utilizó el programa BioEdit para la búsqueda de las mutaciones que supongan un cambio en el aminoácido codificado.

Además, también se realizó un análisis con distintas herramientas bioinformáticas, de libre acceso, disponibles en Internet que se encuentran alojadas en la página web del Center for Genomic Epidemiology (Dinamarca). Dentro de esta página web, en concreto la herramienta core genome MLST, nos permitió acceder a la secuencia completa de los genes: *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, *pbp1b*, *pbp2a*, *pbp2b* y *pbp2x*.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se ha realizado una estadística descriptiva de cada variable obteniendo la distribución de frecuencias absoluta y relativa de cada una de ellas.

La relación o asociación entre las variables cualitativas se evaluó utilizando la prueba χ^2 . Se consideró una asociación significativa con un valor de $P \leq 0,05$; para ello, se utilizó el programa estadístico Epi info[®] del CDC.

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. DISTRIBUCIÓN DE LOS EPISODIOS DE ENI EN LA COMUNITAT VALENCIANA.

Entre enero de 2007 y diciembre de 2018 se aislaron en nuestro hospital 564 cepas de *S. pneumoniae* en muestras clínicas de procesos invasivos y se recibieron 3.265 cepas de otros 27 centros hospitalarios, como parte de la red de vigilancia de la enfermedad neumocócica invasiva de la CV (Tabla 5).

Tabla 5. Hospitales participantes en la red de vigilancia de ENI en la CV y número de aislados por año.

HOSPITAL	AÑO												TOTAL
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	
La Fe	69	82	59	46	35	30	42	26	30	40	48	57	564
General Valencia	21	39	33	30	28	26	20	20	24	35	25	42	343
Arnau Vilanova	37	26	34	27	20	13	14	21	14	22	23	20	271
General Alicante	14	17	20	1	22	12	32	23	28	37	31	31	268
Clínico Valencia	39	26	14	12	20	31	16	14	14	8	16	43	253
Fco Borja	38	33	23	14	21	19	12	12	13	3	13	19	220
General Castellón	12	16	35	17	10	9	12	23	10	13	24	34	215
Elche	36	27	31	33	9	12	24	9	4	8		8	201
Alcoy	14	22	25	16	20	12	14	10	7	16	17	15	188
Alcira	17	17	8	23	14	9	12	12	16	17	13	24	182
Denia	10	15	11	19	18	9	9	19	11	12	18	16	167
Sagunto	6	26	18	10	9	10	11	9	11	8	13	13	144
Xàtiva	9	18	9	6	19	15	9	7	14	6	12	19	143
Torreveja	20	7	21	12	7	7	12	13	7	10	9	10	135
La Plana	11	18	12	8	8	10	5	11	11	13	8	13	128
Manises			3	19	11	13	11	11	12	10	13	15	118
Orihuela	6	4	7	1	7	5	7	7	7	7	3	3	64
Villajoyosa	16	17	8	1									42
Ins Val Oncología			2	6	1	2	3	2	1	4	4	6	31
Requena	2	4	1	3	4	2	2		1	2	5	5	31
Elda	11	11	4										26
Dr. Peset					2				13	2		7	24
Prov. Castellón					1	4	5	5	2	2	2	3	24
CSP Benidorm	1	1	2	1	2			5		2	2	2	18
La Salud	4	3	3	4								1	15
9 Octubre	2	2	2	2	1	2					1		12
Dr Moliner				1									1
Vinaroz												1	1
TOTAL	395	431	385	312	289	252	272	259	250	277	300	407	3829

En el año 2008 se observó el pico máximo de incidencia de ENI con 349 aislamientos (siete años después de la comercialización de la PCV7), con una media de 319 aislamientos por año durante el período de estudio. A partir de 2008 se apreció un importante descenso del número de casos alcanzando el mínimo en 2015 con 220 aislamientos para, posteriormente, iniciar un rápido ascenso de los casos, llegando a 2018 con casi los mismos casos que 10 años antes (Figura 18).

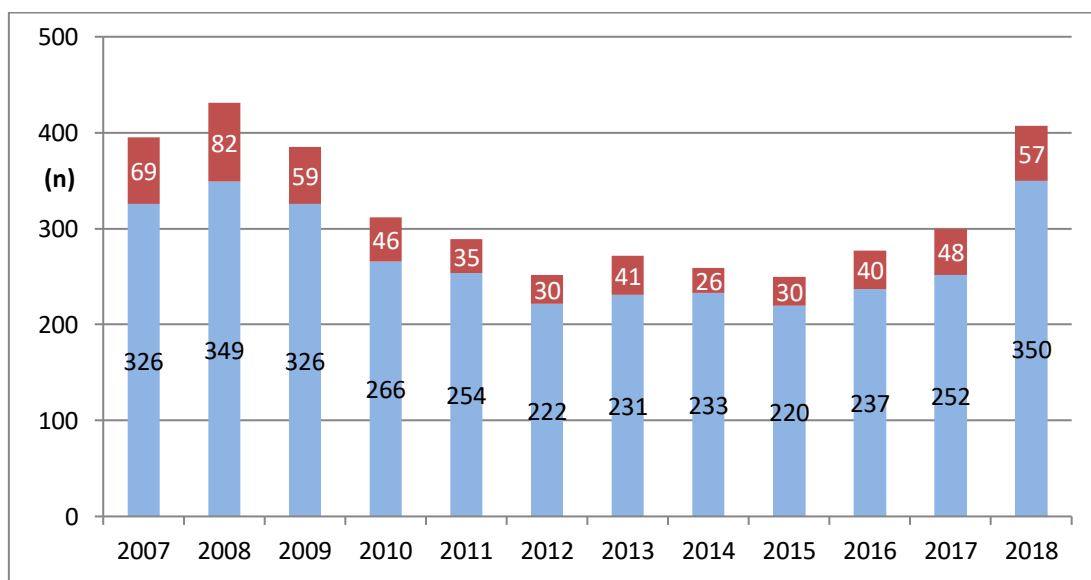


Figura 18. Casos anuales de ENI en la CV durante el periodo del estudio (en rojo casos de nuestro hospital).

En 2010 se inició la comercialización de las vacunas conjugadas para 10 y 13 serotipos, abriendo un período de ocho años en los que el número de casos fue inferior a la media.

En la distribución por sexo se observa una mayor incidencia en varones con una relación de 1.5: 1 que se mantuvo prácticamente constante durante todos los años del estudio (Figura 19). Sin embargo el análisis estadístico no mostró diferencia significativa entre hombres y mujeres (OR 0,89 [0,78-1,01] p 0,074).

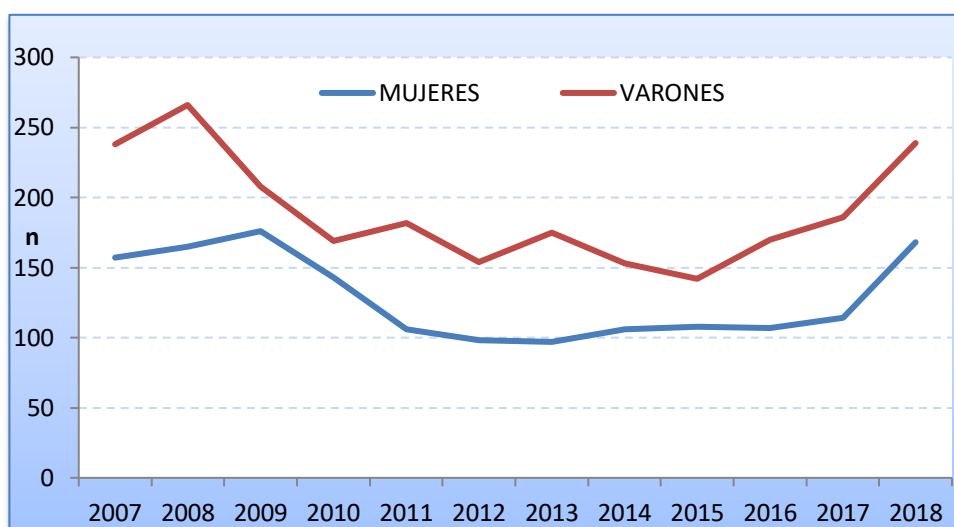


Figura 19. Distribución por sexo de los episodios de ENI en el periodo de estudio.

Por edad, el grupo de 0-17 años es el que presentó una menor incidencia, siendo además, el grupo con menos oscilaciones a lo largo del estudio. Por el contrario, en los grupos de 18-64 y mayores de 65 años se observó una mayor incidencia pero con una evolución desigual; si bien durante los primeros años se apreció una alternancia de ambos grupos, a partir de 2012 el grupo de edad avanzada fue el de mayor predisposición a la ENI (Figura 20).

Tomando como referencia el año de la introducción de la vacuna trecevalente (2010) el análisis de los datos pre y post vacunales mostró una menor probabilidad de ENI en menores de 17 años desde 2010 (OR 0,69 [0,58-0,84] $p < 0,001$). De igual modo, para el grupo de 18-65 años el análisis estadístico también indicó una menor probabilidad pero menos evidente que en la población pediátrica (OR 0,83 [0,72-0,94] $p = 0,004$).

Desde la comercialización de la PCV13, la ENI aumentó sensiblemente en los mayores de 65 años (OR 1,67 [1,46-1,9] $p < 0,001$); por tanto, en este grupo no se observó el fenómeno de inmunidad de rebaño y debería ser un grupo de especial interés para la vacunación antineumocócica.

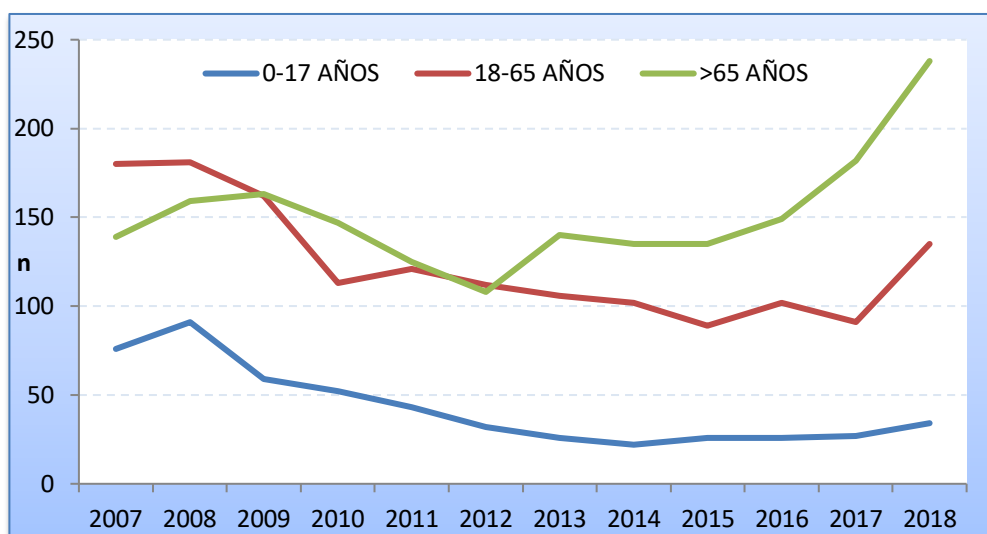


Figura 20. Distribución por grupos de edad de los episodios de ENI en el periodo de estudio.

Porcentualmente, el grupo de 0-17 años presentó un descenso leve pero continuo durante todo el estudio, pasando de un 19,24% de los casos en 2007 a un 8,35% en 2018 con una disminución de más de la mitad de los casos en 12 años; en cambio, el grupo de >65 años pasó de un 35,18% en 2007 (siendo el segundo grupo más frecuente ese año) a 58,47% en 2018, constituyendo ya el grupo con mayor predisposición (Figura 21). Desde 2013 más de la mitad de los casos de ENI se observaron en mayores de 65 años.

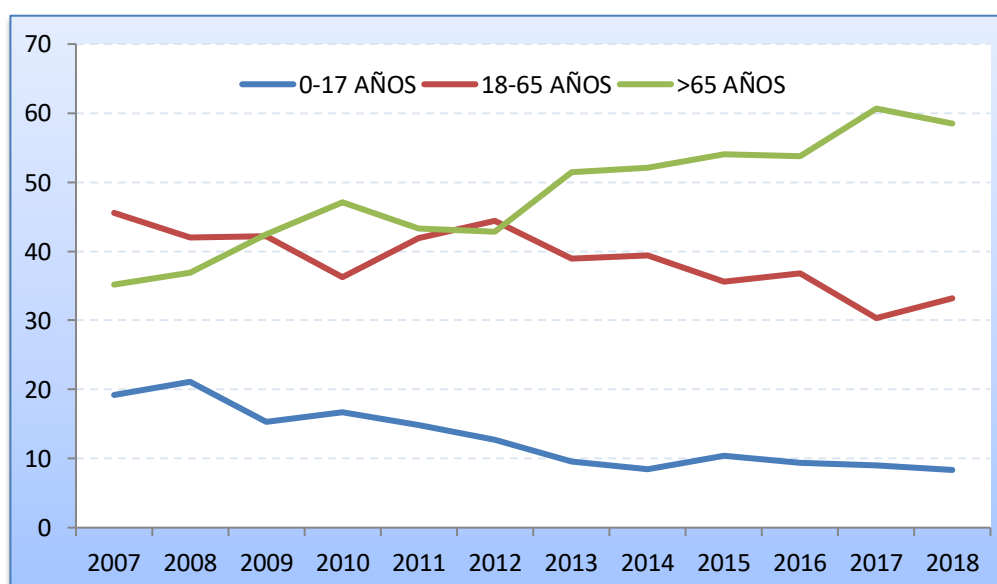


Figura 21. Distribución (%) por grupos de edad de los episodios de ENI.

2. EVOLUCIÓN DE LOS SEROTIPOS.

2.1. Etapa pre - PCV13 (2007-2010).

Durante los doce años del estudio se observaron importantes variaciones en el número de casos de ENI producidos por cada serotipo. Sin embargo, no hay que olvidar que la primera vacuna conjugada inició su comercialización en España en junio de 2001 y, a partir de esta primera vacuna conjugada, comienzan a observarse variaciones en los serotipos. En los años previos al inicio de la vacunación se publicaron varios estudios sobre la incidencia de los serotipos en diversos países: Finlandia (1985-89)¹⁶⁷, Dinamarca (1981-97)¹⁶⁸, Reino Unido (1995-96)¹⁶⁹, Alemania (1997-98)¹⁷⁰ y EE.UU. (1978-1994)¹⁷¹, con resultados muy similares, tanto en América como en Europa; el serogrupo 14 fue el más frecuente en estos estudios, seguido del 6, 19, 18, 23, 9 y 4. Precisamente estos siete serotipos constituyeron la primera vacuna conjugada (14, 6B, 19F, 18C, 23F, 9V y 4) al tenerse en cuenta la incidencia en los estudios realizados previamente.

En España, un estudio similar fue realizado por Fenoll *et al.* entre 1979-1989; los siete serotipos más frecuentes fueron 3, 6, 23, 19, 9, 1 y 5¹⁴⁶, destacando la alta incidencia del serotipo 3 y la baja incidencia de los serotipos 14, 18 y 4, en contraste con los estudios anteriormente citados.

Nuestro estudio comienza en 2007, 6 años después de iniciarse la vacunación PCV7; por tanto, partimos de una situación en que la frecuencia de los serotipos circulantes no fue la misma que antes de 2000. Los serotipos más frecuentes que encontramos en 2007 fueron 7, 19A, 1 y 14 con cifras muy similares, seguido de los serotipos 3 y 8. Tras 6 años de la comercialización de la vacuna, de los siete serotipos vacunales, solo el 14 seguía presentando una incidencia relevante en nuestro medio, seguido del 4. En cambio, los otros cinco serotipos vacunales ya tenían una incidencia muy baja al inicio de nuestro estudio (Tabla 6). En los siguientes años, los serotipos 14 y 4 también disminuyeron su incidencia hasta quedar en unos pocos casos (Figura 22), de manera que el serotipo 14 pasó de ocasionar el 9,1% de todas las ENI en 2007 al 2,2% en 2018. Es más, de los 407 casos en 2018, solo 29 (7,1%) fueron ocasionados por serotipos de la PCV7; es decir, menos casos que los provocados únicamente por el serotipo 14 en 2007, lo que indica una alta efectividad de la PCV7 en cuanto a disminución de dichos serotipos (Figura 23 y 24).

Sin embargo, a pesar de esta importante disminución destaca el año 2012 (el segundo año con la tasa de incidencia de ENI más baja) con un pico importante de serotipos de la PCV7 a expensas de 18C, 19F y especialmente 14.

Tabla 6. Comparación serotipos más frecuentes con serotipos vacunales* en el año 2007.

SEROTIPOS MÁS FRECUENTES	CASOS ENI n (%)	SEROTIPOS VACUNALES	CASOS ENI
7	38 (9,6)	14	36
19A	37 (9,3)	4	14
1	37 (9,3)	18C	9
14*	36 (9,1)	19F	8
3	28 (7,0)	23F	7
8	26 (6,5)	6B	7
4*	14 (3,5)	9V	3

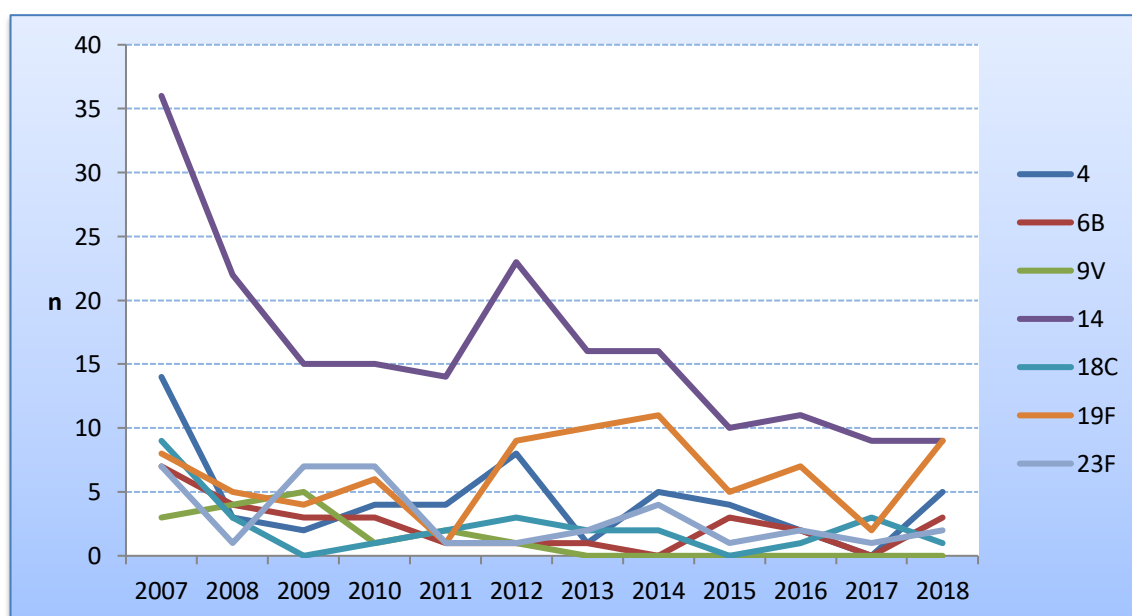


Figura 22. Evolución temporal de los serotipos incluidos en la vacuna PCV7.

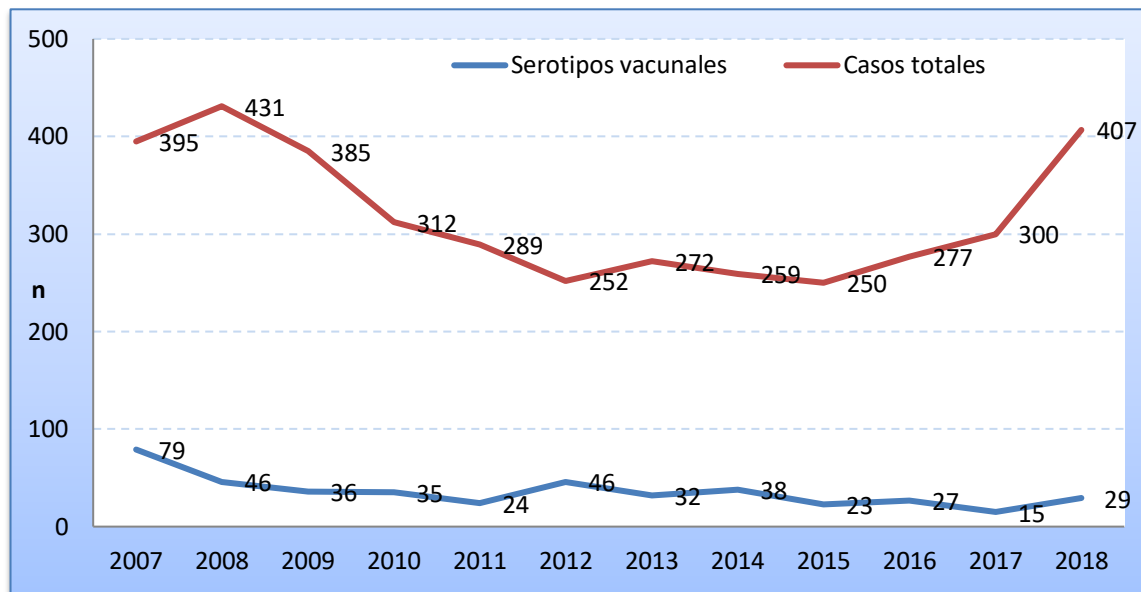


Figura 23. Comparación anual de los casos producidos por serotipos de la PCV7 con los casos totales.

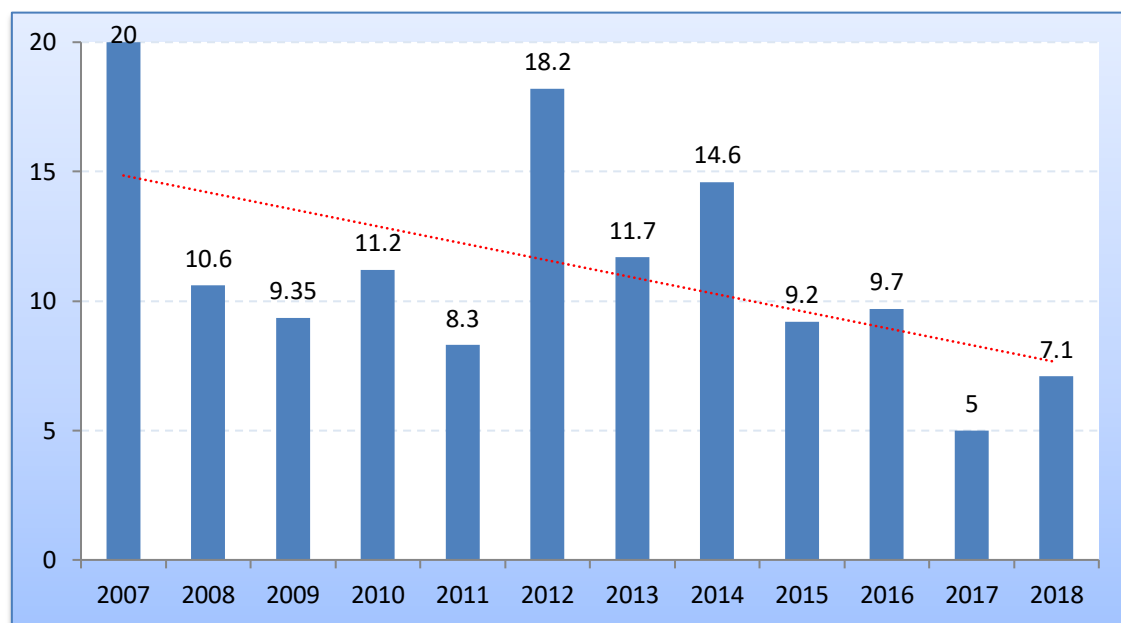


Figura 24. Evolución anual (en %) de los casos producidos por serotipos de la PCV7.

Resultados similares se observaron en varios países. En el estudio de Richter *et al.* en EE.UU. se compararon los serotipos aislados antes y después de la introducción de las vacunas entre

1999-2011: los serotipos de la PCV7 pasaron de un 55% de todos los aislados en 1999-2000 a un 4% en 2010-2011 ¹⁷². En un estudio multicéntrico en población pediátrica realizado en España, Francia, Bélgica y Reino Unido las ENI por serotipos vacunales disminuyeron un 58%, 52% y 22%, respectivamente en los tres primeros países, en cambio, en el Reino Unido donde las ventas de vacunas fueron insignificantes, la ENI por serotipos de la PCV7 aumentó en un 25% ¹⁷³.

A la vez que todos los estudios indicaban una caída muy importante de los serotipos vacunales, demostrando la eficacia de la PCV7, los mismos estudios alertaban de un aumento de casos por otros serotipos. Así, en el estudio multicéntrico europeo destacaba el aumento de casos por los serotipos 1, 7F y 19A¹⁷³, mientras que en el estudio americano el más frecuente fue el 19A. Justamente estos tres serotipos fueron los más observados en el primer año de nuestro estudio: 38 casos por el serotipo 7F, 36 casos por el 19A y 36 casos por el 1 (Tabla 6).

En los tres años previos a la comercialización de la PCV13, los serotipos 7F, 1 y especialmente 19A siguieron siendo los más frecuentes, al igual que en el resto de las áreas geográficas, lo que motivó su inclusión en la PCV13, comercializada en España a mediados de 2010 (Tablas 7).

Tabla 7. Evolución anual de episodios de ENI por los serotipos más frecuentes n (%).

SEROTIPO	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	TOTAL
1	37 (9,3)	48 (11,1)	40 (10,3)	28 (8,9)	18 (6,2)	5 (1,9)	12 (4,4)	6 (2,3)	1 (0,4)	1 (0,3)	0 (0,0)	5 (1,2)	201 (5,2)
3	28 (7,0)	33 (7,6)	34 (8,8)	22 (7,0)	42 (14,5)	26 (10,3)	40 (14,7)	34 (13,1)	46 (18,4)	36 (12,9)	48 (16,0)	71 (17,4)	460 (12,0)
6C							10 (3,6)	7 (2,7)	13 (5,2)	6 (2,1)	6 (2,0)	16 (3,9)	58 (1,5)
7F	38 (9,6)	51 (11,8)	62 (16,1)	38 (12,1)	24 (8,3)	14 (5,5)	7 (2,5)	6 (2,3)	4 (1,6)	6 (2,1)	7 (2,3)	4 (0,9)	261 (6,8)
8	26 (6,5)	9 (2,0)	8 (2,0)	9 (2,8)	3 (1,0)	18 (7,1)	16 (5,8)	19 (7,3)	18 (7,2)	32 (11,5)	46 (15,3)	76 (18,6)	280 (7,3)
9N	4 (1,0)	14 (3,2)	6 (1,5)	5 (1,6)	9 (3,1)	7 (2,7)	7 (2,5)	7 (2,7)	12 (4,8)	23 (8,3)	15 (5,0)	21 (5,1)	130 (3,3)
11A	11 (2,7)	9 (2,0)	5 (1,2)	8 (2,5)	3 (1,0)	9 (3,5)	13 (4,7)	13 (5,0)	7 (2,8)	13 (4,6)	7 (2,3)	13 (3,1)	110 (2,8)
14	36 (9,1)	22 (5,1)	15 (3,8)	15 (4,8)	14 (4,8)	23 (9,1)	16 (5,8)	16 (6,1)	10 (4,0)	11 (3,9)	9 (3,0)	9 (2,2)	210 (5,4)
15A	4 (1,0)	3 (0,6)	4 (1,0)	3 (0,9)	3 (1,0)	4 (1,5)	12 (4,4)	7 (2,7)	9 (3,6)	3 (1,0)	13 (4,3)	16 (3,9)	81 (2,1)
19A	37 (9,3)	53 (12,2)	48 (12,4)	50 (16,0)	39 (13,4)	22 (8,7)	31 (11,3)	20 (7,7)	10 (4,0)	19 (6,8)	11 (3,6)	15 (3,6)	355 (9,2)
22F	12 (3,0)	12 (2,7)	15 (3,8)	16 (5,1)	11 (3,8)	16 (6,3)	15 (5,5)	24 (9,2)	21 (8,4)	18 (6,4)	17 (5,6)	15 (3,6)	192 (5,0)
24B/F	3 (0,7)	1 (0,2)	4 (1,0)	6 (1,9)	10 (3,4)	12 (4,7)	6 (2,2)	7 (2,7)	9 (3,6)	9 (3,2)	17 (5,6)	11 (2,7)	95 (2,4)
OTROS	159 (40,2)	176 (40,8)	144 (37,4)	113 (36,2)	113 (39,1)	96 (38,0)	87 (31,9)	93 (35,9)	90 (36,0)	100 (36,1)	104 (34,6)	135 (33,1)	1.396 (36,4)
TOTAL	395	431	385	312	289	252	272	259	250	277	300	407	3.829

2.2. Etapa post-PCV13 (2011-2018).

La vacuna de trece serotipos, de la misma casa comercial que la PCV7, incluyó además de los siete serotipos iniciales y los tres serotipos que en los últimos años habían aumentado su incidencia de forma alarmante (1, 7F y 19A), otros tres serotipos (3, 5 y 6A). Excepto el serotipo 5, del cual no se aisló ninguna cepa en nuestro estudio, los otros cinco serotipos aumentaron su incidencia en los años siguientes a la comercialización de la PCV7, llegando a representar casi el 50% de todas las ENI en 2009, un año antes de comercializar la vacuna PCV13 (Figura 25).

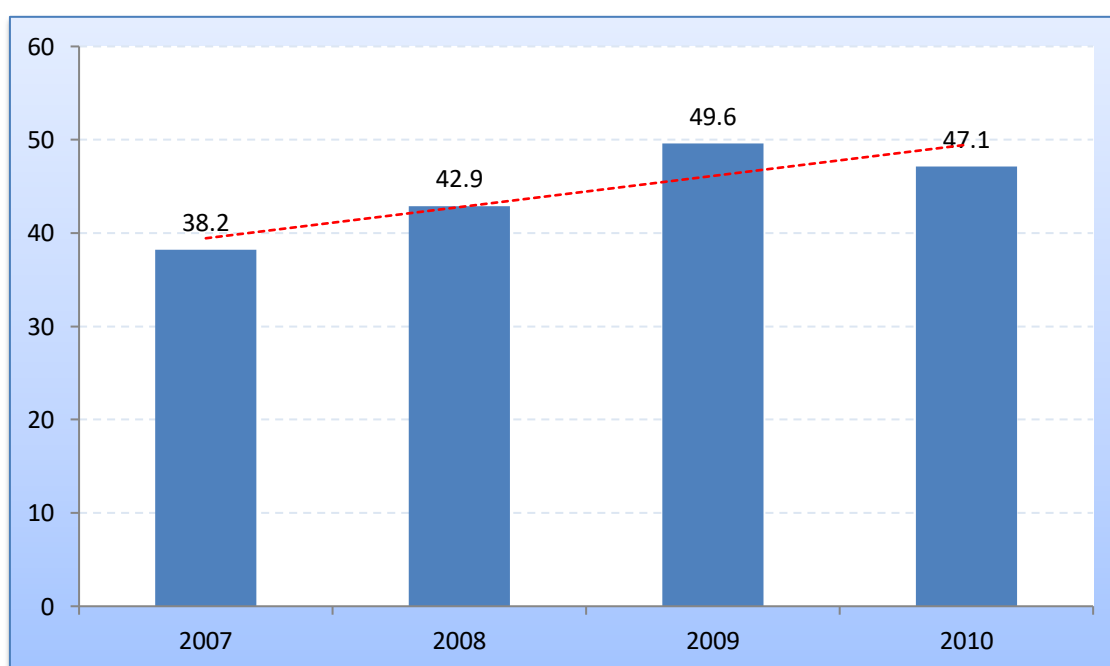


Figura 25. Evolución temporal (en %) de los casos producidos por los nuevos serotipos incluidos en la PCV13 antes de su comercialización (1, 3, 5, 6A, 7F y 19A).

De los 6 nuevos serotipos incluidos hay que destacar la inclusión del serotipo 5, ya que durante los 12 años de nuestro estudio no se detectó ningún episodio de ENI y las series publicadas en Europa y EE.UU. aportan muy pocos casos. En un estudio en Europa Occidental, entre 1992-2005, el serotipo 5 fue responsable de sólo el 0,61% de los 11.556 aislados serotipados¹⁷⁴, y en EE.UU. el serotipo 5 representó menos del 2% de los aislamientos causales de ENI en 1998¹⁷⁵. Sin embargo, ha sido el responsable de importantes brotes en Norteamérica, especialmente en núcleos de población empobrecida en Canadá¹⁷⁶ y también en Israel¹⁷⁷. Además, un metaanálisis de aislados pediátricos encontró que el serotipo 5 era 60 veces más invasivo que otros, al igual que los serotipos 1 y 7 que resultaron ser mucho más invasivos que los serotipos

3, 6A y 15 en este estudio¹⁷⁸. Estos datos contribuyeron a su inclusión en la PCV13 a pesar de su muy baja incidencia.

En los años siguientes a la vacuna de trece serotipos cabe destacar dos hechos importantes, por una parte, la eficacia de la PCV13 en la reducción de los casos de ENI por dichos serotipos, salvo alguna excepción (serotipo 3), y por otra parte el aumento importante de serotipos no vacunales, en el llamado fenómeno de reemplazo, fenómeno que ya se había producido tras la PCV7 (Figura 26).

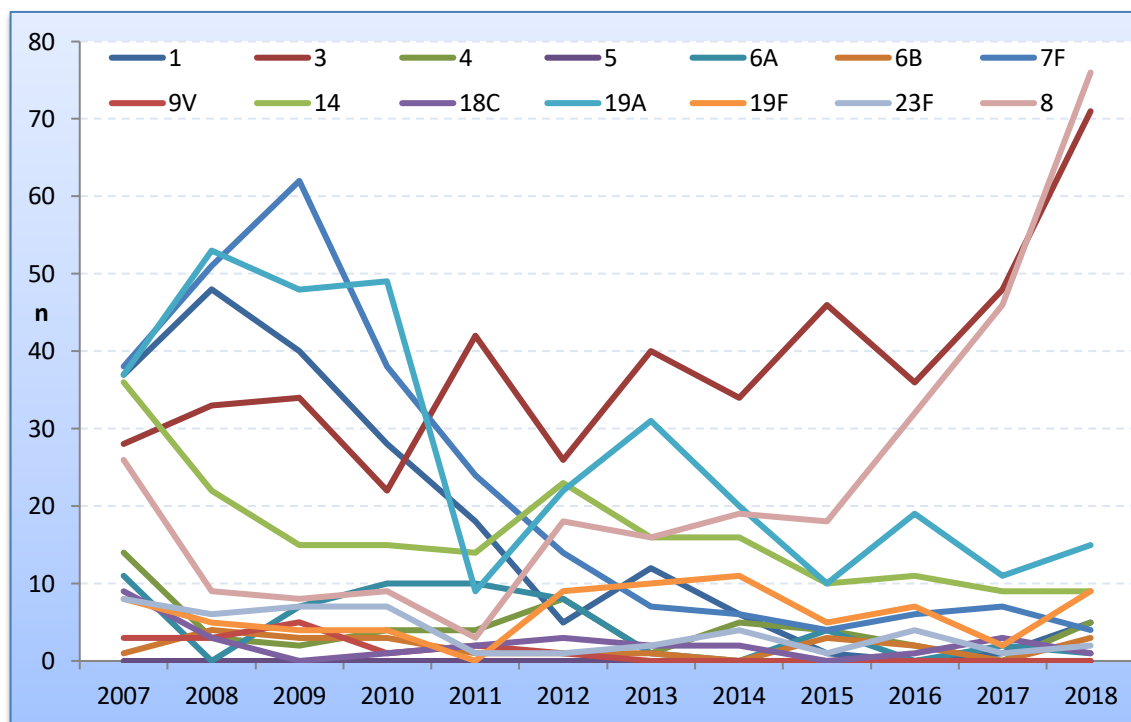


Figura 26. Evolución anual de los serotipos incluidos en la vacuna PCV13 y del serotipo 8 en número de casos.

Desde la introducción de la PCV 7 los serotipos vacunales iniciaron una disminución, más o menos rápida dependiendo del serotipo, pero finalmente eficaz en todos los serotipos, este fenómeno se repitió posteriormente con la PCV13, con la excepción de un serotipo.

Los serotipos 1, 7F y 19A, que en los años previos a la PCV13 se habían situado como los más frecuentes descendieron rápidamente en los siguientes años, especialmente el 1 (OR 0,19[0,14-0,27] $p < 0,001$) (Figura 27) y el 7F (OR 0,29 [0,22-0,39] $p < 0,001$) (Figura 28) que de manera muy rápida ya no fueron los más frecuentes en 2012 y 2013, respectivamente (Tabla 7 y Figura 26).

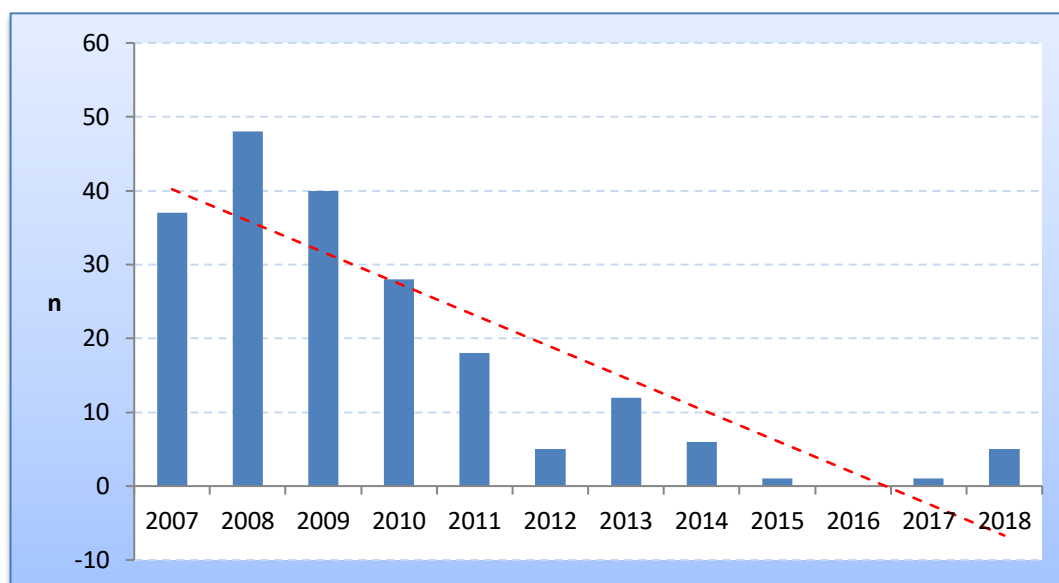


Figura 27. Evolución anual de los episodios de ENI causados por el serotipo 1.

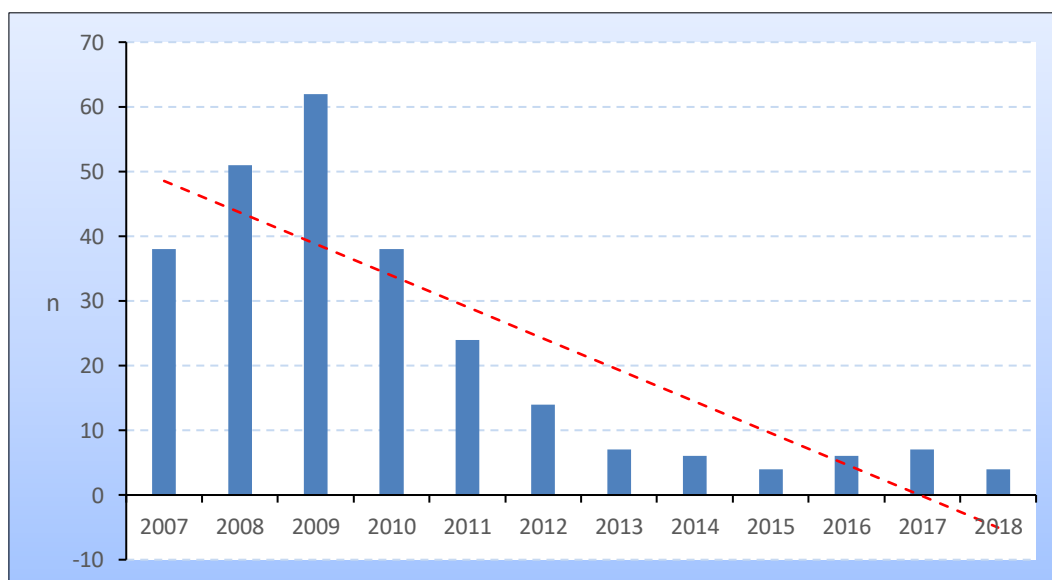


Figura 28. Evolución anual de los episodios de ENI causados por el serotipo 7F.

Más lento fue el descenso del serotipo 19A (Figura 29), uno de los más frecuentes hasta 2016 pero cuyo riesgo relativo disminuyó con la PCV13 desde el 12,3% antes de 2010 al 5,9% posteriormente (OR 0,45 [0,36-0,57] $p < 0,001$).

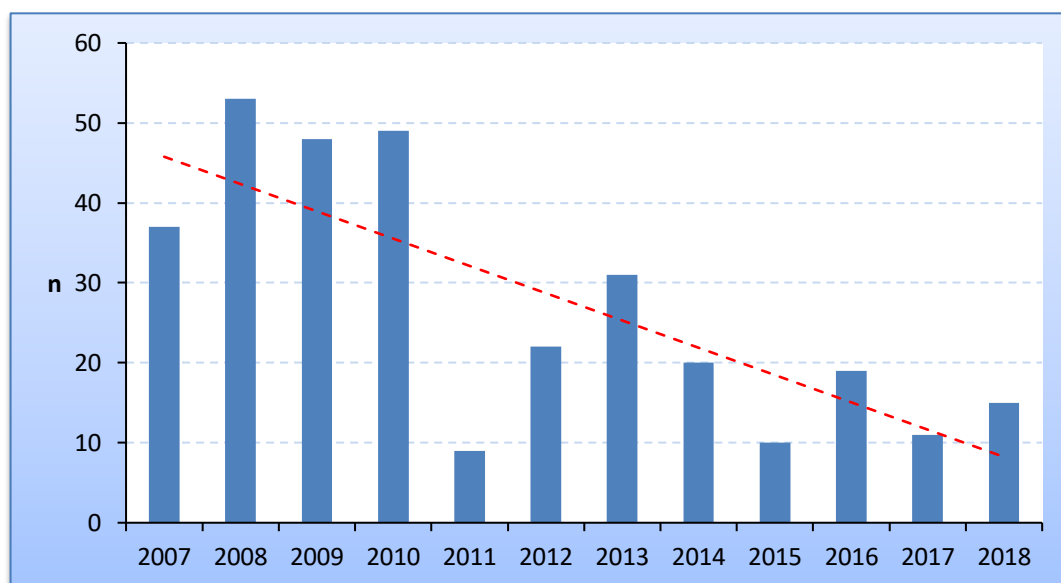


Figura 29. Evolución anual de los episodios de ENI causados por el serotipo 19A.

También llama la atención la evolución del serotipo 14, entre los más frecuentes durante 2011 y 2012, a pesar de estar incluido en la PCV7. Al igual que el serotipo 19A, las ENI por el serotipo 14 disminuyeron más lentamente que las causadas por los otros serotipos, tanto de la PCV7 como de la PCV13 (OR 0,73 [0,55-0,97] p 0,032) (Figura 30).

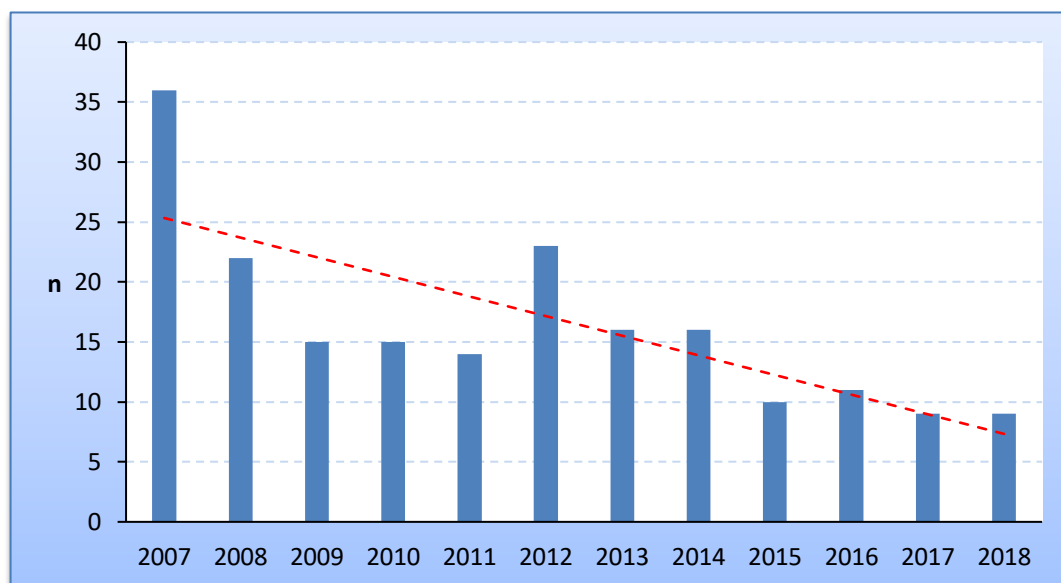


Figura 30. Evolución anual de los episodios de ENI causados por el serotipo 14.

Entre todos los serotipos vacunales de la PCV13 destaca la evolución del serotipo 3, presente en dicha vacuna, pero cuyos aislamientos aumentaron en los años siguientes (Figura 31), constituyendo el serotipo más frecuente causante de ENI en 2011 (Tabla 7 y Figura 24). Esta situación se repitió en los siguientes años sin que la vacunación tuviera algún efecto sobre este serotipo, por lo que representa el fracaso más importante de esta vacuna (OR 2,1[1.68-2,62] $p<0,005$), pasando de un riesgo relativo del 7,7% antes del 2010 a un 14,9% en los años siguientes. Esta situación no fue exclusiva de nuestro entorno, recientemente se han publicado estudios que destacan el aumento del serotipo 3 a pesar de la vacunación. En Canadá, en un estudio desde 2007 a 2017, destaca el aumento del serotipo 3 por probable fallo de la PCV13 en comparación con otros serotipos de la misma, fenómeno que requerirá un estudio pormenorizado para determinar exactamente la causa¹⁷⁹. También en Corea del Sur, en un estudio de características similares, destacaron un aumento del serotipo 3 con la recomendación de abordar en las futuras PCV la eficacia limitada contra la ENI del serotipo 3¹⁸⁰. Hasta el momento, la revisión más extensa sobre la dudosa eficacia de las vacunas conjugadas sobre el serotipo 3 la encontramos en un metaanálisis sobre estudios en distintos países de la incidencia del serotipo 3 con aumentos destacables en Alemania, pero con escasos cambios en Dinamarca o Noruega¹⁸¹.

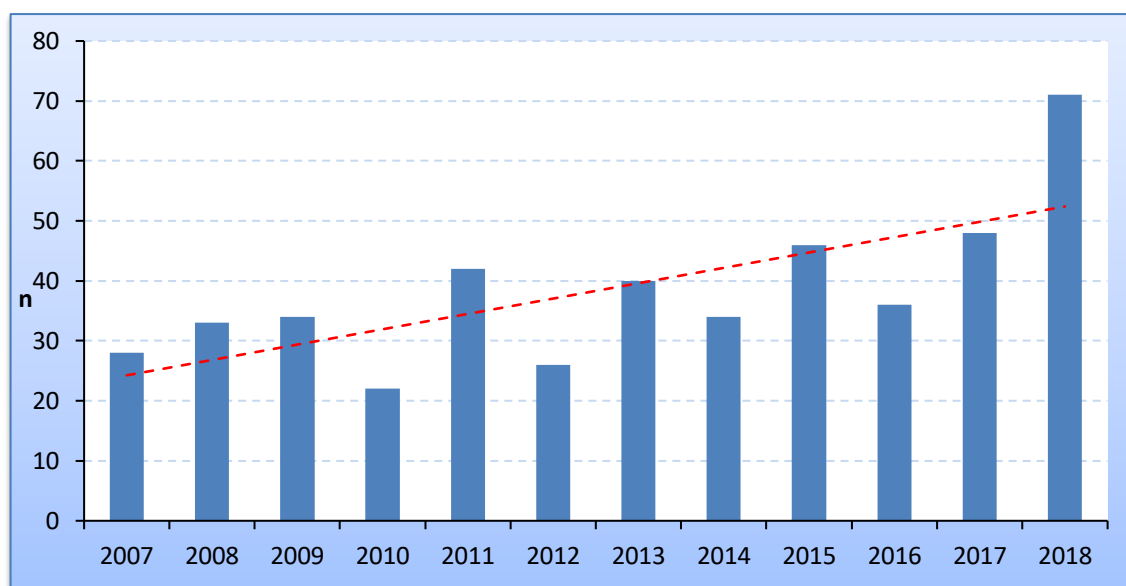


Figura 31. Evolución temporal de los episodios de ENI causados por el serotipo 3.

El fenómeno de reemplazo, que ya se había observado tras la comercialización de la PCV7 con destacados aumentos de los serotipos 1, 7F y 19A, también se observó en los años siguientes a la comercialización de la PCV13. En este caso, se detectó un rápido ascenso de serotipos que previamente tenían cifras muy bajas o residuales.

En el año siguiente a la introducción de la PCV13 apareció el serotipo 22F como el sexto más frecuente (11 casos), situación que se repetió en los siguientes años llegando a ser el segundo más frecuente en 2014 (Tabla 7). Otros serotipos que en los siguientes años aumentaron sus cifras de aislamientos fueron el 11A, 9N, 24B/F o 15A. Pero sin duda, el serotipo que mejor describe el fenómeno de reemplazo es el serotipo 8 (Figura 32). Este serotipo que en 2012 se situó como el cuarto más frecuente con 18 casos, pasó a ser el más frecuente en 2018 con 76 casos, aumentando en siete años un 344,4%. El aumento del serotipo 8 está fuertemente relacionado con la introducción de la PCV13 (OR 3,1[2,28-4,23] $p<0,001$), pasando de un riesgo relativo del 3,4 al 9,9% tras la introducción de la vacuna.

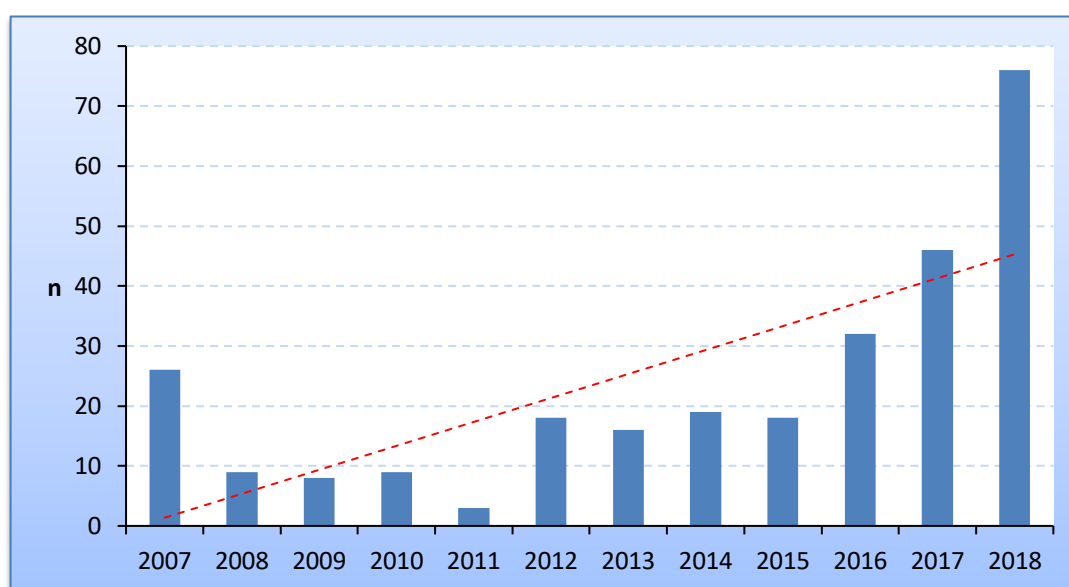


Figura 32. Evolución anual de los episodios causados por el serotipo 8.

El año 2015 fue el primero en el que los serotipos de la PCV 7 dejaron de estar entre los más frecuentes tras el descenso del serotipo 14, el más lento en descender (Tabla 7), situación que no varió en los siguientes años en los que sus incidencias fueron muy bajas. De forma paralela, los serotipos de la PCV13 también fueron cada vez más infrecuentes a partir de 2017 con excepción del serotipo 3 que desde 2011 a 2017 fue el más prevalente, siendo reemplazado en 2018 por el serotipo 8 (Tabla 7).

También es importante destacar el descenso total de episodios de ENI desde los primeros años del estudio hasta 2015 (mínimo de la serie con 250 episodios); sin embargo, a partir de ese año se observa un rápido ascenso, a expensas de los serotipos 3 y 8, hasta elevar a 407 los aislamientos en 2018 en el cual más de un tercio de los episodios (36,1%) fueron causados exclusivamente por estos dos serotipos.

En otras zonas de España se han reportado resultados similares, con importantes reducciones de los serotipos vacunales y destacando el aumento de los serotipos 3 y 8¹⁸².

En un estudio en Inglaterra y Gales se observó una disminución de la incidencia de ENI, con la incidencia más baja en 2013-2014, para posteriormente ascender rápida e inesperadamente debido a serotipos distintos a los de la PCV13¹⁸³. Este aumento se observó en todos los grupos de edad, pero especialmente en adultos, siendo el 8, 12F y 9N los serotipos responsables del 40% de los casos de ENI confirmados por laboratorios en Inglaterra, aunque también constataron un aumento del serotipo 3, incluido en la PCV 13¹⁸⁴, similar al resto de Europa.

Sin embargo en EE.UU., por razones que aún no está claras, no se ha reproducido esta evolución. Muy al contrario, tras la introducción de PCV13 no se observaron aumentos de ENI por serotipos no vacunales en menores de 5 años o adultos mayores de 64 años¹⁸⁵. Además, los serotipos 8, 9N y 15A, aunque aumentaron en algunos estudios¹⁸⁶ no lo hicieron de forma generalizada, a diferencia de lo que ocurre en el resto de Europa. En particular, el serotipo 8, que ahora causa el 20% de la enfermedad neumocócica invasiva en Inglaterra y Gales, se ha aislado en menos del 1% de los casos en EE. UU. y el 12F es igualmente infrecuente¹⁸⁵.

De las posibles vacunas a comercializar en los próximos años, la más adelantada para introducirse en el mercado es la PCV20. Esta nueva vacuna ya ha sido aprobada por la FDA en junio de 2021 para mayores de 18 años e incorpora siete serotipos más a los que contiene la PCV13 (8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F y 33F) en un intento de frenar el fenómeno de reemplazo. Serotipos que en los años previos a la PCV13 producían un reducido número de casos pero que rápidamente han aumentado sus cifras de aislamientos, especialmente el serotipo 8 (Figuras 33 y 34).

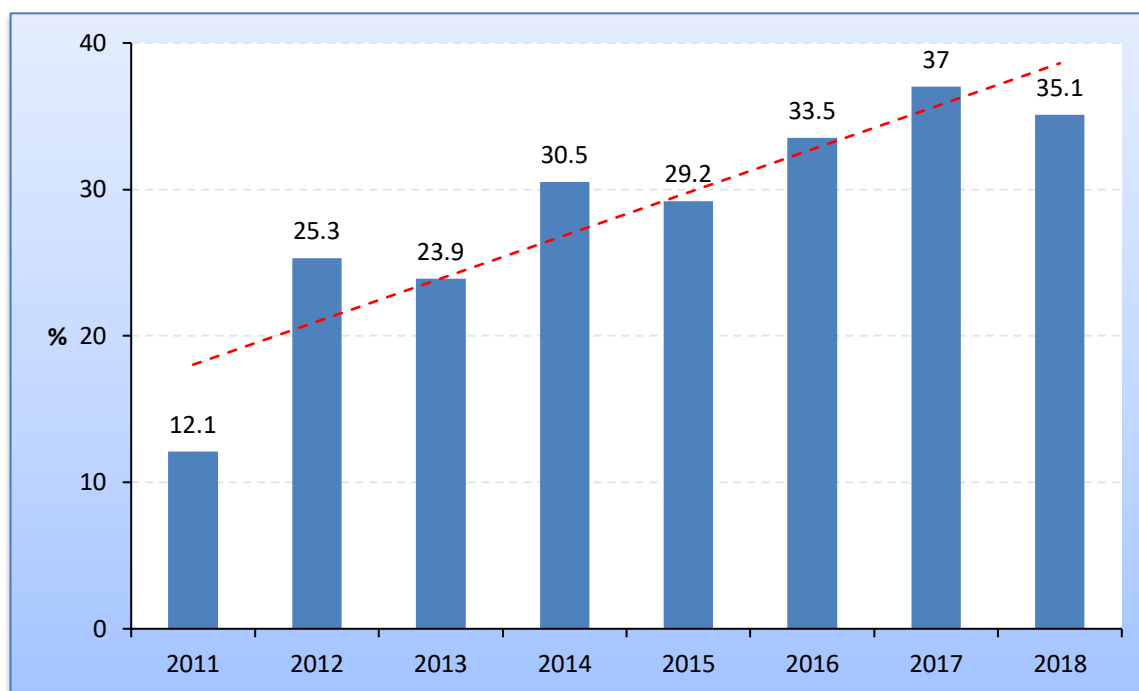


Figura 33. Evolución anual de los nuevos serotipos (8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F y 33F) de la futura vacuna PCV20 aislados desde 2011 en nuestro estudio.

Comparando la situación actual con la previa a la comercialización de la PCV13, los nuevos serotipos incluidos en la PCV20 representaron el 12,1% de todos los casos en 2011 y fueron aumentando en los años siguientes, pero hasta ahora no han superado el 40% de los casos, alcanzando su tasa más alta (37%) en 2017, mientras que en los años previos a la PCV13 los serotipos vacunales incluidos en esta vacuna llegaron a ser casi la mitad de todos los casos.

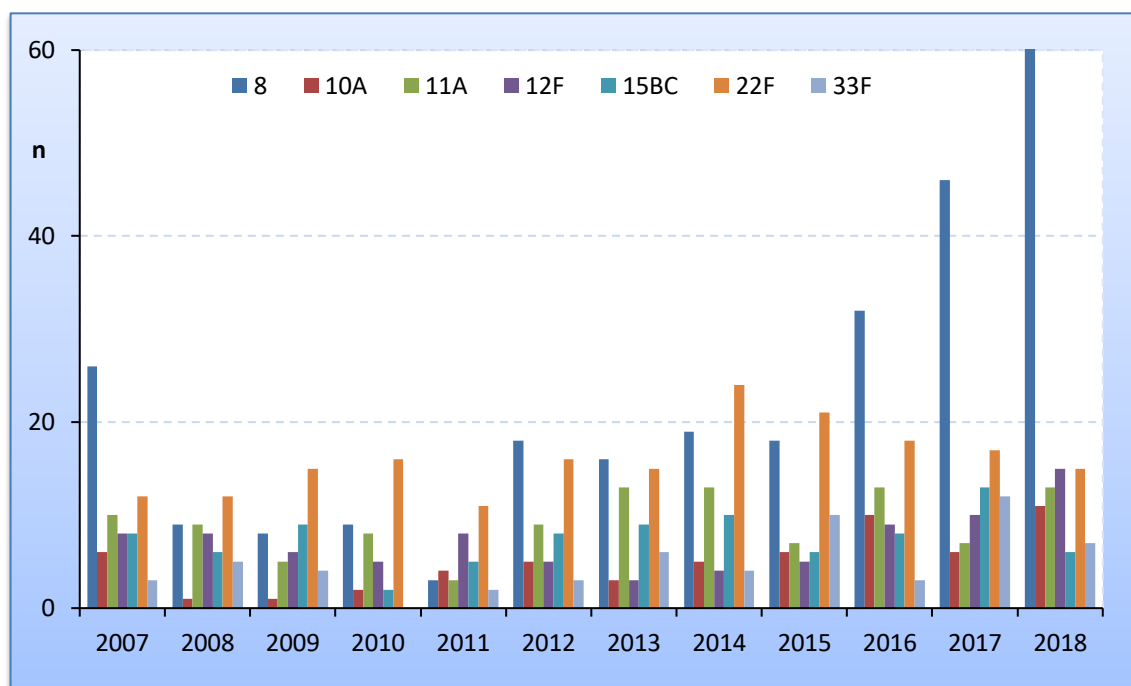


Figura 34. Evolución anual de los nuevos serotipos a incluir en la próxima vacuna PCV20.

En los años previos a la PCV13 el aumento se produjo a expensas de los serotipos 1, 7F y 19A y en menor medida del serotipo 3. En cambio, la situación actual parte de un serotipo 3 con un elevadísimo número de casos, a pesar de estar incluido en la vacuna, y un aumento espectacular del serotipo 8 que capitaliza casi en exclusiva el fenómeno de reemplazo. Los otros nuevos serotipos de la PCV20 también han aumentar sus aislamientos pero de forma mucho más modesta.

Además, en nuestro ámbito se aprecian aumentos destacables de serotipos que no se incluirán en la nueva vacuna (9N, 15A, 6C o 24B/F) y que en los últimos años superaron el 15% del total de casos (Figura 35), en a penas 7 años estos serotipos han duplicado sus aislados, pasando del 8 al 16% de todos los aislamientos causales de ENI (Figura 36).

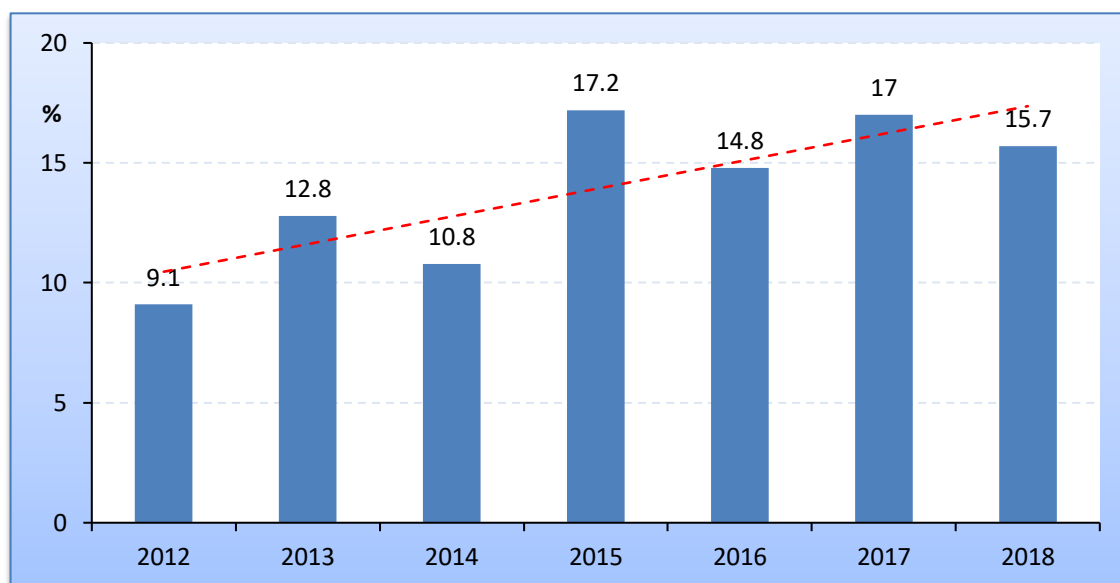


Figura 35. Evolución anual de los serotipos 9N, 15A, 6C y 24BF, no incluidos en la futura vacuna PCV20.

Estudios recientes en Canadá¹⁸⁷, Corea¹⁸⁸ y EE.UU.¹⁸⁹, al igual que en nuestro estudio, alertan del aumento de serotipos no incluidos en la futura PCV20 como el 15A, 23A y 35B.

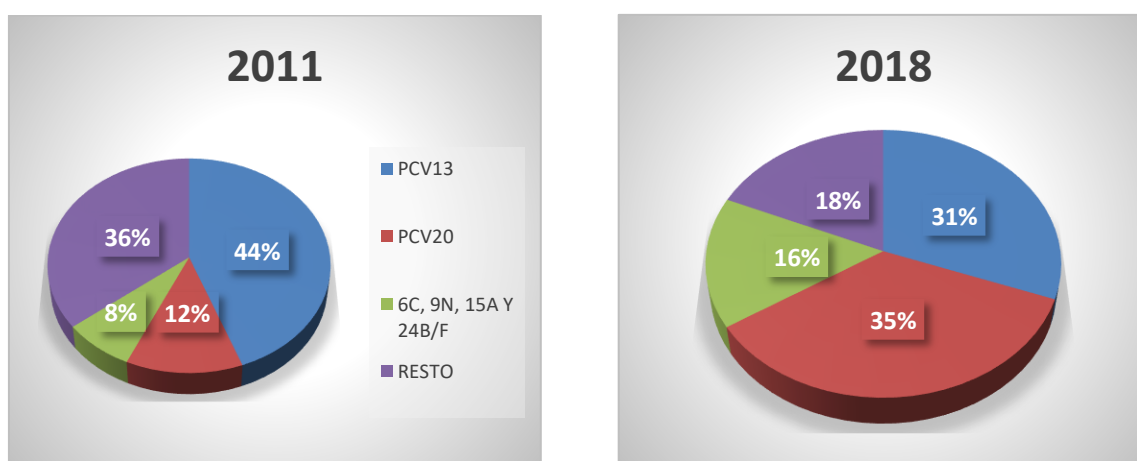


Figura 36. Evolución de los aislamientos de los serotipos 6C, 9N, 15A y 24B/F de 2011 a 2018.

2.4. Serotipos aislados en LCR.

Durante el periodo de nuestro estudio (2007-2018) se incluyeron 387 cepas de *S. pneumoniae* aisladas de líquidos orgánicos distintos de la sangre, siendo el LCR, con 237 aislamientos, la muestra con más aislamientos después del hemocultivo y seguido por el líquido pleural con 98 aislados (Figura 37).

Los 237 aislados en LCR se agruparon en 41 serotipos distintos, siendo el serotipo 3 el más frecuente con 40 (16,8%) aislamientos. De los diez serotipos más frecuentes sólo dos serotipos ya estaban incluidos en la PCV7; el serotipo 14 (14 episodios) y el 19F (11 episodios), ambos con escasos aislados los últimos años (el año 2012 fue el último con aislamientos del serotipo 14 en LCR). El riesgo de meningitis antes y después de la comercialización de la PCV13 fue similar (OR 1,14 [0,86 - 1,49] p 0,157).

Al igual que ocurrió en el global de episodios de ENI con los serotipos incluidos en la PCV13, también las meningitis por estos serotipos fueron disminuyendo con la excepción del serotipo 3 que presentó una media de 3,3 episodios de meningitis por año, además 2018 y 2011 fueron los años con más episodios de meningitis por el serotipo 3 (Tabla 8).

En nuestro estudio también destacan las cifras de serotipos no incluidos en ninguna vacuna conjugada como el 8, 22F, 23B, 15A y 35B, siendo especialmente significativos el 8, con un gran aumento de episodios en 2018, y 23B que, aunque presenta cifras más bajas que otros serotipos en el global de ENI, es el serotipo con el porcentaje de aislamientos más altos en LCR, 12 (17,3%) por 69 episodios globales (Tabla 9), cifras que podrían indicar un especial tropismo de este serotipo por el SNC.

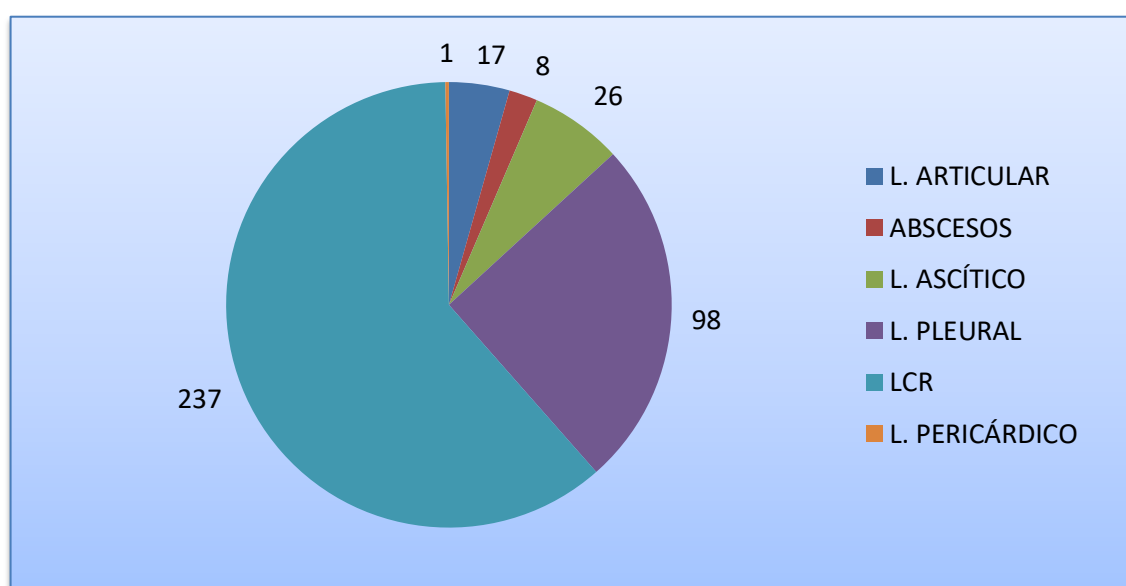


Figura 37. Aislamientos (n) en otros líquidos orgánicos.

Tabla 8. Evolución anual de los serotipos más frecuentes en LCR.

AÑO	3	19A	8	14	22F	23B	19F	15A	7	35B
2007	2	5	1	4	2	0	1	0	3	1
2008	2	4	0	2	1	0	0	1	2	0
2009	5	2	2	1	0	0	3	0	0	0
2010	0	3	0	2	1	1	0	1	0	0
2011	6	3	0	2	2	1	0	0	2	1
2012	2	1	1	3	3	0	1	0	0	1
2013	3	5	1	0	1	0	3	2	1	1
2014	3	1	0	0	1	0	1	1	0	2
2015	5	0	1	0	0	1	1	3	1	1
2016	2	1	3	0	1	3	1	0	0	1
2017	4	1	1	0	0	3	0	1	0	0
2018	6	0	5	0	1	3	0	1	0	0
TOTAL	40	26	15	14	13	12	11	10	9	8

Tabla 9. Comparación de episodios de meningitis con ENI global.

SEROTIPOS	Total ENI n (%)	Meningitis n (%)
3	460 (12,0)	40 (8,6)
19A	355 (9,2)	26 (7,3)
8	280 (7,3)	15 (5,3)
14	210 (5,4)	14 (6,6)
22F	192 (5,0)	13 (6,7)
23B	69 (1,8)	12 (17,3)
19F	77 (2,0)	11 (14,2)
15A	81 (2,1)	10 (12,3)
7F	261 (6,8)	9 (3,4)
35B	54 (0,9)	8 (14,8)
23A	68 (1,7)	7 (10,2)
6A	54 (1,4)	6 (11,1)
10A	60 (1,5)	6 (10,0)
11A	112 (2,9)	6 (5,3)
12F	87 (2,2)	6 (6,8)
9N	130 (3,3)	6 (4,6)

Actualmente no se dispone de mucha información sobre el tropismo meníngeo de *S. pneumoniae* y no está claro el papel del polisacárido capsular, aunque otros elementos ajenos

a la cápsula (neuraminidasa A) parecen favorecer la penetración a través de la barrera hematoencefálica¹⁹⁰. Sin embargo, se ha postulado que el tránsito a través del endotelio vascular mediante migración transcelular¹⁹¹ y la gravedad de los cuadros de meningitis tienen relación con el espesor de la cápsula¹⁹². En un estudio de la Comunidad de Madrid observaron que al igual que en nuestro estudio los serotipos 3 y 19A son frecuentemente aislados en LCR. Por otra parte, los serotipos 11A, 19F, 23B, 10A, 24F, 23A y 35F, hasta ahora poco frecuentes entre los casos de ENI en esa región, presentan un claro tropismo meníngeo¹⁹³.

En nuestro estudio destacan especialmente los serotipos 23B (OR 2,3 [1,25-4,48] p 0,007) y 35B (2,6 [1,25-5,77] p 0,01) como los serotipos con mayor tropismo meníngeo en contraste con el serotipo 7F (OR 0,52 [0,24-0,98] p 0,022).

3. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD.

Desde que en 1967 se describiera la primera cepa de neumococo resistente a penicilina, se han notificado casos esporádicos de resistencia hasta 1977, año en que se produjo un brote por neumococo multirresistente en Sudáfrica. A partir de esta fecha se observa un importante aumento de notificaciones de cepas resistentes en numerosas áreas geográficas de manera que a finales de los años 80 la resistencia de *S. pneumoniae* se convierte en un importante problema de salud mundial. A partir de esa fecha, cuidadosas mediciones epidemiológicas y de sensibilidad en varios países demostraron que el neumococo resistente a penicilina tenía la capacidad de incrementar su nivel medio de resistencia, de adquirir múltiples mecanismos de resistencia que afectan a otras familias de antibióticos y de extenderse ampliamente, consiguiendo aumentar su incidencia, tanto en pacientes como en portadores sanos¹⁹⁴.

En el estudio de las cepas resistentes, el serotipo causal pasó a ser prioritario, de manera que la expansión de las resistencias se ha relacionado con la expansión de determinados serotipos. Muy ilustrativo es el caso del serotipo 6B que apareció a finales de los 80 en Islandia, y pasó de una incidencia del 0% en 1988 a un 20% en 1993, elevando de esta manera las tasas de resistencia¹⁹⁵. Casos similares se observaron con los serotipos 23F y 19, muy relacionados con el incremento de las resistencias¹⁹⁴.

Nuestro estudio incluyó el periodo 2007-2018, ya con 6 años de uso de la PCV7. De los 3.829 aislamientos totales, se pudo estudiar la sensibilidad a al menos alguno de los antibióticos en 2.904 cepas (75,84%).

Los neumococos resistentes a la penicilina presentan resistencia cruzada con el resto de betalactámicos, aunque existen variaciones según cada antibiótico en particular. Las cefalosporinas parenterales que, en general, conservan mejor actividad frente a las cepas de

neumococo resistentes a la penicilina son cefotaxima, ceftriaxona, cefpiroma y cefepima. La eritromicina, al igual que levofloxacino, ha sido durante mucho tiempo una alternativa a la penicilina, al menos, en el tratamiento de las infecciones respiratorias¹⁹⁶. Por estos motivos decidimos estudiar la sensibilidad de *S. pneumoniae* a penicilina, ceftriaxona, levofloxacino y eritromicina.

Como puede apreciarse en la Figura 38, las tasas de sensibilidad más altas se observaron con levofloxacino (97,01%) y ceftriaxona (94,66%), y las más bajas con eritromicina (70,9%).

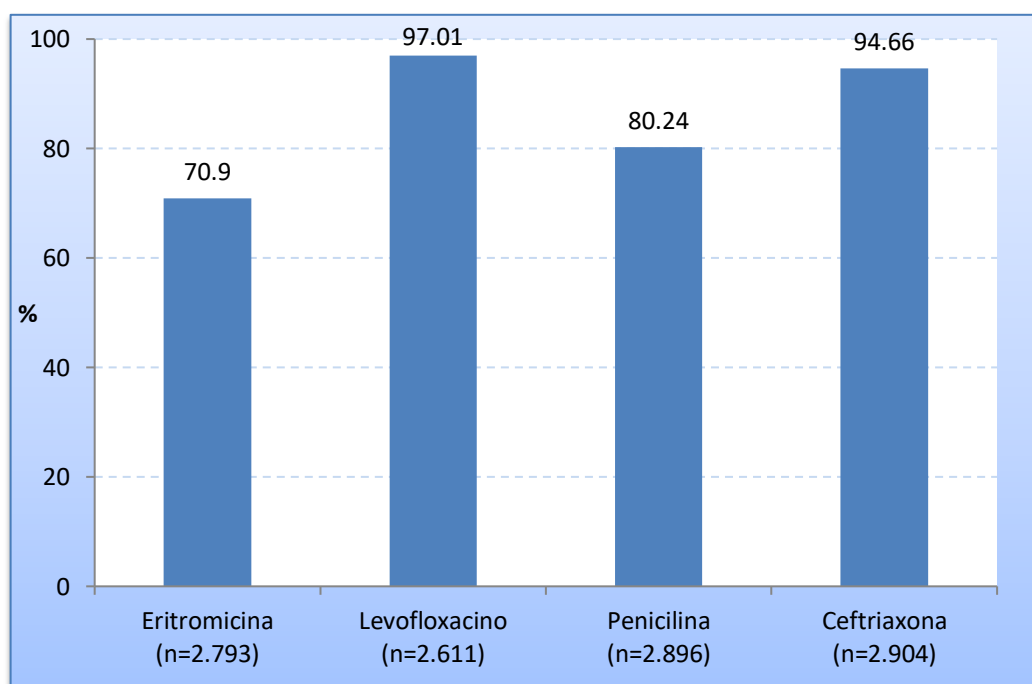


Figura 38. Tasa de sensibilidad de *S. pneumoniae* a los antibióticos ensayados.

3.1. Eritromicina.

El estudio de la sensibilidad a eritromicina se realizó en 2.793 cepas, (72,94%); de ellas, 26,4% fueron resistentes y 2,5% tuvieron una sensibilidad intermedia (Tabla 4.13). El 71,2% de las cepas fueron sensibles a eritromicina, si bien se observó un descenso paulatino de sensibilidad a lo largo del periodo de estudio (Tabla 10 y Figura 39).

Tabla 10. Sensibilidad a eritromicina de las cepas de *S. pneumoniae* recuperadas cada año.

AÑO	ANALIZADAS/ESTUDIADAS	S (%)	I (%)	R (%)
2007	395/274	200 (72,9)	1 (0,7)	73 (26,6)
2008	431/248	186 (75,0)	7 (2,8)	55 (22,1)
2009	385/227	177 (77,9)	2 (0,8)	48 (21,1)
2010	312/256	186 (72,6)	0	70 (27,3)
2011	289/237	173 (72,9)	1 (0,4)	63 (26,5)
2012	252/199	139 (69,8)	0	60 (30,1)
2013	272/213	146 (68,5)	4 (1,8)	63 (29,5)
2014	259/200	151 (75,5)	5 (2,5)	44 (22,0)
2015	250/198	133 (67,1)	10 (5,05)	55 (27,7)
2016	277/208	149 (71,6)	6 (2,8)	53 (25,4)
2017	300/230	140 (60,8)	10 (4,3)	80 (34,7)
2018	407/303	211 (69,6)	17 (5,6)	75 (24,7)
TOTAL	3.829/2.793	1991 (71,20)	63 (2,25)	739 (26,45)

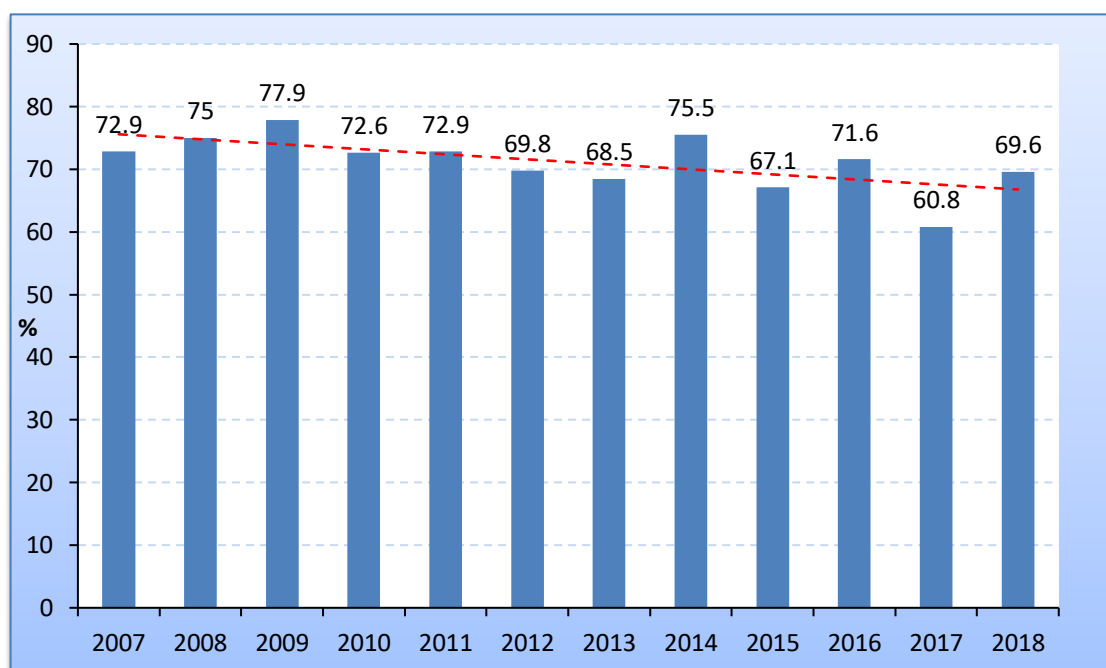


Figura 39. Evolución anual de la tasa de sensibilidad de *S. pneumoniae* a eritromicina.

El intervalo de la CMI fue similar en todos los años, siendo la CMI₉₀ del total de las cepas de 256 mg/L, mientras que la CMI₅₀ fue 0,125 mg/L (Tabla 11).

Tabla 11. Evolución anual de la CMI₉₀ y CMI₅₀ de eritromicina en *S. pneumoniae*.

AÑO	Intervalo CMI (mg/L)	CMI ₉₀ (mg/L)	CMI ₅₀ (mg/L)
2007	<0,016 - >256	64	0,125
2008	0,016 - >256	128	0,25
2009	0,032 - >256	256	0,25
2010	0,016 - >256	256	0,125
2011	0,032 - >256	256	0,125
2012	0,032 - >256	256	0,125
2013	0,012 - >256	256	0,125
2014	0,032 - >256	256	0,125
2015	0,047 - >256	256	0,25
2016	0,047 - >256	256	0,125
2017	0,032 - >256	256	0,25
2018	0,023 - >256	128	0,19
TOTAL	<0,016 - >256	256	0,125

Los datos de nuestro estudio no difieren de los reportados previamente. Los datos europeos del estudio mundial de vigilancia PneumoWorld, realizado para analizar la sensibilidad de *S. pneumoniae* entre 2001 y 2003 (todavía con escaso impacto de la vacuna PCV7) incluyen un total de 2.279 aislamientos de 8 países. La tasa global de sensibilidad a penicilina fue 75,4% (61,9% en los aislados españoles), a macrólidos 72,9% y a quinolonas 99,2%; destacando en dicho estudio los serotipos 14, 23F, 6B y 19F como los principalmente asociados con la resistencia antibiótica¹⁹⁷.

La tasa de sensibilidad a macrólidos reportada en el estudio europeo es idéntica a la obtenida al inicio del nuestro (72,9% en el año 2007) y ligeramente superior a la tasa de todo el período (70,9%).

Sin embargo, en el año 2006, se publicó en España un trabajo sobre resistencias de *S. pneumoniae* incluyendo 122 cepas de 28 serotipos distintos. Un 66% de las cepas fueron sensibles a penicilina, 67% sensibles a eritromicina, 82% a ceftriaxona y 98,5% a ciprofloxacino, siendo los serotipos 14, 6B, 19 y 9V los que desarrollaron las tasas más altas de resistencia¹⁹⁸; por el contrario, el serotipo 3, el más frecuente aislado, fue totalmente sensible (100%) a los cuatro antibióticos. Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestro estudio, especialmente a partir de 2006.

Por lo que respecta a los serotipos, el mayor número de aislados resistentes se encontró en el serotipo 19A (45,9%) (Figura 40), aunque al hacer la corrección en función del número de aislados de cada serotipo se encontraron serotipos con tasas de resistencia mucho más altas, destacando 24B/F, 15A y 33F con tasas de resistencia por encima del 66% (Figura 41), siendo puntuales los casos en que se aislaron cepas de estos serotipos sensibles a eritromicina. En cambio, serotipos ampliamente distribuidos los últimos años, como el 3 y el 8, mostraron tasas de resistencia a eritromicina muy bajas (6,0% y 4,2%, respectivamente).

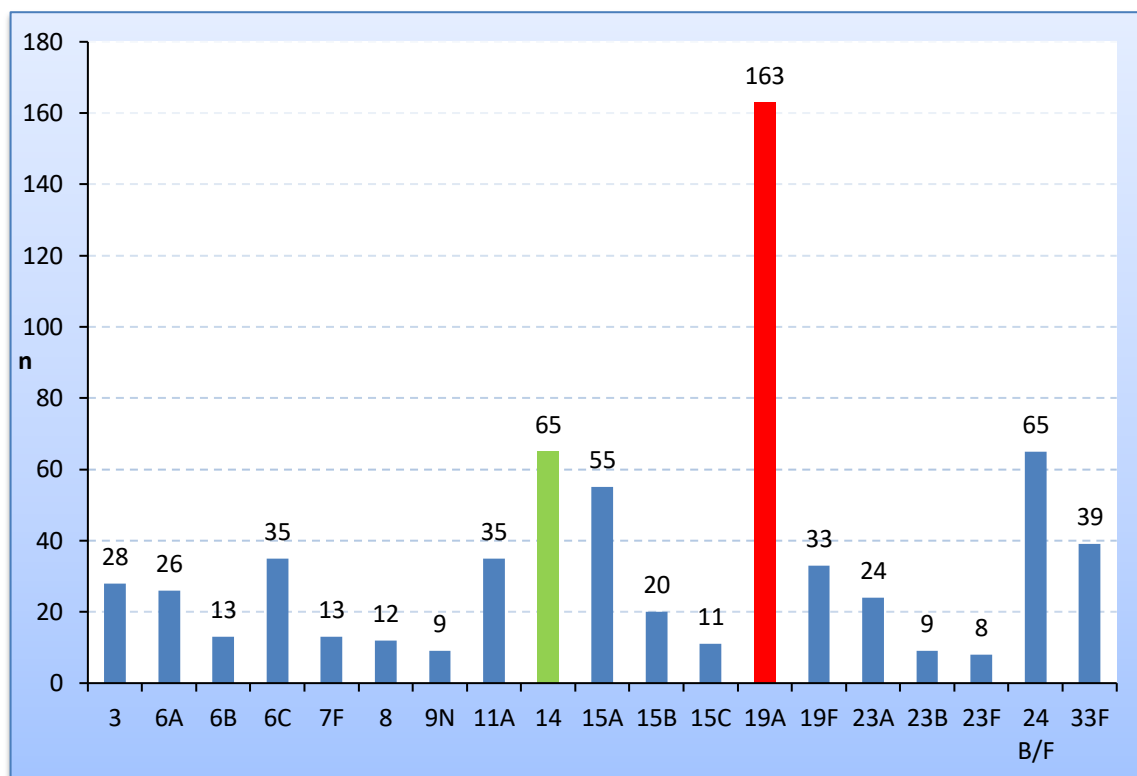


Figura 40. Principales serotipos *S. pneumoniae* resistentes a eritromicina.

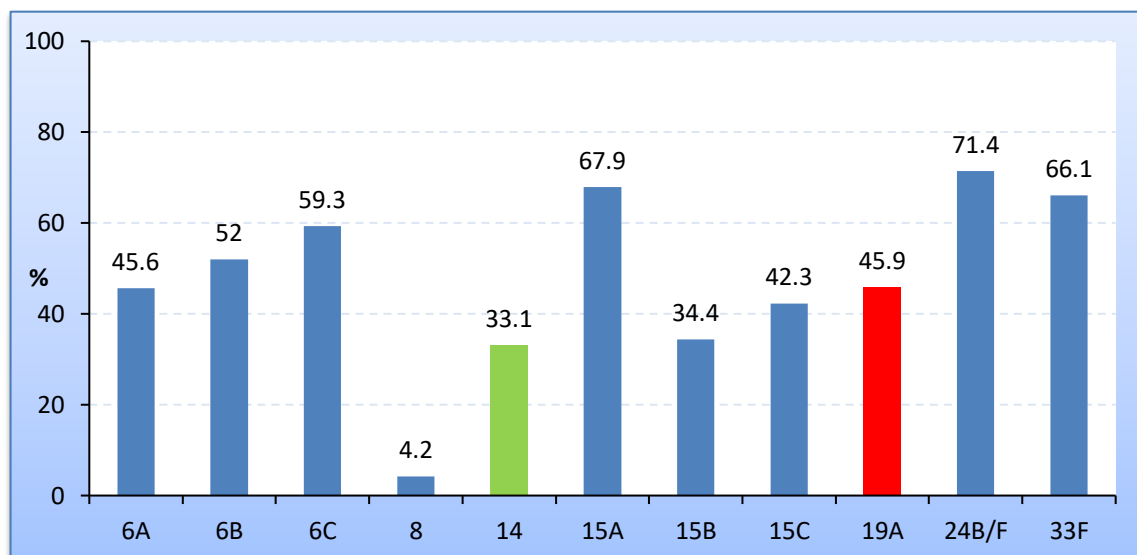


Figura 41. Tasas de resistencia de *S. pneumoniae* a eritromicina según serotipo.

Por lo que respecta al impacto de las vacunas conjugadas en la tasa de sensibilidad a eritromicina, tanto PCV7 como PCV13 han tenido un bajo impacto y apenas han modificado la tasa de sensibilidad debido a la gran variedad de serotipos con tasa altas de resistencia a macrólidos y no todos están incluidos en las vacunas con excepción de 6B, 14 (en la PCV7) y

posteriormente 6A y 19A (PCV13); de manera que, tras la comercialización de la PCV13, incluso la tasa de sensibilidad bajó del 74,6% hasta 69,4% en los años posteriores (OR 0,78 [0,65-0,93] p 0,005).

3.2. Levofloxacino.

El estudio de sensibilidad a levofloxacino se realizó en 2.611 cepas (68,1% del total). El 97,0% de los mismos fueron sensibles y tan solo en el 3% de los aislados se observó una sensibilidad disminuida (Tabla 12 y Figura 42).

En el estudio Pneumoworld la tasa de sensibilidad a quinolonas fue de 99,2% con apenas 18 aislados (de los 2.279 totales) con sensibilidad disminuida. En el estudio de Valles *et al.* la tasa de sensibilidad a ciprofloxacino fue del 98,5%^{197,198}. Los datos de ambos trabajos son muy similares a los obtenidos en nuestro estudio. En el primer año de nuestro análisis (2007) la tasa de sensibilidad a quinolonas fue 98,5% y 96,7% el último año (2018), con muy ligeras variaciones a lo largo de los 12 años, lo que indica una estabilidad muy clara de la sensibilidad del neumococo a las quinolonas en este periodo.

Tabla 12. Sensibilidad a levofloxacino de las cepas de *S. pneumoniae* recuperadas cada año.

AÑO	ANALIZADAS/ESTUDIADAS	S (%)	I (%)	R (%)
2007	395/277	273(98,5)	0	4(1,4)
2008	431/241	231(95,8)	4(1,6)	6(2,4)
2009	385/215	208(96,7)	1(0,4)	6(2,7)
2010	312/138	137(99,2)	0	1(0,7)
2011	289/211	201(95,2)	1(0,4)	9(4,2)
2012	252/178	172(96,6)	1(0,5)	5(2,8)
2013	272/209	204(97,6)	2(0,9)	3(1,4)
2014	259/198	192(96,9)	2(1,0)	4(1,3)
2015	250/197	187(94,9)	3(1,5)	7(3,5)
2016	277/210	205(97,6)	0	5(2,3)
2017	300/232	228 (98,2)	0	4(1,7)
2018	407/305	295(96,7)	2(0,6)	8(2,6)
TOTAL	3829/2611	2533(97,0)	16(0,6)	62(2,3)

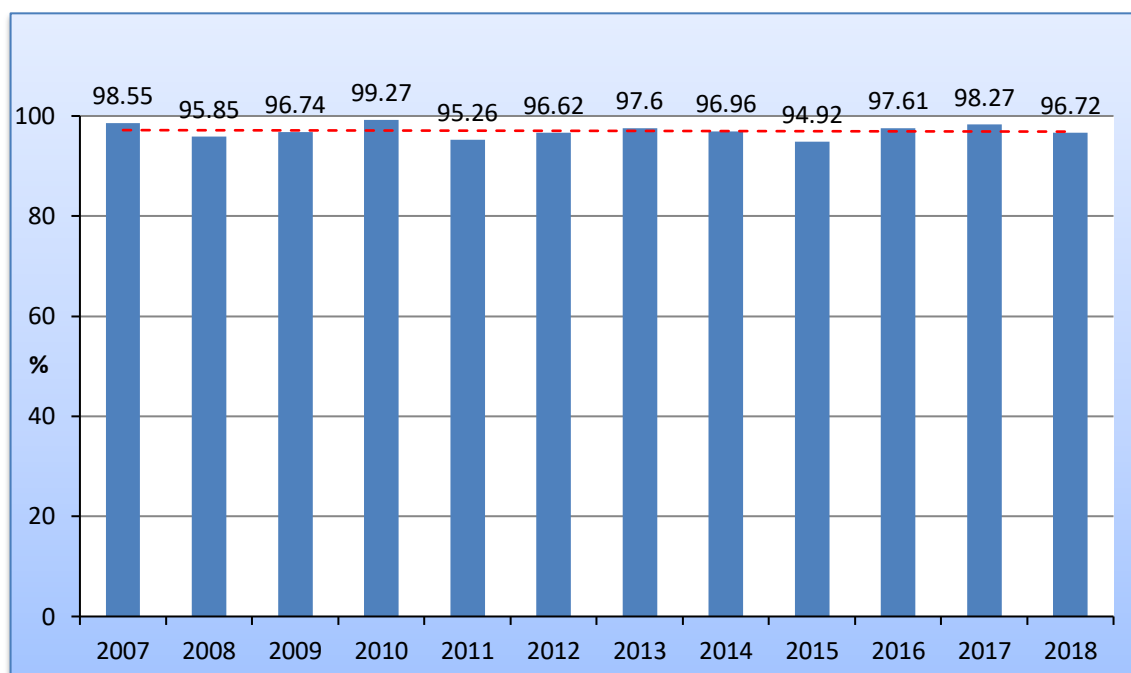


Figura 42. Evolución anual de la tasa de sensibilidad de *S. pneumoniae* a levofloxacino.

El intervalo de la CMI, al igual que la CMI₉₀ y la CMI₅₀, no varió prácticamente a lo largo de los años (Tabla 13).

Tabla 13. Evolución anual de la CMI₉₀ y CMI₅₀ de levofloxacino en *S. pneumoniae*.

AÑO	Intervalo CMI (mg/L)	CMI ₉₀ (mg/L)	CMI ₅₀ (mg/L)
2007	0,38 - >32	1	0,75
2008	0,38 - >32	1	0,75
2009	0,38 - >32	1	0,75
2010	0,38 - >32	1	0,75
2011	0,38 - >32	1	0,75
2012	0,25 - >32	1	0,75
2013	0,5 - >32	1	0,75
2014	0,38 - >32	1,5	1
2015	0,25 - >32	1,5	0,75
2016	0,25 - >32	2	1
2017	0,25 - >32	0,75	0,5
2018	0,25 - >32	1	0,75
TOTAL	0,25 - >32	1	0,75

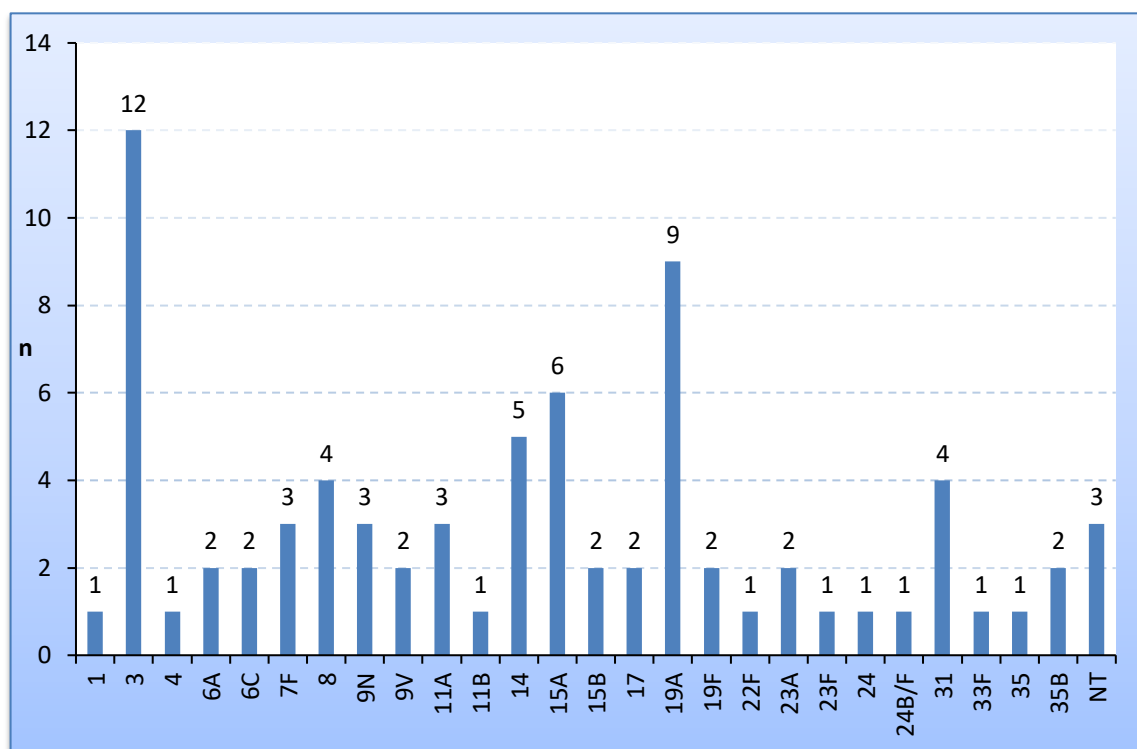


Figura 43. Serotipos de *S. pneumoniae* con sensibilidad disminuida a levofloxacin.

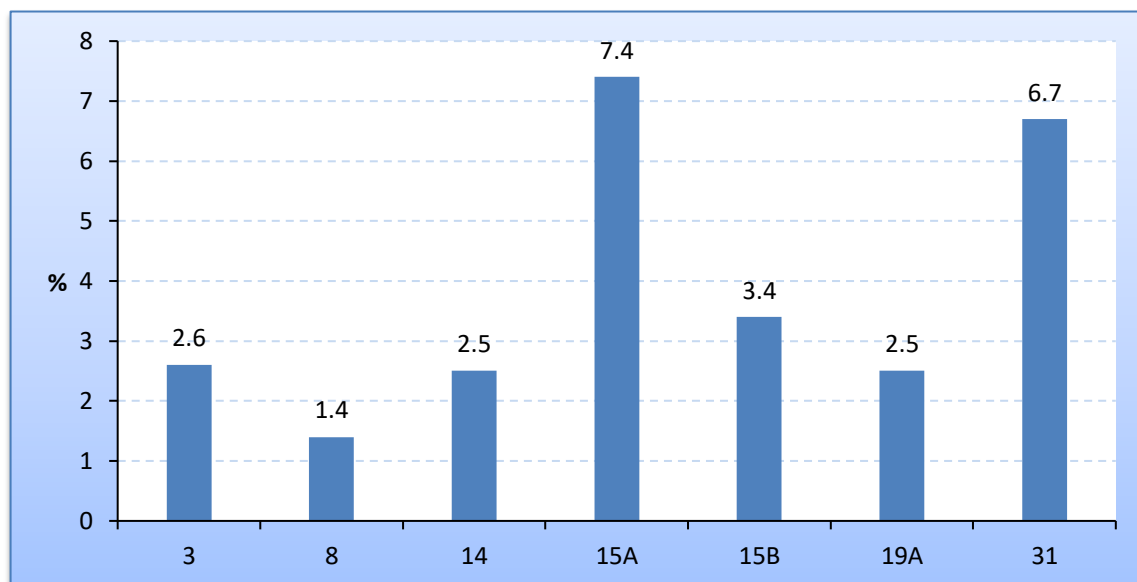


Figura 44. Comparación de las tasas de resistencia a levofloxacin de los principales serotipos con los serotipos más resistentes.

En cuanto a la resistencia por serotipos, a pesar de haber muy pocas resistencias llama la atención la gran variedad de serotipos (Figura 43), por lo que al calcular el porcentaje en todos ellos se detectaron tasas inferiores al 10%, siendo la gran mayoría menor del 5% (Figura 44), de manera que no se observan diferencias significativas entre los distintos serotipos. Doce cepas del serotipo 3 presentaron sensibilidad disminuida a levofloxacino, siendo el serotipo con más casos de sensibilidad disminuida a quinolonas; sin embargo, al hacer la corrección con el total de aislados la tasa de sensibilidad fue 97,4%, similar a los datos globales. Las mismas conclusiones se obtuvieron con otros serotipos asociados generalmente con aislados más resistentes; así el serotipo 19A fue el segundo serotipo con más aislados resistentes (9), pero su tasa de sensibilidad fue 97,5%, también muy similar a los otros. Los serotipos con la tasa de resistencia más elevada fueron los más infrecuentes, destacando los serotipos 15A y 31, los únicos con tasas por encima del 5% pero nunca superiores al 10%.

Con las tasas de sensibilidad tan estables a lo largo del periodo y sin que haya serotipos que capitalicen de manera especial una resistencia marcada a levofloxacino, la introducción de la PCV13 no ocasionó ninguna variación en la tasa de sensibilidad a levofloxacino, pasando de una sensibilidad del 97,5% en los años previos a la PCV13 a una sensibilidad del 96,7 en los años posteriores (OR 0,78 [0,47-1,28] $p < 0,001$).

3.3. Penicilina.

La sensibilidad a penicilina fue estudiada en 2.896 cepas (68,1% del total). El 80,2% de los neumococos fueron sensibles, pero a diferencia de lo observado con eritromicina y levofloxacino (con tasas más estáticas), la evolución de la tasa de sensibilidad a penicilina muestra importantes oscilaciones a lo largo del estudio. En contraste con otros microorganismos en los que las tasas de sensibilidad disminuyen a lo largo de los años por el mayor consumo de antibióticos, en el caso de *S. pneumoniae* partimos de una tasa de sensibilidad más baja al inicio (64,4% en 2007) aumentando la sensibilidad de manera importante en los siguientes años, alcanzando el último año el 81,6%. La tasa de sensibilidad media a lo largo de todo el periodo fue de 80,2%, destacando algunos años, especialmente 2014, con más del 95% de los aislados sensibles (Tabla 14).

Tabla 14. Sensibilidad a penicilina de las cepas de *S. pneumoniae* recuperadas cada año.

AÑO	ANALIZADAS/ESTUDIADAS	S (%)	I (%)	R (%)
2007	395/273	176 (64,4)	76 (27,8)	21 (7,6)
2008	431/299	233 (77,9)	54 (18,0)	12 (4,0)
2009	385/260	220 (84,6)	32 (12,3)	8 (3,0)
2010	312/255	185 (72,5)	57 (22,3)	13 (5,0)
2011	289/238	183 (76,8)	38 (15,9)	17 (7,1)
2012	252/202	190 (94,0)	4 (1,9)	8 (3,9)
2013	272/217	197 (90,7)	4 (1,8)	16 (7,3)
2014	259/198	190 (95,9)	6 (3,0)	2 (1,0)
2015	250/200	151 (75,5)	36 (18,0)	13 (6,5)
2016	277/215	163 (75,8)	42 (19,5)	10 (4,6)
2017	300/233	186 (79,8)	37 (15,8)	10 (4,2)
2018	407/306	250 (81,6)	48 (15,6)	8 (2,6)
TOTAL	3829/2896	2324 (80,2)	434 (14,9)	138 (4,7)

En nuestro estudio destaca un importante aumento de la tasa de sensibilidad a penicilina a partir de 2010, coincidiendo con la introducción de la PCV13, llegando a ser superior al 90% en los años 2012-2014, tras los cuales se observó una disminución (Figura 45). La sensibilidad media en los años previos a la PCV13 fue del 74,8% pasando a 83,4% en los años posteriores mostrando una clara relación con la introducción de la vacuna (OR 1,69 [1,41-2,04] $p < 0,001$).

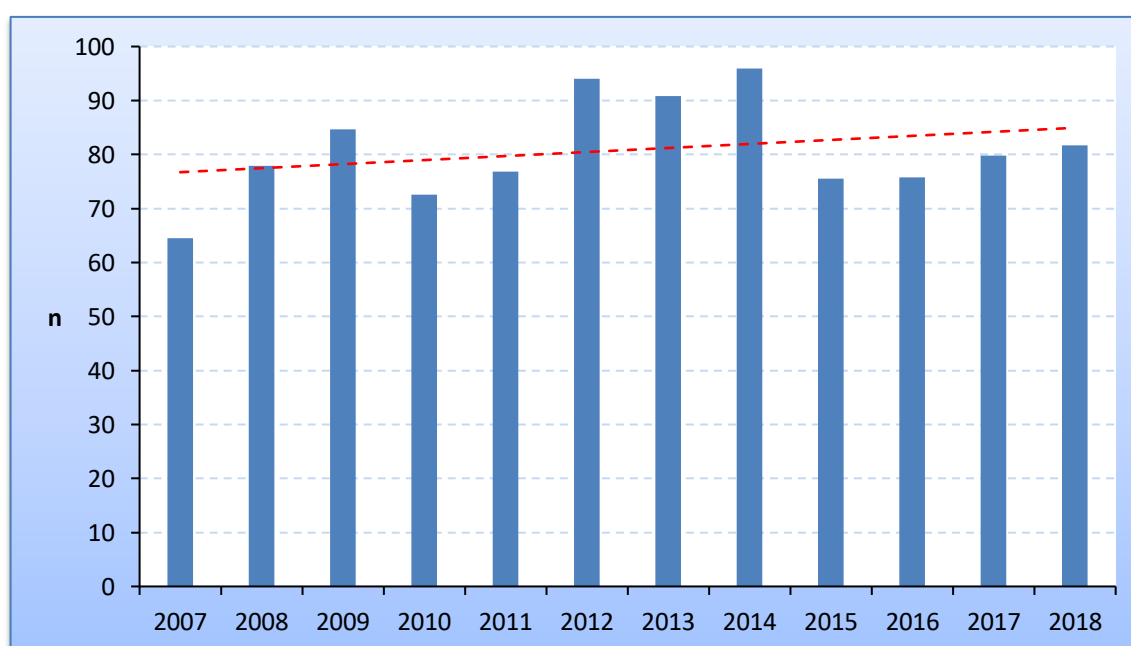


Figura 45. Evolución anual de la tasa de sensibilidad de *S. pneumoniae* a penicilina.

A diferencia de eritromicina y levofloxacin, el intervalo de la CMI de penicilina, la CMI₉₀ y la CMI₅₀ oscilaron a lo largo del estudio, destacando la CMI₉₀, con valores más altos en los años con mayor incremento de los serotipos resistentes a penicilina como 14 y 19A (Tabla 15).

Tabla 15. Evolución anual de la CMI₉₀ y CMI₅₀ de penicilina en *S. pneumoniae*.

AÑO	Intervalo CMI (mg/L)	CMI ₉₀ (mg/L)	CMI ₅₀ (mg/L)
2007	0,003 - 6	1	0,023
2008	0,004 - 8	1	0,023
2009	0,004 - 8	0,5	0,016
2010	0,004 - 4	1	0,023
2011	0,003 - 8	1,5	0,032
2012	0,004 - 8	1,5	0,032
2013	0,006 - 8	1	0,023
2014	0,003 - 12	0,5	0,016
2015	0,003 - 12	0,5	0,023
2016	0,003 - 6	1	0,023
2017	0,003 - 4	0,5	0,023
2018	0,003 - 4	0,75	0,016
TOTAL	0,003-12	1	0,023

Se detectaron 138 aislados con CMI de penicilina >2 mg/L y 434 con sensibilidad disminuida (CMI >0,12 - <2 mg/L). El serotipo 14 y el serotipo 19A fueron los más resistentes: 43 de 196 cepas del serotipo 14 (21,9%) fueron resistentes, mientras que en 40 cepas (20,4%) su sensibilidad fue intermedia, siendo con diferencia el serotipo con la tasa de resistencia más elevada. Por su parte, 35/355 cepas del serotipo 19A (9,8%) fueron resistentes y 73/355 (20,5%) con sensibilidad intermedia (Figura 46). Aunque el serotipo 19A fue menos resistente que el 14, debido al gran aumento de aislados que se produjo a partir de la PCV7, su impacto en la sensibilidad global a penicilina ha sido muy importante.

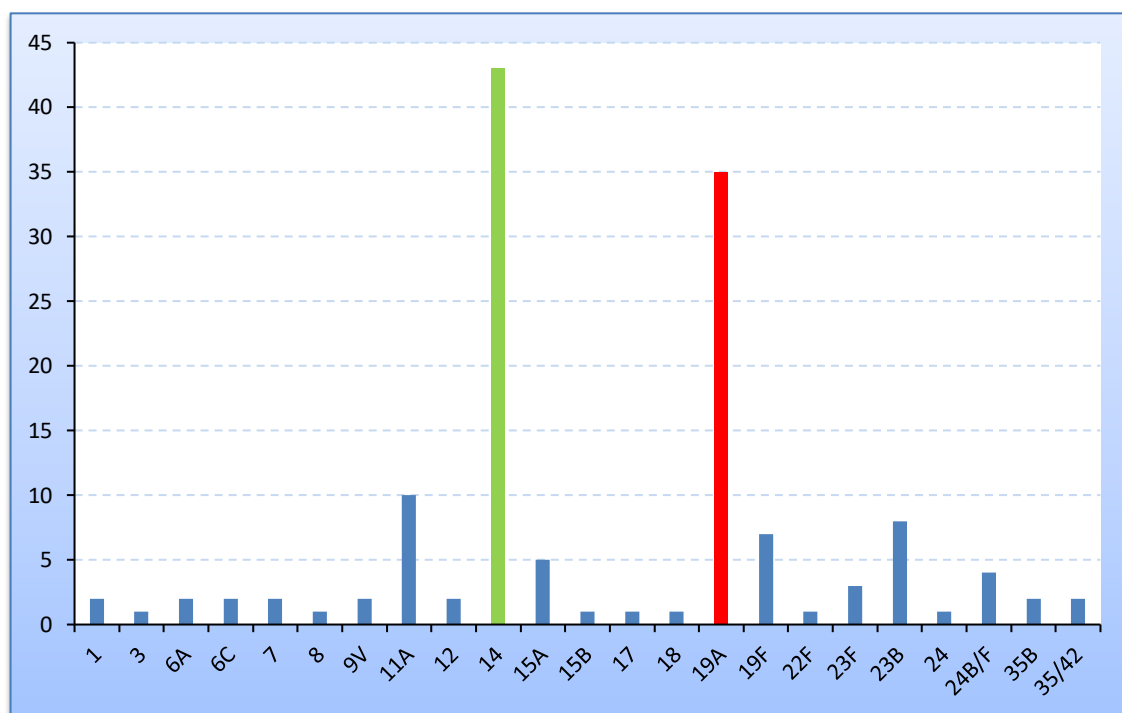


Figura 46. Serotipos de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina.

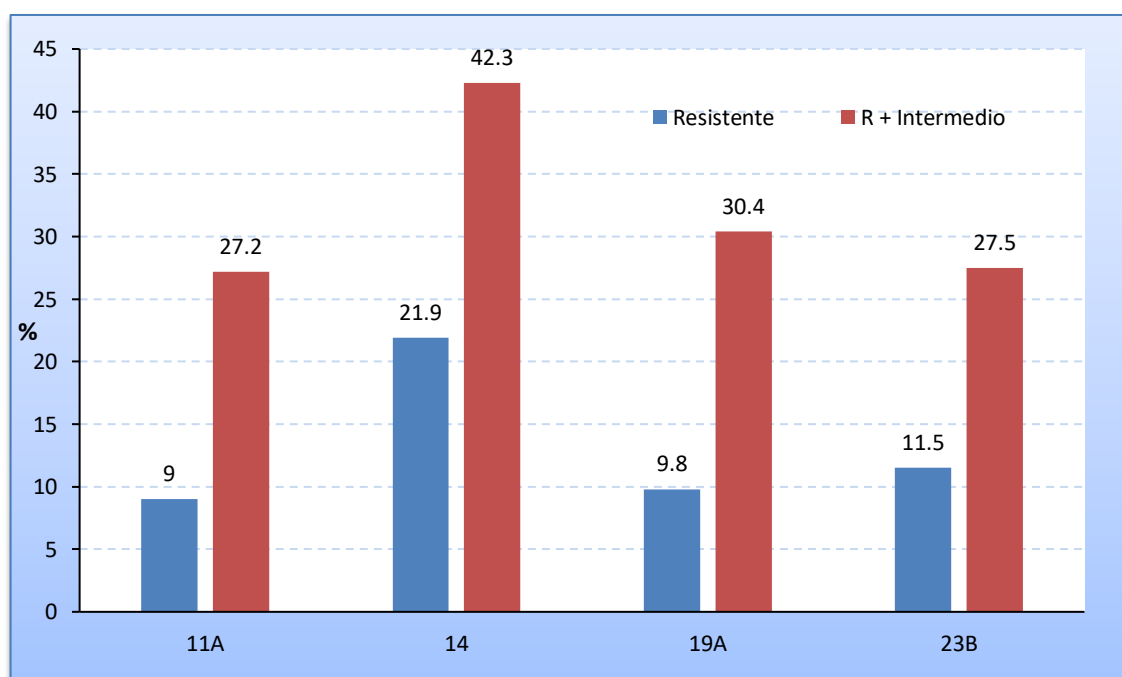


Figura 47. Serotipos de *S. pneumoniae* con las tasas más altas de resistencia a penicilina. En azul resistentes. En rojo resistentes y con sensibilidad intermedia.

Otros serotipos con bajas tasas de sensibilidad fueron 11A y 23B (Figura 47), cuyos aislados aumentaron tras la introducción de la PCV13. Aunque su tasa de resistencia fue prácticamente comparable a la del 19A, debido al menos número de aislados obtenidos en comparación con el 19A tras la PCV7 ha hecho que su impacto en la sensibilidad a la penicilina fuera menor.

En nuestro estudio, la evolución de la tasa de sensibilidad a penicilina va paralela a la evolución de los serotipos con tasas más altas de resistencia. Con la introducción de la PCV7 el número de aislados del serotipo 14 disminuyó de manera importante, por el contrario, se observó un gran aumento de aislados del serotipo 19A. A partir de 2010, gracias a la PCV13, se observa apreció una fuerte disminución del serotipo 19A que se añadió a los escasos aislados del serotipo 14. Todo ello se tradujo en el posterior aumento de la tasa de sensibilidad a penicilina, llegando a tasas superiores al 90% durante los años 2012-2014 (Figura 48).

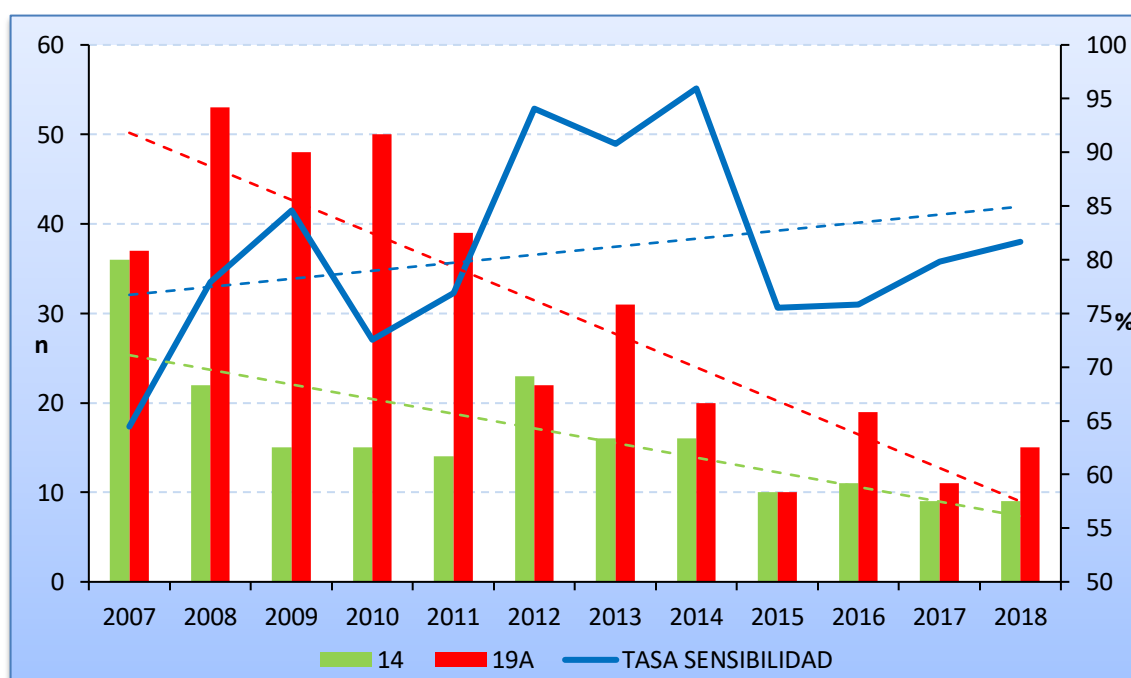


Figura 48. Evolución anual de la tasa de sensibilidad a penicilina comparada con el número de aislados de los serotipos 14 y 19A.

A partir de 2015, a pesar de que los aislamientos de 19A y 14 siguen siendo bajos, vuelve a disminuir la tasa de sensibilidad, posiblemente por el aumento de aislados de 11A y 23B, ya que ambos serotipos prácticamente no se aislaron en los años previos a 2015, así como al pequeño repunte de aislados de los serotipos 14 y 19A en los siguientes años (Figura 49).

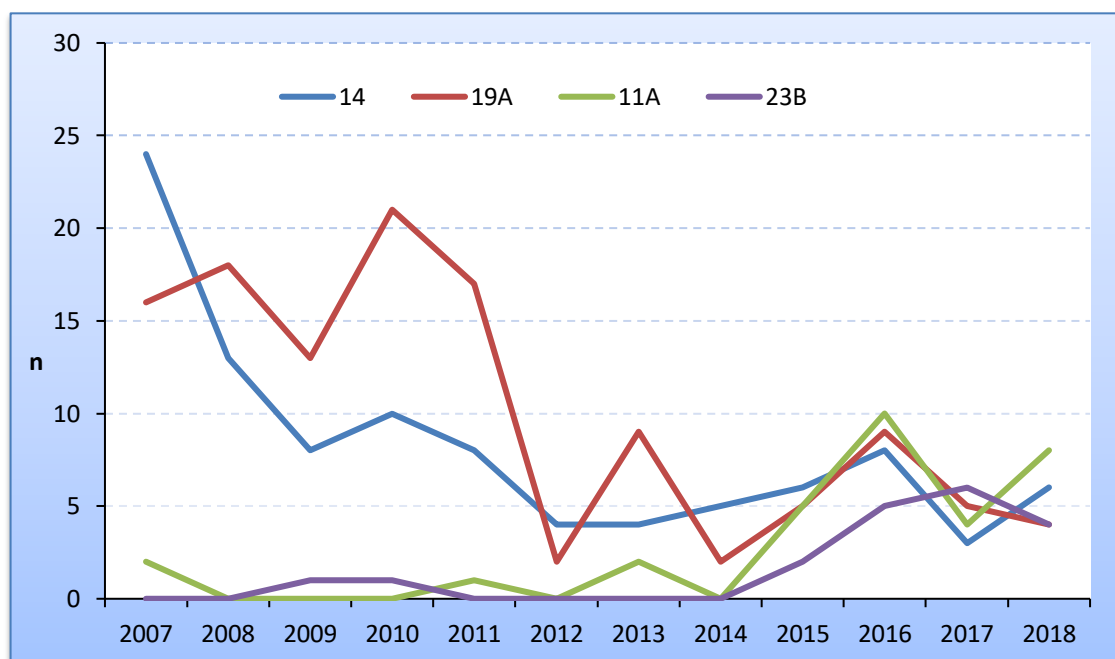


Figura 49. Evolución anual de los serotipos con las tasas de resistencia a penicilina más elevadas.

Los serotipos 11A y 23B, prácticamente inexistentes en los años iniciales del estudio, aparecen de manera notoria a partir de 2015 (Figura 45). Ambos serotipos presentan una tasa de sensibilidad mucho más baja que el resto, especialmente 3 y 8 que son los más frecuentes en los años finales del estudio. De hecho, en nuestro estudio, la tasa de sensibilidad de los serotipos 11A y 23B es muy similar a la del serotipo 19A (Figura 50).

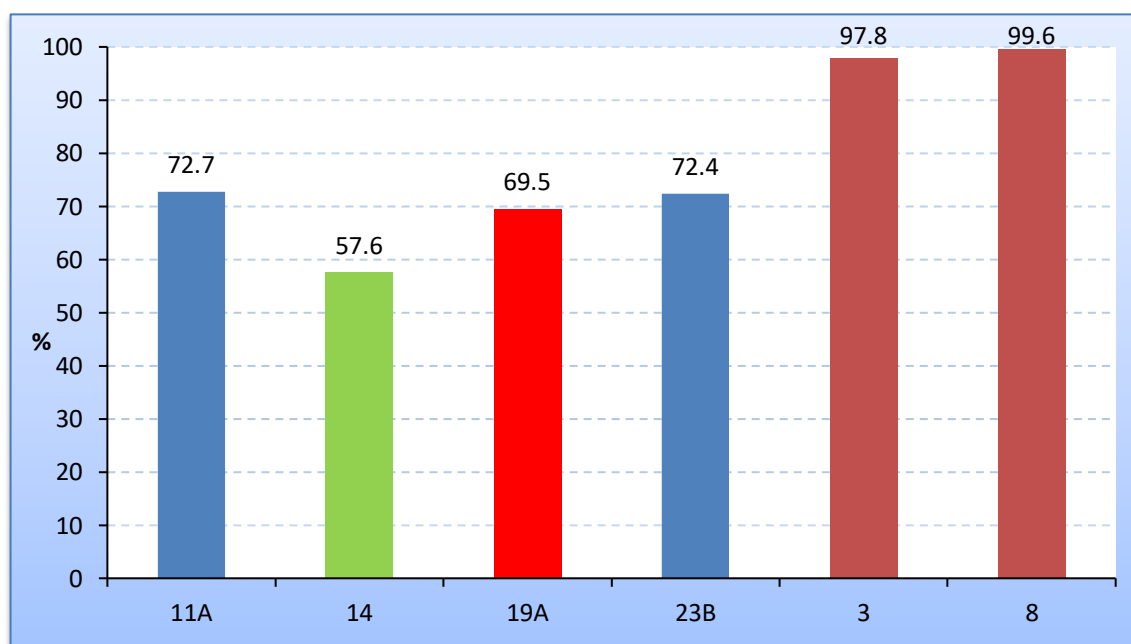


Figura 50. Comparativa de las tasas de sensibilidad de los serotipos más resistentes a penicilina con los serotipos 3 y 8.

Globalmente, los estudios publicados muestran resultados similares. En el estudio Pneumoworld, la tasa de sensibilidad a penicilina fue de 75,4% en el conjunto de todos los aislados europeos, pero si tenemos en cuenta solo los aislados de España la tasa de sensibilidad descendía al 61,9%, más cerca de los resultados que obtuvimos en nuestro estudio en 2007 (64,4%)¹⁹⁷.

Tras la introducción de la PCV7, en el año 2000, se observa un aumento de la resistencia a penicilina en distintas áreas geográficas. Así, en el año 2007 se publicó un estudio en población pediátrica vacunada con PCV7 en EE.UU., evidenciando que la significativa modificación de los serotipos circulantes incidía en la tasa de sensibilidad a betalactámicos, especialmente a penicilina¹⁹⁹. En este caso, el aumento de serotipos no vacunales como 6A, 35B y, especialmente, 19A produjeron un incremento en las tasas de resistencia a betalactámicos en general y a penicilina en particular.

En un estudio japonés con 2.856 cepas recogidas entre 2010 y 2017 se reportaron cambios similares: disminución de serotipos vacunales tras la introducción de PCV7 y PCV13 y aumento posterior de serotipos no vacunales²⁰⁰. Los autores relacionan esta variación de serotipos con variaciones en la sensibilidad a penicilina, de manera que las disminuciones de aislados resistentes estuvieron estrechamente relacionadas con la reducción de los serotipos 6B, 14, 19F y 23F tras la introducción de PCV7 y con la reducción de los serotipos 6A y 19A tras la introducción de PCV13.

El caso más paradigmático de la relación entre sensibilidad a penicilina y serotipo 19A lo encontramos en los países que en 2010 optaron por la PCV10 (vacuna que no protege frente al serotipo 19A) en lugar de la PCV13. En Finlandia, el serotipo 19A representaba más de la mitad de los casos de ENI en el año 2015, en los niños menores de 5 años y en los mayores de 5 años el número de casos de ENI por 19A aumentó constantemente desde la introducción de la PCV10²⁰¹. En Brasil, donde también se optó por la PCV10 desde 2010, tras una inicial disminución de los aislados resistentes, a partir de 2013 la proporción de aislados con CMI de penicilina >0,12 mg/L aumentó progresivamente alcanzando el 39,4% en 2019. Además, La ausencia de sensibilidad a la penicilina y ceftriaxona aumentó en 2014-2016, y nuevamente en 2017-2019, especialmente en los serotipos 19A, 6C y 23A²⁰².

3.4. Ceftriaxona.

La sensibilidad a ceftriaxona fue estudiada en 2904 aislados (75,8% del total), con una tasa de sensibilidad del 94,6% de todo el período, siendo 2007 el año con la tasa más baja (88,4%) (Tabla 16).

Tabla 16. Sensibilidad a ceftriaxona de las cepas de *S. pneumoniae* recuperadas cada año.

AÑO	ANALIZADAS/ESTUDIADAS	S (%)	I (%)	R (%)
2007	395/276	244 (88,4)	30 (10,8)	2 (0,7)
2008	431/296	277 (93,5)	16 (5,4)	3 (1,0)
2009	385/258	245 (94,9)	11 (4,2)	2 (0,7)
2010	312/262	243 (92,7)	14 (5,3)	5 (1,9)
2011	289/236	210 (88,9)	21 (8,8)	5 (2,1)
2012	252/204	200 (98,0)	4 (1,9)	0
2013	272/220	209 (95,0)	7 (3,1)	4 (1,8)
2014	259/198	194 (97,9)	2 (1,0)	2 (1,0)
2015	250/200	195 (97,5)	5 (2,5)	0
2016	277/215	207 (96,2)	7 (3,2)	1 (0,4)
2017	300/233	230 (98,7)	3 (1,2)	0
2018	407/306	295 (96,4)	10 (3,2)	1 (0,3)
TOTAL	3829/2904	2749 (94,6)	130 (4,4)	25 (0,8)

Al igual a lo observado con la penicilina, desde 2012 se aprecia una importante disminución de los aislados más resistentes, alcanzando tasas de sensibilidad superiores al 95% en los siguientes años sin observarse grandes fluctuaciones, ya que, a diferencia de la penicilina se parte de una tasa de sensibilidad mucho más elevada (Figura 51).

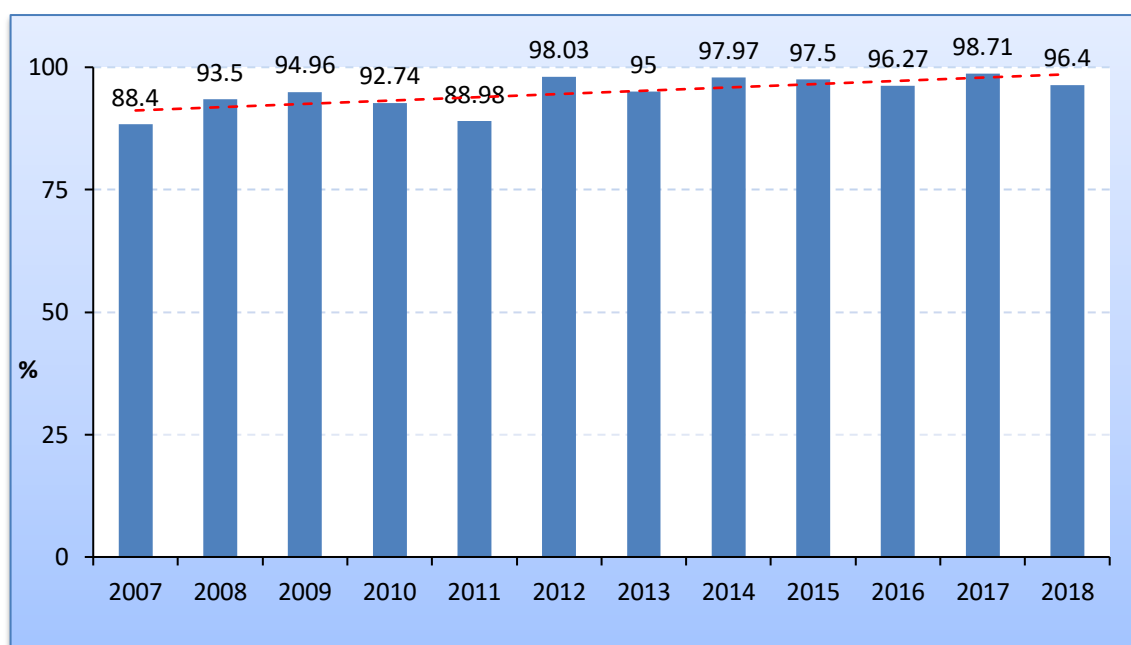


Figura 51. Evolución anual de la tasa de sensibilidad de *S. pneumoniae* a ceftriaxona.

Al igual que en el caso de penicilina, el intervalo de CMI, la CMI₉₀ y la CMI₅₀ también oscilaron a lo largo del estudio, destacando la CMI₉₀, más alta en los años con predominio de los serotipos 14 y 19A (Tabla 17).

Tabla 17. Evolución anual de la CMI₉₀ y CMI₅₀ de ceftriaxona en *S. pneumoniae*.

AÑO	(mg/L)	CMI ₉₀ (mg/L)	CMI ₅₀ (mg/L)
2007	0,003 - 4	0,75	0,016
2008	0,004 - 6	0,75	0,016
2009	0,004 - 3	0,5	0,016
2010	0,004 - 4	0,75	0,016
2011	0,003 - 4	0,75	0,032
2012	0,003 - 2	0,75	0,032
2013	0,003 - 4	0,5	0,023
2014	0,003 - 3	0,38	0,016
2015	0,003 - 1,5	0,38	0,016
2016	0,002 - 1,5	0,38	0,012
2017	0,002 - 1	0,38	0,016
2018	0,003 - 3	0,38	0,012
TOTAL	0,003 - 6	0,5	0,016

Los serotipos con CMI de ceftriaxona >2 mg/L fueron casi exclusivamente el 19A y el 14, con 11 y 9 aislados, respectivamente (Figura 52). Los serotipos con las tasas de resistencia a ceftriaxona más elevadas fueron el 19A (3,0%) y el 14 (4,5%). Si incluimos los aislados con sensibilidad intermedia, las tasas de sensibilidad a ceftriaxona fueron 85,6% para el serotipo 19A y 70,9% para el 14, siendo éste el serotipo con la tasa de sensibilidad más baja a ceftriaxona.

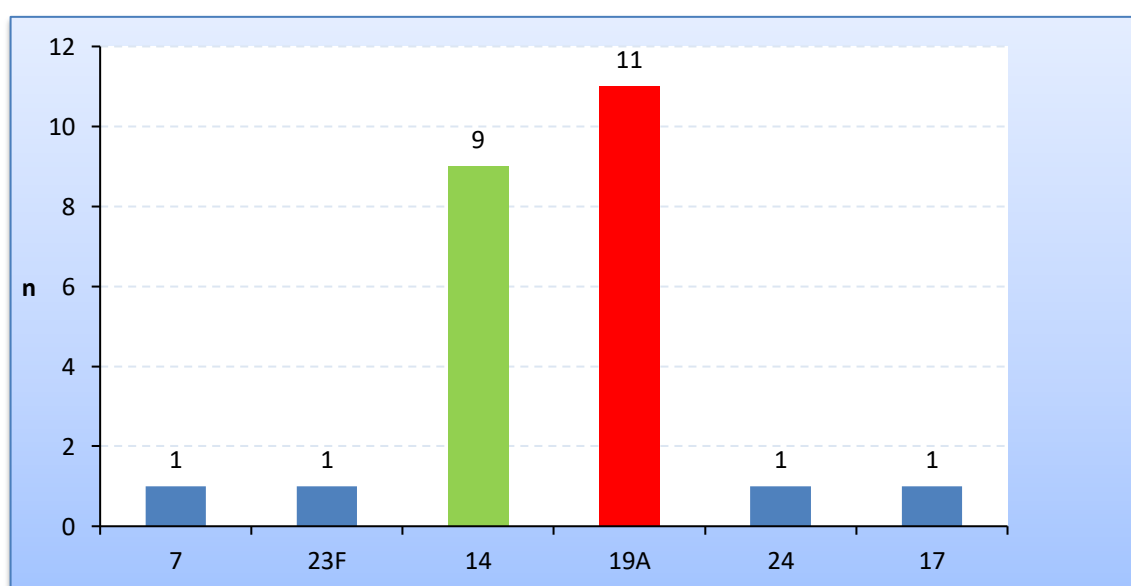


Figura 52. Serotipos de *S. pneumoniae* resistentes a ceftriaxona.

Al estar ambos serotipos incluidos en la vacuna PCV13 (el serotipo 14 ya lo estaba en la PCV7) se observó una importante disminución de los aislados a partir de 2011, lo que incidió en una mejora de la tasa de sensibilidad a ceftriaxona, al igual que había ocurrido con la penicilina, debido a la disminución de los aislados con las tasas de resistencia más altas. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurrió con la penicilina, la tasa de sensibilidad permaneció más o menos estable desde 2012 al no aislarse otros serotipos con sensibilidad disminuida a la ceftriaxona (Figura 53).

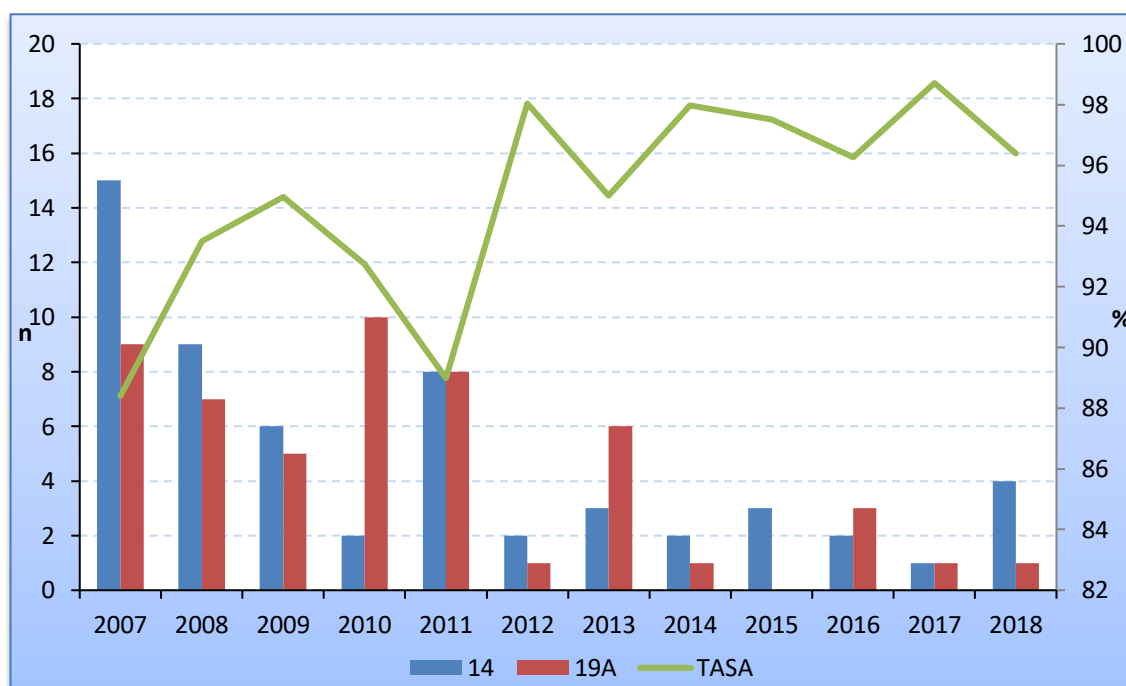


Figura 53. Comparativa entre el número de aislados de los serotipos 14 y 19A con sensibilidad disminuida a penicilina y la tasa de sensibilidad a ceftriaxona.

El aumento de los serotipos 11A y 23F desde 2015 tuvo repercusión en la sensibilidad a penicilina, pero no en la de ceftriaxona, cuyos aislados se mantuvieron en la categoría de sensible. Tan solo se observó una elevación de la CMI de ceftriaxona, de 0,75 mg/L, en seis aislamientos del serotipo 11A y en uno del 23B. Ningún aislado de ambos serotipos fue resistente a ceftriaxona. Al no haber nuevos serotipos con especial resistencia por la ceftriaxona, a diferencia de lo observado con la penicilina, el impacto de la vacuna PCV13 desde 2010 es mucho mayor que con la penicilina, al ser una vacuna que incide especialmente con los serotipos con las tasas de resistencia a ceftriaxona más altas (OR 1,99 [1,44-2,75] $p < 0,001$).

Los resultados obtenidos en otros países son muy similares a los de nuestro estudio y paralelos a los observados con penicilina, si bien los niveles de resistencia a ceftriaxona son considerablemente menores a los de la penicilina. Destacan los estudios de países en los que se optó por la PCV10 en lugar de la PCV13, ya que al no tener el serotipo 19A en su vacuna la

tasa de sensibilidad a ceftriaxona se resintió más. En el estudio brasileño comentado anteriormente se observó una importante disminución de las resistencias a penicilina y ceftriaxona en los tres años siguientes a la introducción de la PCV10; sin embargo, en años posteriores la resistencia a ceftriaxona volvió a aumentar a expensas de serotipos no cubiertos por la PCV10 como el 19A²⁰². En este mismo estudio se detectó un aumento de la resistencia a ceftriaxona en aislados causantes de meningitis durante los últimos años, pero más relacionados con el cambio de los puntos de corte que con la aparición de nuevos serotipos resistentes. En Taiwán, donde la introducción de la PCV13 fue más tardía, se detectó un preocupante aumento de la resistencia a ceftriaxona, en parte por la introducción de la PCV7; en este estudio la infección por los serotipos 6A, 15B, 19A, 19F o 23F fue el principal factor de riesgo independiente asociado con la resistencia a la ceftriaxona (criterios de no meningitis)²⁰³

3.5. Aislados multirresistentes.

En nuestra serie estudiamos la sensibilidad los cuatro antibióticos en 2.611 cepas de *S. pneumoniae* y en tan solo 16 se detectó resistencia a 3 o más antibióticos; por lo que la tasa de multirresistencia fue extremadamente baja (0,61%). El serotipo multirresistente más frecuente fue el 19A con 6 aislados (37,5%), seguido por el 14 y 15A ambos con 3 aislados cada uno (18,75%). Hay que destacar el serotipo 15A, que con muchos menos aislados que los serotipos 14 y 19A tres de ellos fueron multirresistentes, destacando la importancia del avance de este serotipo durante estos últimos años. Estos datos revelan la excepcionalidad de la multirresistencia de *S. pneumoniae* en nuestro medio (Figura 54).

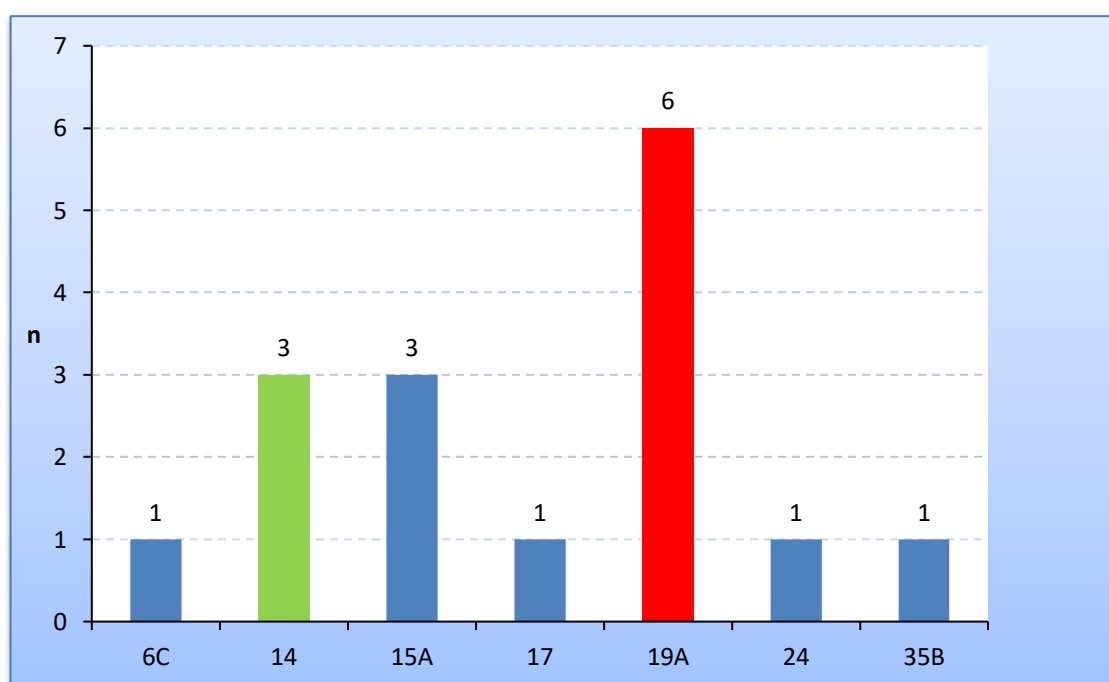


Figura 54. Serotipos de *S. pneumoniae* con aislados multirresistentes.

En todos los estudios publicados es común el bajo porcentaje de multirresistencia, siendo casi siempre penicilina y eritromicina los antibióticos más afectados y en relación con determinados serotipos; como en un estudio de México donde la multirresistencia, al igual que en nuestra serie, también se asoció especialmente al serotipo 19A²⁰⁴. Así mismo, en un estudio multicéntrico e internacional publicado en 2019 la tasa de *S. pneumoniae* resistente a alguno de los antibióticos más usados fue del 1,3%, mientras que en el caso de neumococos multirresistentes y extremadamente resistentes fue del 0,2% y 0,03% respectivamente²⁰⁵, datos de multirresistencia más bajos aún que en nuestra serie.

De los 16 aislados con multirresistencia ninguno de ellos fue sensible a penicilina, siendo este el antibiótico menos sensible seguido de eritromicina con tan solo un aislado sensible, si bien las CMI de penicilina obtenidas oscilaron en un rango de 0,19-8 mg/L con 6 aislados en la categoría de resistente y el resto con sensibilidad intermedia. Por el contrario, las CMI de eritromicina estaban entre 0,12 y >256 mg/L, con solo un aislado sensible y el resto resistentes (Tabla 18).

Tabla 18. Sensibilidad *in vitro* de los serotipos multirresistentes a los 4 antibióticos analizados (S: sensible, I: intermedio, R: resistente).

SERO TIPO	CMI (mg/L) / Categoría							
	Penicilina		Ceftriaxona		Levofloxacino		Eritromicina	
6C	1	I	0,75	I	0,75	S	>256	R
14	4	R	1	I	8	R	>256	R
14	4	R	2	I	32	R	>256	R
14	1	I	0,75	I	32	R	12	R
15A	1	I	0,75	I	2	S	>256	R
15A	0,25	I	0,38	S	>32	R	>256	R
15A	0,19	I	0,032	S	8	R	>256	R
17	8	R	4	R	8	R	0,12	S
19A	2	I	1	I	0,75	S	24	R
19A	1,5	I	0,75	I	0,75	S	12	R
19A	8	R	4	R	0,75	S	>256	R
19A	8	R	0,75	S	>32	R	>256	R
19A	2	I	1	I	8	R	>256	R
19A	2	I	1	I	2	S	>256	R
24	8	R	4	R	2	S	>256	R
35B	0,38	I	0,25	S	>32	R	0,5	I

4. ESTUDIO GENÉTICO DE LOS AISLADOS RESISTENTES.

4.1. Eritromicina.

La resistencia a macrólidos en *S. pneumoniae* se debe a tres mecanismos principales:

- i) Metilación del ARN ribosómico 23S en el nucleótido de la diana de la eritromicina, codificado por los genes *erm*. Este mecanismo, el más frecuente en Europa²⁰⁶ y se relaciona con resistencia de alto nivel a eritromicina (CMI: 64 mg/L) y otros macrólidos, lincosamidas y estreptograminas tipo B (fenotipo MLSB).
- ii) Bombas de expulsión, codificadas por los genes *mef*. Este mecanismo es más frecuente en Norteamérica y se relaciona con resistencia de nivel medio a eritromicina (CMI: 1-32 mg/L) y sensibilidad a macrólidos de más de 14 átomos, lincosamidas y estreptograminas B (fenotipo M).
- iii) Mutación en el ARN ribosómico 23S o en las proteínas ribosómicas L4 o L224. Es el mecanismo más infrecuente.

Estudiamos la sensibilidad a eritromicina en 2.793 cepas (72,94% del total) y 739 (26,45%) fueron resistentes, pero para la detección de genes de resistencia solo se analizaron las cepas resistentes desde 2012, un total de 415 cepas, de las cuales solo en 330 (79,5% de las cepas resistentes) la calidad de ADN extraído fue adecuado para la detección de los genes relacionados con la resistencia. Entre ellos, el gen *erm* fue detectado en 227 aislados (79,3%), en 35 se detectaron tanto el gen *erm* como el *mef*, y en 21 se detectó únicamente el gen *mef* (Tabla 19). En 45 cepas no se detectó ninguno de los dos genes, por lo que habría que estudiar otros mecanismos como mutaciones en el ARNr 23S' o en las proteínas ribosómicas.

Tabla 19. Correlación entre la CMI de eritromicina y la presencia de genes de resistencia.

CMI (mg/L)	AISLADOS	Gen de resistencia detectado			
		<i>erm</i>	<i>erm + mef</i>	<i>mef</i>	ND
0,38	2 (0,6%)			2	
0,5	1 (0,3%)			1	
1,5	1 (0,3%)	1			
2	5 (1,5%)	1		4	
4	6 (1,8%)	1		4	1
6	7 (2,1%)	1		3	3
8	12 (3,6%)	3		2	7
12	6 (1,8%)	1		1	4
16	23 (6,9%)	7			16
24	12 (3,6%)	6			6
>256	255 (77,7%)	206	35	4	10
TOTAL	330	227	35	21	47

ND, no detectado

Estos datos son muy similares a los obtenidos en otros estudios. En una serie española realizada en Canarias el gen *erm* fue detectado prácticamente en el 79% de las cepas resistentes a macrólidos²⁰⁷, lo mismo que en un estudio europeo realizado en 2004 con datos de España, Francia, Alemania, Grecia, Polonia y Suiza en el que el 78% de las cepas resistentes a macrólidos del conjunto de los países fueron *erm* positivos²⁰⁶. Al estudiar los datos por países, en España el 77,3% de las cepas resistentes a macrólidos fueron *erm* positivas, al igual que en otros estudios españoles, aumentando en otros países como Suiza (80%), Francia (87,5%) y Polonia (100%); por el contrario, en Alemania y Grecia destacaron las altas tasas del gen *mef* (33,3 % de las cepas en Alemania y 100% en Grecia), muy en relacionadas con el serotipo 14.

En nuestra serie, la correlación entre la presencia del gen *erm* y CMI de eritromicina muy elevada fue la norma. De los 262 aislados con el gen detectado, en 241 (91,6%) aislados la CMI fue >256 mg/L, siendo puntuales los casos con una CMI menor, aunque todavía dentro de la categoría resistente (Tabla 15).

Al analizar la presencia del gen *erm* por serotipos, resaltan los que tienen las tasas más altas de resistencia a eritromicina, tales como 24B/F (71,4% de cepas resistentes a eritromicina), 15A (67,9%), 33F (66,1%) y 6C (59,3%). En estos cuatro serotipos, el gen *erm* fue detectado en más del 90% de los aislados, destacando el serotipo 24B/F donde de los 43 aislados analizados el gen *erm* fue detectado en 41 aislados (95,3%). Sobresale también el serotipo 19A, aunque su tasa de resistencia a eritromicina es menor que en los anteriores (45,9%), el gen *erm* fue detectado en la mayoría de los aislados resistentes, concretamente en 40 de los 43 aislados estudiados (93%). En el lado contrario está el serotipo 11A con 14 aislados resistentes, pero en los que en tan solo 2 (14,2%) fue detectado el gen *erm* (Tabla 20).

Tabla 20. Serotipos de *S. pneumoniae* con el gen de resistencia *erm* detectado.

Aislados de <i>S. pneumoniae</i> con gen <i>erm</i>								
SEROTIPOS	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	TOTAL
3		1	2	1		4	1	9 (50%)
6A	1			1		1		3 (60%)
6B		1		1	1		2	5 (100%)
6C		1	3	6	4	5	9	28 (96,5%)
8						1		1 (16,6%)
9L		1						1
9N		1			2	1		4 (44,4%)
10A			1				3	4 (80%)
11A	1	1						2 (14,2%)
14		1	1	1	3		4	10 (76,9%)
15A	2	3	5	4	1	11	9	35 (94,5%)
15B	2	1	1		3	2		9 (81,8%)
15C			2		2	2	2	8 (80%)
16		1					1	2
18C	1							1
19A	7	8	4	2	7	6	6	40 (93%)
19F	1	5	3	2	1		1	13 (72,2%)
23A	4	1	1	2	1	3	1	13 (86,6%)
23B		1		1		1		3 (50%)
23F						1	1	2
24B/F	4	4	1	3	8	13	8	41 (95,3%)
33F			2	9	3	8	3	25 (86,2%)
34					1			1
35B				1				1
AUTO				1				1
NO AG						1		1
TOTAL	23	31	26	35	37	60	51	263 (79,6%)

De los 330 aislados analizados, el gen *mef* fue detectado en 56 (16,9%), en 35 de los cuales fue detectado juntamente con el gen *erm* mientras que en los 21 restantes únicamente fue detectado el gen *mef* (Figura 55).

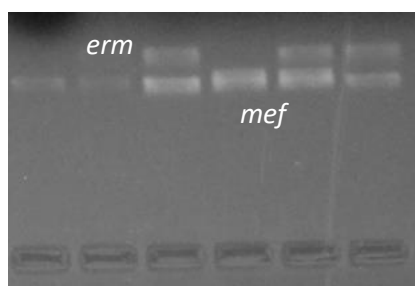


Figura 55. Detección de los genes *mef* y *erm* en *S. pneumoniae*.

Por serotipos, destaca el 19A, ya que de 43 aislados resistentes a eritromicina el gen *mef* fue detectado en solo siete de ellos (16,2%), todos juntamente con el gen *erm*, siendo uno de los serotipos en el que más veces fue detectado junto con el serotipo 14 con siete aislados con el gen *mef* de trece aislados resistentes (algo más de la mitad de todos los resistentes) lo que indica una asociación entre el serotipo 14 y el gen *mef* en nuestro estudio (Tabla 21). Sin embargo, la presencia del gen *mef* en nuestro medio fue baja. Datos muy similares se obtuvieron en un estudio realizado en las Islas Canarias en 2007, donde el gen *erm* estuvo muy relacionado con el serotipo 19A mientras que el gen *mef* lo estuvo con el 14²⁰⁷.

Tabla 21. Serotipos de *S. pneumoniae* con el gen de resistencia *mef* detectado.

SEROTIPOS	<i>mef</i> + <i>erm</i>	<i>mef</i>	TOTAL <i>mef</i>
1		1	1 (1,7%)
3	2	3	5 (8,9%)
4		1	1 (1,7%)
6B	1		1 (1,7%)
6C	3		3 (5,3%)
8		1	1 (1,7%)
9N	1		1 (1,7%)
11A		1	1 (1,7%)
12		1	1 (1,7%)
14	2	5	7 (12,5%)
15A	5		5 (8,9%)
15B	1		1 (1,7%)
15C	1		1 (1,7%)
19A	7		7 (12,5%)
19F	2	3	5 (8,9%)
23A	2	3	5 (8,9%)
24B/F	5	1	6 (10,7%)
33F	3	1	4 (7,14%)
TOTAL	35	21	56

En cuanto a la sensibilidad en los aislados con gen *mef*, en los 35 aislados con ambos genes las CMI obtenidas para eritromicina fueron muy altas, todas ≥ 256 mg/L. Sin embargo, las CMI fueron inferiores en los 21 aislados con el gen *mef* en exclusiva; solo en 4 aislados se obtuvieron CMI de ≥ 256 mg/L (serotipos 3, 8, 23A y 24B/F), en el resto las CMI oscilaron desde 0,38 mg/L (serotipos 3 y 12) hasta 12 mg/L (serotipo 14).

Para estudiar la relación del serotipo con el mecanismo de resistencia y compararlo con otros estudios es muy importante conocer los años en los que se enmarca el estudio para poder relacionarlos con las distintas vacunas conjugadas. Es el caso del estudio canario, con cepas de

los años 2004-2005 que recogen el incremento del serotipo 19 con tasas de resistencia a eritromicina muy elevadas y un serotipo 14 cuya presencia aún es notable²⁰⁵. De igual manera, en el estudio europeo de 2005 aún serán importantes los serotipos 14 y 23²⁰⁶, mientras que, en nuestra serie, con aislados desde 2012 destaca el 19A como el serotipo con más detecciones del gen *erm* en 2012 y 2013 para posteriormente ser superado por serotipos no incluidos en ninguna vacuna conjugada como es el caso del serotipo 33F el más frecuente en 2015, el serotipo 24B/F en 2016 y 2017 o 15A y 6C en 2018 (Tabla 16).

En un estudio de 2016, que recoge datos de varios países y el impacto que tuvieron las vacunas conjugadas²⁰⁸, destacan los datos de EE.UU. con altas tasas de resistencia a macrólidos a expensas del gen *mef*, a diferencia de España y mayor parte de Europa, donde la introducción de la PCV7 ocasionó la disminución de la resistencia al declinar los serotipos más asociados a resistencia a macrólidos, especialmente el 14 muy asociado a la presencia del gen *mef*²⁰⁹; resultados similares a los norteamericanos los encontramos en un estudio alemán con elevada presencia del gen *mef*²¹⁰. Esta disminución de aislados resistentes a macrólidos se vio compensada por el aumento de serotipos no incluidos en la PCV7, especialmente el 19A. El serotipo 19A, con el fenotipo de resistencia dual a los macrólidos tanto *erm* como *mef* aumentó rápidamente desde 2003 hasta 2010 en los EE. UU. y en todo el mundo²¹¹. La presión selectiva de PCV7 y el uso intenso y continuado de macrólidos a alto nivel brindaron una oportunidad para que el serotipo 19A, y especialmente el clon ST320, se expandiera en todo el mundo. La introducción de PCV13 a finales de 2010, que contiene el serotipo 19A, logró reducir la ENI causada por los serotipos de la vacuna, incluidos los aislados del serotipo 19A resistentes a los macrólidos²¹²; sin embargo, esta situación no provocó una disminución de la resistencia a macrólidos debido al fenómeno de reemplazo por serotipos como el 24B/F, con tasas de resistencia a macrólidos muy elevadas y cuya práctica totalidad de aislados resistentes a eritromicina son portadores del gen *erm* en nuestro estudio.

4.2. Levofloxacin.

A diferencia de los macrólidos cuyos mecanismos de resistencia más importantes se basan en la adquisición de material genético, en el caso de la resistencia a quinolonas los principales mecanismos de resistencia son las mutaciones en las llamadas regiones determinantes de resistencia a fluoroquinolonas (QRDRs): la ADN topoisomerasa IV (codificada por los genes *ParC* y *ParE*) y la ADN girasa (codificada por los genes *GyrA* y *GyrB*). Estas mutaciones pueden darse de forma combinada o por separado. La resistencia de bajo nivel a levofloxacin (CMI 4-16 mg/L) se debe a mutaciones puntuales en las QRDRs de una de las dos subunidades de la topoisomerasa IV: *ParC* (Ser79, Asp83 o Lys137) y *ParE* (Asp435 o Ile460). Mientras que la

resistencia de alto nivel (CMI ≥ 32 mg/L) se debe a mutaciones en las dos QRDRs: topoisomerasa IV (*ParC*) y ADN girasa, *GyrA* (Ser81 y Glu85)²¹³²¹⁴.

La mutación más frecuentemente descrita para *GyrA* es la S81F con sustitución de serina por fenilalanina. En *ParC* hay descritas más mutaciones con relevancia clínica, por un lado, la mutación S79F consiste en la sustitución del triplete TCT por TTT lo que provoca el cambio del aminoácido serina (S) por fenilalanina (F), mientras que la mutación S79Y consiste en la sustitución del triplete TCT por TAT, lo que ocasiona el cambio de serina (S) por tirosina (Y). Otra mutación en *ParC* es la K137N, con sustitución de una lisina por una asparagina. En *ParE* destacan la V460I, con sustitución de valina (V) por isoleucina (I), y D435N, con sustitución de aspartato (D) por asparagina (N). En *GyrB* las mutaciones descritas por el momento muestran escasa o ninguna repercusión en *S. pneumoniae*.

En nuestro estudio, de los 1529 aislados obtenidos desde 2012 en los que se estudió la sensibilidad a levofloxacino, en tan solo 36 (2,3%) la CMI a levofloxacino fue mayor de 2 mg/L, revelando la baja tasa de resistencia al mismo. En estos 36 aislados se procedió a la detección de los genes como paso previo a su secuenciación para detectar las posibles mutaciones. Ante las dificultades que tuvimos con la detección del gen *gyrA* y posterior secuenciación de este gen por la técnica de Sanger se realizó el estudio de estas cepas por las técnicas NGS (Figuras 56 y 57).

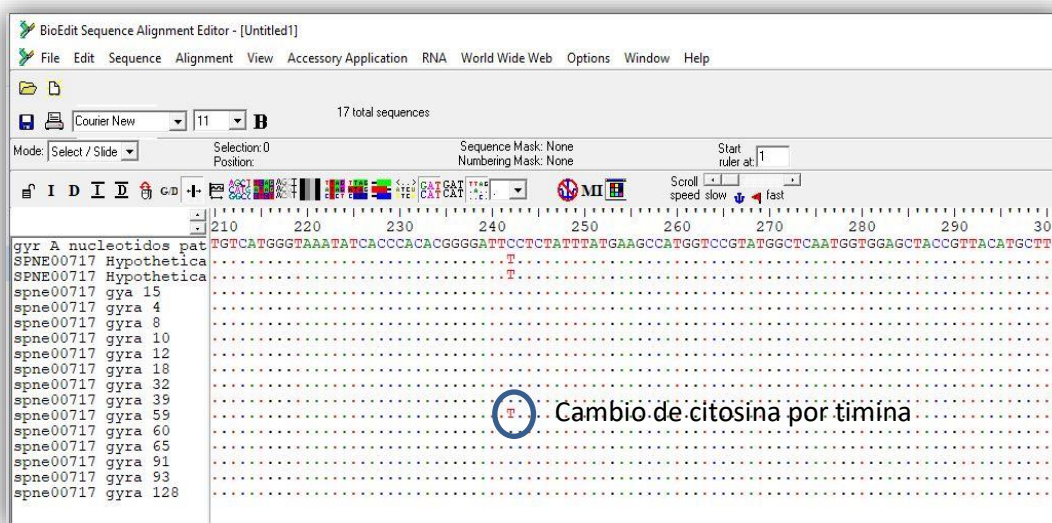


Figura 56. Detección de mutación en gen *gyrA* de *S. pneumoniae* por técnica NGS.

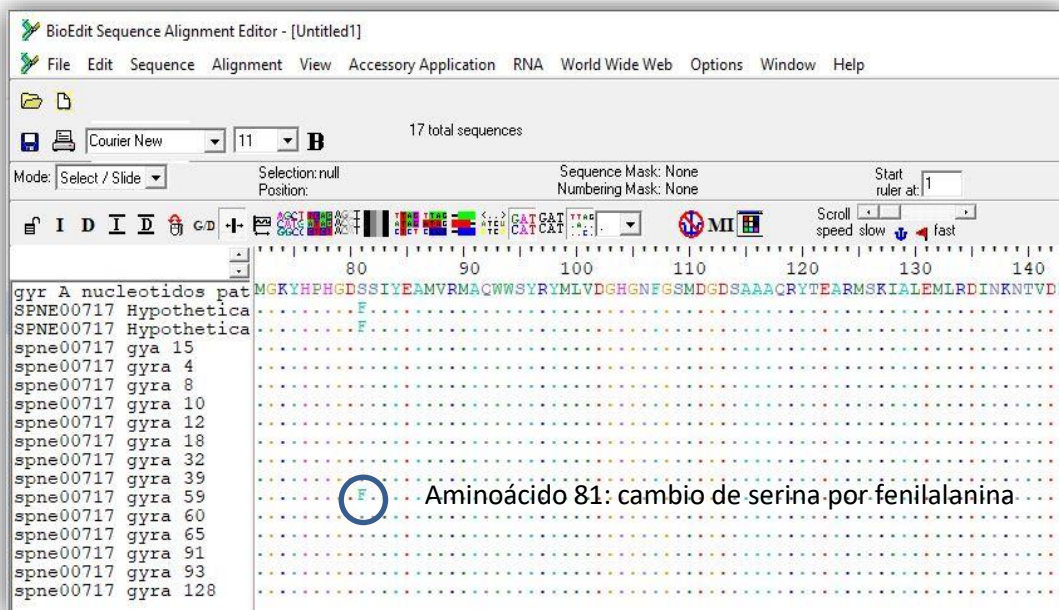


Figura 57. Detección del cambio de aminoácido tras la mutación en gen *gyrA* de *S. pneumoniae*: mutación S81F.

En 16 (44,4%) de los 36 aislados resistentes a levofloxacino fue detectada algún tipo de mutación, siendo las más frecuentes las del gen *ParC*, de hecho, en todas las 16 fue detectada al menos una mutación en el gen *ParC*. La mutación más habitual en este gen fue la S79F (en trece de los dieciséis aislados resistentes), seguida por la K137N (en cinco aislados); además en 3 aislados se detectaron ambas mutaciones; La mutación S79Y fue la menos frecuente (un aislado).

El *GyrA* fue el segundo gen con más mutaciones detectadas (cinco casos), todos ellos también con alguna mutación en *ParC*. Por último, en el gen *ParE*, fueron detectadas dos mutaciones, cada una con un aislado, D435N y V460I, pero siempre junto a mutaciones en *ParC* y *GyrA*, (Tabla 22).

Tabla 22. Mutaciones detectadas en aislados de *S. pneumoniae* resistentes a levofloxacin.

SEROTIPO	CMI (mg/L)	<i>GyrA</i>	<i>ParC</i>	<i>ParC</i>	<i>ParE</i>
3	>32		S79F		
3	>32		S79F		
3	>32		S79Y		
3	>32		S79F		
3	>32		S79F		
9A/V	>32	S81F	S79F		D435N
9N	3			K137N	
9N	4			K137N	
11A	8		S79F		
11B	>32		S79F	K137N	
14	24	S81F	S79F	K137N	
14	24	S81F	S79F	K137N	
15A	>32		S79F		
23F	>32	S81F	S79F		
35B	>32	S81F	S79F		V460I
AUTOAG	>32		S79F		

Por serotipos, el bajo nivel de resistencias y mutaciones detectadas dificulta el análisis. Destaca la elevada variedad de serotipos en tan escaso número de aislados resistentes, con diez serotipos distintos en los dieciséis aislados con mutaciones, siendo el serotipo 3 el más frecuente con cinco aislados, cuatro con la mutación S79F y solo uno con la mutación S79Y. Tras el serotipo 3, Destacanel serotipo 9N con dos aislados, ambos con la misma mutación (K137N), y el serotipo 14 con dos aislados también y con las mismas mutaciones (S79F y K137N) en *ParC* más la S81F en *GyrA*, siendo de los pocos aislados con tres mutaciones detectadas.

Muy diferente a los serotipos es el caso de la CMI observada en los aislados con mutaciones. En trece de ellos se obtuvieron unas CMI muy elevadas (>24 mg/L), mientras que en tres aislados la CMI fue 3-8 mg/L. En cinco aislados coincide con lo descrito en la literatura: CMI elevada si existen mutaciones que afecten a más de un gen; sin embargo, en nuestro estudio fueron detectados nueve aislados con mutación única en *ParC* (hubo un aislado con dos mutaciones en *ParC*) y CMI >32 mg/L, excepto un caso con CMI de 8 mg/L. Por último, en los dos aislados con únicamente la mutación K137N en el gen *ParC*, las CMI de levofloxacin fueron más bajas (3-4 mg/L).

En un estudio realizado en España en los años iniciales a la comercialización de la PCV7 para la generación de resistencias en *S. pneumoniae* mediante transformación, se observó que, aunque las mutaciones S79F y S79Y en *ParC* se relacionaban con resistencia a ciprofloxacino, también existían otras mutaciones relacionadas con bajo nivel de resistencia²¹⁵.

Nuestros resultados no son muy distintos de los obtenidos en otras series. En un estudio sevillano realizado en los años inmediatos a la PCV13, destacaron además del bajo nivel de resistencia a levofloxacin, un caso con mutaciones tanto en *GyrA* como en *ParC* y CMI >32 mg/L; sin embargo, fueron detectados 6 casos con la mutación S79F en los que la CMI fue baja excepto en un caso (CMI >32mg/L)²¹⁶. En este estudio evaluaron la resistencia de bajo nivel a levofloxacin utilizando norfloxacin como método de cribado.

Fuera de España, en una serie realizada en los mismos años en Taiwán, además de constatarse un discreto aumento de la resistencia a levofloxacin (1,2% en 2001 - 4,2% en 2007), 28 de 30 aislados resistentes a levofloxacin presentaron mutaciones en *ParC* y/o *GyrA*²¹⁷. La mayoría de los aislamientos con CIM de levofloxacin de 4-8 mg/L tenían cambios de aminoácidos involucrados en la resistencia, incluidas alteraciones en *ParC* o en *GyrA*, mientras que la mayoría de los aislamientos con CMI de levofloxacin de 16-64 mg/L tenían cambios en *ParC* y en *GyrA*. En general, los cambios de aminoácidos en *ParC* (S79) o *GyrA* (S81) confieren resistencia a fluoroquinolonas, mientras que los cambios de aminoácidos en *ParC* (K137) y *ParE* (I460) no. En nuestro estudio en los dos únicos aislados con la mutación *ParC* (K137) la CMI de levofloxacin fue de 3-4 mg/L.

4.3. Betalactámicos.

De los 2.017 aislados incluidos en nuestro estudio desde 2012, en 1.571 analizamos la sensibilidad a penicilina: 1.327 fueron sensibles, 67 resistentes y 177 con sensibilidad intermedia. Sin embargo, debido a los cambios de criterio para valorar la sensibilidad según el tipo de muestra en la que fue aislado *S. pneumoniae* (la gran mayoría de aislados en LCR), solo los 62 aislados con sensibilidad disminuida a penicilina (CMI $\geq 0,12$ mg/L) fueron analizados para conocer su mecanismo de resistencia. Estos aislados se sometieron a técnicas de PCR para detectar amplicones específicos utilizando cebadores de los genes *PBP 1a*, *2b* y *2x* (Figura 58) y posteriormente se aplicaron las técnicas NGS para completar los resultados (Figuras 59 y 60). Las PBP 1a fueron detectadas mediante PCR, las 2a exclusivamente por las NGS, mientras que las *2b* y *2x* por ambas técnicas.



Figura 58. PBPs de *S. pneumoniae* detectadas.



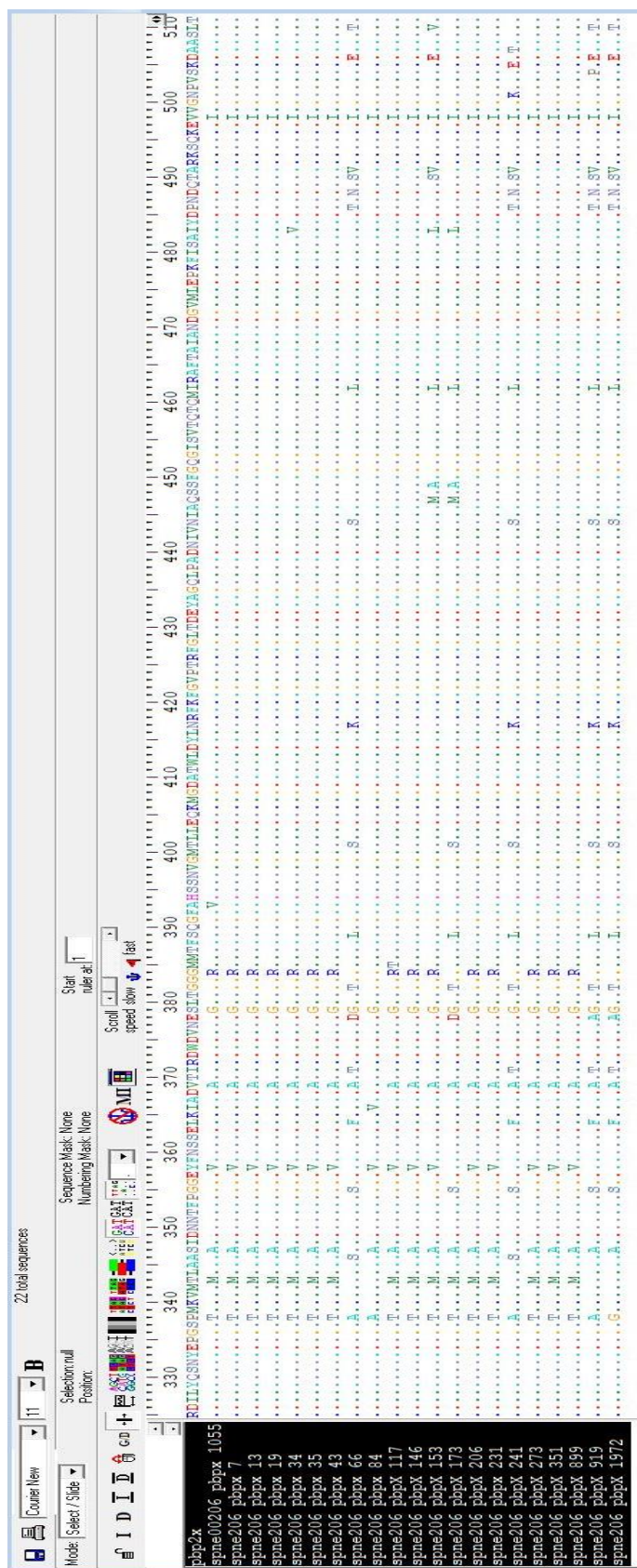


Figura 60. Detección del cambio de aminoácido generado tras la mutación en el gen *pbp2x* de *S. pneumoniae*.

De los 62 aislados estudiados, en 32 se detectó una PBP alterada, en 5 se detectaron 2 mutaciones, en 6 fueron detectadas 3 mientras que en 19 aislados no se detectaron mutaciones en las PBP (Tabla 19). El serotipo con más aislados estudiados fue el serotipo 14 (15 aislados) seguido del 19A (12 aislados). De los resultados obtenidos destaca el serotipo 14, en el cual la mutación en la PBP 1a fue detectada en 10 aislados (71,4%), mientras que en tres aislados no se detectó ningún amplicón. La mutación en PBP 1a también fue la más detectada en el serotipo 11A: cuatro aislados de siete (71,4%). Un tercer serotipo con un marcado predominio de una PBP fue el serotipo 23B, en el cual, de seis aislados estudiados en cinco se detectó mutación en la PBP 2b. En el resto de los serotipos las mutaciones detectadas en las PBP no aportaron ninguna información destacable a excepción del 19A, un serotipo que a pesar de ser el segundo con más casos estudiados (12) solo fueron detectadas mutaciones en cinco aislados, además con distintos patrones, mientras que en siete aislados no se detectaron PBP con mutaciones (Tabla 23).

Tabla 23. Serotipos de *S. pneumoniae* con mutaciones detectadas en las PBPs.

SERTIPO	PBP						ND	TOTAL
	1a	2x	2b	2a/2b	2x/2b	2a/2b/2x		
3					1	1		2
6A					1			1
6C		2						2
8							1	1
9 A/V							1	1
11A	4					2	1	7
12	1							1
14	10					2	3	15
15A	2		1	1				4
15B			1					1
19A	1	1			2	1	7	12
19F	1						2	3
23B			5				1	6
23F							1	1
24B/F			3					3
35B							2	2
TOTAL	19 (30,6%)	3 (4,8%)	10 (16,1%)	1 (1,6%)	4 (6,4%)	6 (9,6%)	19 (30,6%)	62

Si comparamos las mutaciones detectadas con las CMI de penicilina obtenidas destaca la PBP1a, en la cual, en quince de los diecinueve aislados detectados (78,9%) la CMI de penicilina fue >2 mg/L (casi todos de los serotipos 15A y, especialmente, 14) mientras que en cuatro (21,0%) la CMI osciló entre 0,12-2 mg/L. Por el contrario, en ninguno de los 24 aislados en los que se detectaron mutaciones en las otras PBP, se observó una CMI >2 mg/L. Es importante

destacar que en 11 de los 23 aislados en los que no se detectó ninguna mutación, la CMI a penicilina fue >2 mg/L, casi todos a expensas del serotipo 19A.

Las CMI de ceftriaxona también fueron elevadas, pero sin llegar al nivel de resistencia de la penicilina; de los veintiún aislados con mutación en PBP1a en sólo un aislado (serotipo 14) se obtuvo una CMI >2 mg/L, en 9 aislados la sensibilidad fue intermedia y 11 fueron sensibles (aunque con CMI más elevadas de lo habitual) (Tabla 24).

Tabla 24. Correlación entre las mutaciones de las PBPs detectadas y la CMI de penicilina y ceftriaxona.

PBP	Penicilina		Ceftriaxona		
	0,12-2 mg/L	>2 mg/L	≤0,5 mg/L	0,5-2 mg/L	>2 mg/L
1a	4	15	11	7	1
2b	10		10		
2x	3		2	1	
2b/2x	4		4		
2a/2b	1		1		
2a/2b/2x	6		6		
ND	10	9	8	5	6

En nuestro estudio, la presencia de mutaciones en 1a se asocia a tasas altas de resistencia a penicilina, así como a una elevación de las CMI a ceftriaxona (aunque la mayoría de las cepas siguen siendo sensibles), mientras que con mutaciones en las las PBP 2b y 2x no hubo ningún aislado resistente a penicilina, si bien las CMI en los aislados con 2b fueron más altas que las de los aislados con 2x. Por otra parte, solo un aislado con mutación en PBP 2x fue ceftriaxona-intermedia. Estos resultados concuerdan con otros estudios que demuestran que las mutaciones en el genoma de la PBP 2x conducen a un bajo nivel de resistencia a la penicilina, mientras que una alta resistencia a la penicilina requiere alteraciones genéticas tanto en la PBP 1a como en la 2b^{218,219}.

Estudios en otros países muestran resultados similares. Un estudio realizado en Japón en el año 2000 (antes de las vacunas conjugadas), destaca la correlación entre PBP2b con mayores tasas de resistencia a penicilina y de PBP2x con incrementos de la CMI de cefotaxima²²⁰. En otro estudio en Brasil en 2006, se observó que la presencia de PBP 1a o PBP 2b se asociaba a un número significativamente mayor de aislados con alta resistencia a penicilina²¹⁷. Otro estudio japonés más reciente remarca la importancia del fenómeno de reemplazo con

serotipos en aumento (como 15A, 23A y 35B) y la importancia añadida de ser serotipos con tasas altas de resistencia a penicilina y CMI elevadas de ceftriaxona; destacando el serotipo 15A con un 79,2% de los aislados con alteración en 3 PBP (1a, 2b y 2x) o el serotipo 35B con un 75,4% de aislados también con las 3PBP²¹⁸.

V CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

1. El estudio realizado ha permitido comprobar la existencia de hasta 69 serotipos circulantes en la Comunitat Valenciana.
2. A pesar de la introducción de las vacunas conjugadas (PCV7 y PCV13), no se ha observado un descenso global de la incidencia de ENI en nuestro entorno. Sin embargo, en la población pediátrica, objetivo principal de la inmunización con las vacunas conjugadas, el descenso de la incidencia es muy importante en todos los años del estudio.
3. La administración de las vacunas conjugadas ha sido determinante en la modificación de la prevalencia de los serotipos a lo largo de los años siendo muy eficaces en la disminución de todos los serotipos incluidos en la vacuna excepto el serotipo 3.
4. Después de la introducción de las vacunas conjugadas se observa un fenómeno de reemplazo por serotipos anteriormente infrecuentes. Actualmente el serotipo 8 es el más aislado en nuestro entorno.
5. Las vacunas conjugadas, hasta la fecha, no han modificado la incidencia de meningitis neumocócica en el período estudiado. Los serotipos 23B y 35B presentan especial tropismo por el sistema nervioso central.
6. Eritromicina es el antibiótico que presenta la menor tasa de sensibilidad, siendo la adquisición del gen *erm* el mecanismo de resistencia más frecuentemente observado.
7. Levofloxacino es el antibiótico con la tasa más elevada de sensibilidad. El mecanismo más frecuente de resistencia es la presencia simultánea de mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*, siendo esta última la más observada en nuestro estudio.
8. Se observa un aumento de la sensibilidad a penicilina y ceftriaxona a lo largo del estudio debido a la reducción de los serotipos 14 y 19A por las vacunas conjugadas. En nuestro estudio la presencia de mutaciones en el gen de la *pbp1a* se asocia a tasas altas de resistencia a penicilina y elevación de la CMI de ceftriaxona.

VI BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA.

1. Pasteur. Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Bull Acad Med.* 1881;10:94-103.
2. Sternberg G. A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human saliva. An experimental research. *National Board of Health.* 1881;2:781-783.
3. Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA. Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol.* 1980;30(1):225-420.
4. Wahl B, O'Brien KL, Greenbaum A, et al. Burden of *Streptococcus pneumoniae* and Haemophilus influenzae type b disease in children in the era of conjugate vaccines: global, regional, and national estimates for 2000–15. *Lancet Glob Health.* 2018;6(7):e744-e757. doi:10.1016/S2214-109X(18)30247-X
5. Klemperer, G, Klemperer F. Versuche tiber Immunisirung und Heilung bei der Pneumokokkeninfection. *Berliner Klinische Wochenschrift.* 1891;28:833-835, 869-875.
6. Heidelberger M, Avery OT. The soluble specific substance of Pneumococcus. *Jour Exper Med.* 1924;40:301-316.
7. Griffith F. Classics in infectious diseases: The significance of pneumococcal types. *Rev Infect Dis.* 1981;3(2):372-395. doi:10.1093/clinids/3.2.372
8. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med.* 1944; 79 (2): 137–158.
9. Butterfield, EE; Peabody F. The action of pneumococcus on blood. Published online 1913:587-592.
10. Barnard JP, Stinson MW. The alpha-hemolysin of *Streptococcus gordonii* is hydrogen peroxide. *Infect Immun.* 1996;64(9):3853-3857.
11. Neufeld F. Ueber eine spezifische bakteriolystische wirkung der galle. *Z Hyg Inf.* 1900;34:454-464.
12. Morales M, García P, De La Campa AG, Liñares J, Ardanuy C, García E. Evidence of localized prophage-host recombination in the *lytA* gene, encoding the major pneumococcal autolysin. *J Bacteriol.* 2010;192(10):2624-2632. doi:10.1128/JB.01501-09
13. Lund, R; Henrichsen J. No TiLaboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. tle. In: *Methods in Microbiology.* ; 1978:241-262.
14. Fenoll, A; Muñoz, R; Garcia, E; de la Campa A. Molecular basis of the optochin-sensitive phenotype of pneumococcus: caracterizacion of the genes encoding the F0 complex of

- the *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis* H⁺ -ATPases. *Mol Microbiol.* 1994;12:587-598.
15. Balsalobre L, Hernández-Madrid A, Llull D, et al. Molecular characterization of disease-associated streptococci of the mitis group that are optochin susceptible. *J Clin Microbiol.* 2006;44(11):4163-4171. doi:10.1128/JCM.01137-06
 16. Torres A, Cillóniz C, Blasi F, et al. Burden of pneumococcal community-acquired pneumonia in adults across Europe: A literature review. *Respir Med.* 2018;137(February):6-13. doi:10.1016/j.rmed.2018.02.007
 17. Parsons, HK; Dockrell D. The burden of invasive pneumococcal Disease and the potential for reduction by immunisation. *Int J Antimicrob Agents.* 2002;19(2):85-93.
 18. Mufson MA, Hao JB, Stanek RJ, Norton NB. Clinical features of patients with recurrent invasive *Streptococcus pneumoniae* disease. *American Journal of the Medical Sciences.* 2012;343(4):303-309. doi:10.1097/MAJ.0b013e31822d9860
 19. Lingappa JR, Dumitrescu L, Zimmer SM, et al. Identifying host genetic risk factors in the context of public health surveillance for invasive pneumococcal disease. *PLoS One.* 2011;6(8). doi:10.1371/journal.pone.0023413
 20. Short, KR; Habets, MN; Hermans, PWM; Diavatopoulus D. Interactions between *Streptococcus pneumoniae* and influenza virus: a mutually beneficial relationship? *Future Microbiol.* 2012;7:609-624.
 21. Siemieniuk RAC, Gregson DB, Gill MJ. The persisting burden of invasive pneumococcal disease in HIV patients: An observational cohort study. *BMC Infect Dis.* 2011;11(1):314. doi:10.1186/1471-2334-11-314
 22. Wong A, Marrie TJ, Garg S, Kellner JD, Tyrrell GJ. Increased risk of invasive pneumococcal disease in haematological and solid-organ malignancies. *Epidemiol Infect.* 2010;138(12):1804-1810. doi:10.1017/S0950268810000919
 23. del Pozo JL. Update and actual trends on bacterial infections following liver transplantation. *World J Gastroenterol.* 2008;14(32):4977-4983. doi:10.3748/wjg.14.4977
 24. Pekka Nuorti, J; Butler, JC; Farley, MM; Harrison, LH; McGeer, A; Kolczak M et al. Cigarette Smoking and Invasive Pneumococcal Disease. *The New England of Journal Medicine.* 2000;342:681-689.
 25. Bhatti M, Pruett SB, Swiatlo E, Nanduri B. Alcohol abuse and *Streptococcus pneumoniae* infections: Consideration of virulence factors and impaired immune responses. *Alcohol.* 2011;45(6):523-539. doi:10.1016/j.alcohol.2011.02.305
 26. Ram S, Lewis LA, Rice PA. Infections of people with complement deficiencies and patients who have undergone splenectomy. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(4):740-780. doi:10.1128/CMR.00048-09

27. Picard C, Casanova JL, Puel A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or IkB α deficiency. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(3):490-497. doi:10.1128/CMR.00001-11
28. John E. Bennett, Raphael Dolin and MJB. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 9 edition.; 2019.
29. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. *Streptococcus* Adherence and Colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2009;73(3):407-450. doi:10.1128/mmbr.00014-09
30. Moschioni M, Pansegrau W, Barocchi MA. Adhesion determinants of the *Streptococcus* species. *Microb Biotechnol.* 2010;3(4):370-388. doi:10.1111/j.1751-7915.2009.00138.x
31. Gámez, G; Hammerschmidt S. Combat Pneumococcal Infections: Adhesins as Candidates for Protein- Based Vaccine Development. *Curr Drug Targets.* 2012;13(3):323-337.
32. Pérez-Dorado I, Galan-Bartual S, Hermoso JA. Pneumococcal surface proteins: When the whole is greater than the sum of its parts. *Mol Oral Microbiol.* 2012;27(4):221-245. doi:10.1111/j.2041-1014.2012.00655.x
33. Hyams C, Camberlein E, Cohen JM, Bax K, Brown JS. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infect Immun.* 2010;78(2):704-715. doi:10.1128/IAI.00881-09
34. Neufeld F. Ueber die Agglutination der Pneumokokken und über die Theorieen der Agglutination. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten.* 1902;40(1):54-72. doi:10.1007/BF02140530
35. Geno KA, Gilbert GL, Song JY, et al. Pneumococcal capsules and their types: Past, present, and future. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):871-899. doi:10.1128/CMR.00024-15
36. Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 1995;33(10):2759-2762.
37. Vammen B. Serological Variants of Pneumococcus Types 9 and 10. *The Journal of Immunology.* 1939;37:359-365.
38. Henderson B, Martin A. Bacterial virulence in the moonlight: Multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. *Infect Immun.* 2011;79(9):3476-3491. doi:10.1128/IAI.00179-11
39. Sánchez-Puelles JM, Ronda C, García JL, García P, López R, García E. Searching for autolysin functions: Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. *Eur J Biochem.* 1986;158(2):289-293. doi:10.1111/j.1432-1033.1986.tb09749.x

40. García P, González MP, García E, García JL, López R. The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Mol Microbiol.* 1999;33(1):128-138. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01455.x
41. Berry AM, Paton JC. Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect Immun.* 2000;68(1):133-140. doi:10.1128/IAI.68.1.133-140.2000
42. López R, García E. Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol Rev.* 2004;28(5):553-580. doi:10.1016/j.femsre.2004.05.002
43. Hirst RA, Gosai B, Rutman A, et al. *Streptococcus pneumoniae* Deficient in Pneumolysin or Autolysin Has Reduced Virulence in Meningitis. *J Infect Dis.* 2008;197(5):744-751. doi:10.1086/527322
44. Davis KM, Weiser JN. Modifications to the peptidoglycan backbone help bacteria to establish infection. *Infect Immun.* 2011;79(2):562-570. doi:10.1128/IAI.00651-10
45. Martner A, Skovbjerg S, Paton JC, Wold AE. *Streptococcus pneumoniae* autolysis prevents phagocytosis and production of phagocyte-activating cytokines. *Infect Immun.* 2009;77(9):3826-3837. doi:10.1128/IAI.00290-09
46. Rodríguez-Cerrato V, García P, Huelves L, et al. Pneumococcal LytA autolysin, a potent therapeutic agent in experimental peritonitis-sepsis caused by highly β -lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(9):3371-3373. doi:10.1128/AAC.00137-07
47. Domenech M, García E, Moscoso M. In vitro destruction of *Streptococcus pneumoniae* biofilms with bacterial and phage peptidoglycan hydrolases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(9):4144-4148. doi:10.1128/AAC.00492-11
48. Berry AM, Lock RA, Hansman D, Paton JC. Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1989;57(8):2324-2330.
49. Wei H, Håvarstein LS. Fratricide is essential for efficient gene transfer between pneumococci in biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(16):5897-5905. doi:10.1128/AEM.01343-12
50. De Las Rivas B, García L, Lo R, García P. Purification and Polar Localization of Pneumococcal LytB , a Putative Murein Hydrolase. *Society.* 2002;184(18):4988-5000. doi:10.1128/JB.184.18.4988
51. Gosink KK, Mann ER, Guglielmo C, Tuomanen EI, Masure HR. Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 2000;68(10):5690-5695. doi:10.1128/IAI.68.10.5690-5695.2000

52. Domenech M, García E, Prieto A, Moscoso M. Insight into the composition of the intercellular matrix of *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *Environ Microbiol.* 2013;15(2):502-516. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02853.x
53. Briles DE, Hollingshead SK, Swiatlo E, et al. PspA and PspC: Their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microbial Drug Resistance.* 1997;3(4):401-408. doi:10.1089/mdr.1997.3.401
54. Rosenow C, Ryan P, Weiser JN, et al. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 1997;25(5):819-829. doi:10.1111/j.1365-2958.1997.mmi494.x
55. Lu L, Ma Y, Zhang JR. *Streptococcus pneumoniae* recruits complement factor H through the amino terminus of CbpA. *Journal of Biological Chemistry.* 2006;281(22):15464-15474. doi:10.1074/jbc.M602404200
56. Hammerschmidt S, Agarwal V, Kunert A, Haelbich S, Skerka C, Zipfel PF. The Host Immune Regulator Factor H Interacts via Two Contact Sites with the PspC Protein of *Streptococcus pneumoniae* and Mediates Adhesion to Host Epithelial Cells . *The Journal of Immunology.* 2007;178(9):5848-5858. doi:10.4049/jimmunol.178.9.5848
57. Dieudonné-Vatran A, Krentz S, Blom AM, et al. Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae* Bind the Complement Inhibitor C4b-Binding Protein in a PspC Allele-Dependent Fashion. *The Journal of Immunology.* 2009;182(12):7865-7877. doi:10.4049/jimmunol.0802376
58. Andre GO, Converso TR, Politano WR, et al. Role of *Streptococcus Pneumoniae* proteins in evasion of complement-mediated immunity. *Front Microbiol.* 2017;8(FEB):1-20. doi:10.3389/fmicb.2017.00224
59. McDaniel, Larry S; Yother, Janet; Vijayakumar LM, Guild WR, Briles DE. Use of insertional inactivation to facilitate studies of biological properties of pneumococcal surface protein A (PspA). 1987;165(February):381-393.
60. Jedrzejewski MJ. Unveiling molecular mechanisms of pneumococcal surface protein A interactions with antibodies and lactoferrin. *Clinica Chimica Acta.* 2006;367(1-2):1-10. doi:10.1016/j.cca.2005.09.026
61. Hermoso JA, Lagartera L, González A, et al. Insights into pneumococcal pathogenesis from the crystal structure of the modular teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12(6):533-538. doi:10.1038/nsmb940
62. Sánchez-Beato AR, López R, García JL. Molecular characterization of PcpA: A novel choline-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett.* 1998;164(1):207-214. doi:10.1016/S0378-1097(98)00206-7
63. Glover DT, Hollingshead SK, Briles DE. *Streptococcus pneumoniae* surface protein PcpA elicits protection against lung infection and fatal sepsis. *Infect Immun.* 2008;76(6):2767-2776. doi:10.1128/IAI.01126-07

64. Khan MN, Sharma SK, Filkins LM, Pichichero ME. PcpA of *Streptococcus pneumoniae* mediates adherence to nasopharyngeal and lung epithelial cells and elicits functional antibodies in humans. *Microbes Infect.* 2012;14(12):1102-1110. doi:10.1016/j.micinf.2012.06.007
65. Selva L, Ciruela P, Blanchette K, et al. Prevalence and clonal distribution of pcpA, psrP and pilus-1 among pediatric isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One.* 2012;7(7). doi:10.1371/journal.pone.0041587
66. Löfling J, Vimberg V, Battig P, Henriques-Normark B. Cellular interactions by LPxTG-anchored pneumococcal adhesins and their streptococcal homologues. *Cell Microbiol.* 2011;13(2):186-197. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01560.x
67. Garbe J, Collin M. Bacterial hydrolysis of host glycoproteins - Powerful protein modification and efficient nutrient acquisition. *J Innate Immun.* 2012;4(2):121-131. doi:10.1159/000334775
68. Babu MM, Priya ML, Selvan AT, et al. A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins. *J Bacteriol.* 2006;188(8):2761-2773. doi:10.1128/JB.188.8.2761-2773.2006
69. Henriques-Normark B, Normark S. Commensal pathogens, with a focus on *Streptococcus pneumoniae*, and interactions with the human host. *Exp Cell Res.* 2010;316(8):1408-1414. doi:10.1016/j.yexcr.2010.03.003
70. Hammerschmidt S. Special Issue on 'Microbe-host interactions.' *FEBS Lett.* 2016;590(21):3703-3704. doi:10.1002/1873-3468.12466
71. Weinberger DM, Harboe ZB, Sanders EAM, et al. Association of Serotype with Risk of Death Due to Pneumococcal Pneumonia: A Meta-Analysis. *Clinical Infectious Diseases.* 2010;51(6):692-699. doi:10.1086/655828
72. Henriques B, Kalin M, Örtqvist Å, et al. Molecular Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* Causing Invasive Disease in 5 Countries. *J Infect Dis.* 2000;182(3):833-839. doi:10.1086/315761
73. Korona-Glowniak I, Maj M, Siwiec R, Niedzielski A, Malm A. Molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with recurrent upper respiratory tract infections. *PLoS One.* 2016;11(7):1-16. doi:10.1371/journal.pone.0158909
74. Wang XY, Kilgore PE, Lim KA, et al. Influenza and bacterial pathogen coinfections in the 20th century. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2011;2011(May):0-6. doi:10.1155/2011/146376
75. Brouwer MC, de Gans J, Heckenberg SG, Zwinderman AH, van der Poll T, van de Beek D. Host genetic susceptibility to pneumococcal and meningococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2009;9(1):31-44. doi:10.1016/S1473-3099(08)70261-5

76. Simell B, Auranen K, Käyhty H, Goldblatt D, Dagan R, O'Brien KL. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Rev Vaccines*. 2012;11(7):841-855. doi:10.1586/erv.12.53
77. Malfroot A, Verhaegen J, Dubru JM, Van Kerschaver E, Leyman S. A cross-sectional survey of the prevalence of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in Belgian infants attending day care centres. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004;10(9):797-803. doi:10.1111/j.1198-743X.2004.00926.x
78. Austrian R. Some aspects of the pneumococcal carrier state. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1986;18(Supplement_A):35-45. doi:10.1093/jac/18.supplement_a.35
79. Musher DM. Infectious disease caused by *Streptococcus pneumoniae*: Clinical Spectrum, Immunity and Treatment. *Clin Infect Dis*. 1992;14:801-809.
80. Yother J. Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and Other Bacteria: Paradigms for Polysaccharide Biosynthesis and Regulation . *Annu Rev Microbiol*. 2011;65(1):563-581. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162944
81. King SJ, Hippe KR, Weiser JN. Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*. 2006;59(3):961-974. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04984.x
82. Holmes AR, McNab R, Millsap KW, et al. The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol Microbiol*. 2001;41(6):1395-1408. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02610.x
83. Amerighi F, Valeri M, Donnarumma D, et al. Identification of a monoclonal antibody against pneumococcal pilus 1 ancillary protein impairing bacterial adhesion to human epithelial cells. *Journal of Infectious Diseases*. 2016;213(4):516-522. doi:10.1093/infdis/jiv461
84. Barocchi MA, Ries J, Zogaj X, et al. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(8):2857-2862. doi:10.1073/pnas.0511017103
85. McCullers JA. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(4):252-262. doi:10.1038/nrmicro3231
86. Subramanian K, Henriques-Normark B, Normark S. Emerging concepts in the pathogenesis of the *Streptococcus pneumoniae*: From nasopharyngeal colonizer to intracellular pathogen . *Cell Microbiol*. Published online 2019. doi:10.1111/cmi.13077
87. McCullers JA, Tuomanen EI. Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. Published online 2001:877-889.
88. Thornton JA, Tuomanen EI. Pneumococcal pathogenesis: "innate invasion" yet organspecific damage. 2011;88(2):103-107. doi:10.1007/s00109-009-0578-5.Pneumococcal

89. Grigg J. The platelet activating factor receptor: A new anti-infective target in respiratory disease? *Thorax*. 2012;67(9):840-841. doi:10.1136/thoraxjnl-2012-202206
90. Yokota SI, Okabayashi T, Yoto Y, Hori T, Tsutsumi H, Fujii N. Fosfomycin suppresses RS-virus-induced *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* adhesion to respiratory epithelial cells via the platelet-activating factor receptor. *FEMS Microbiol Lett*. 2010;310(1):84-90. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02049.x
91. Kaetzel CS. The polymeric immunoglobulin receptor: Bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol Rev*. 2005;206:83-99. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00278.x
92. Asano M, Komiyama K. Polymeric immunoglobulin receptor. *J Oral Sci*. 2011;53(2):147-156. doi:10.2334/josnurd.53.147
93. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci*. 2008;121(13):2115-2122. doi:10.1242/jcs.017897
94. Mold C, Rodic-Polic B, Du Clos TW. Protection from *Streptococcus pneumoniae* Infection by C-Reactive Protein and Natural Antibody Requires Complement But Not Fcγ Receptors. *The Journal of Immunology*. 2002;168(12):6375-6381. doi:10.4049/jimmunol.168.12.6375
95. Conigliaro P. Complement, infection and autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol*. 2019;31(5):532-541.
96. Brown JS, Hussell T, Gilliland SM, et al. The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(26):16969-16974. doi:10.1073/pnas.012669199
97. Yuste J, Sen A, Truedsson L, et al. Impaired opsonization with C3b and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* in sera from subjects with defects in the classical complement pathway. *Infect Immun*. 2008;76(8):3761-3770. doi:10.1128/IAI.00291-08
98. Eisen DP. Mannose-binding lectin deficiency and respiratory tract infection. *J Innate Immun*. 2010;2(2):114-122. doi:10.1159/000228159
99. Kjaer TR, Hansen AG, Sørensen UBS, et al. M-ficolin binds selectively to the capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* serotypes 19b and 19c and of a streptococcus mitis strain. *Infect Immun*. 2013;81(2):452-459. doi:10.1128/IAI.01148-12
100. Garnacho-Montero J, García-Cabrera E, Jiménez-Álvarez R, et al. Genetic variants of the MBL2 gene are associated with mortality in pneumococcal sepsis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;73(1):39-44. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.02.002

101. García-Laorden MI, Rodríguez De Castro F, Solé-Violán J, et al. The role of mannose-binding lectin in pneumococcal infection. *European Respiratory Journal*. 2013;41(1):131-139. doi:10.1183/09031936.00174111
102. Agarwal V, Asmat TM, Luo S, Jensch I, Zipfel PF, Hammerschmidt S. Complement regulator factor H mediates a two-step uptake of *Streptococcus pneumoniae* by human cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(30):23486-23495. doi:10.1074/jbc.M110.142703
103. Cathryn S. Angel, Melanie Ruzek MKH. Degradation Of C3 By *Streptococcus Pneumoniae*. *J Infect Dis*. 1994;170(3):600-608.
104. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010;11(5):373-384. doi:10.1038/ni.1863
105. Kersse K, Bertrand MJM, Lamkanfi M, Vandenabeele P. NOD-like receptors and the innate immune system: Coping with danger, damage and death. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011;22(5-6):257-276. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.09.003
106. Koppe U, Suttorp N, Opitz B. Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cell Microbiol*. 2012;14(4):460-466. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01746.x
107. Ribes S, Ebert S, Regen T, et al. Toll-like receptor stimulation enhances phagocytosis and intracellular killing of nonencapsulated and encapsulated *Streptococcus pneumoniae* by murine microglia. *Infect Immun*. 2010;78(2):865-871. doi:10.1128/IAI.01110-09
108. Sanders MS, Van Well GTJ, Ouburg S, Lundberg PSJ, Van Furth AM, Morré SA. Single nucleotide polymorphisms in TLR9 are highly associated with susceptibility to bacterial meningitis in children. *Clinical Infectious Diseases*. 2011;52(4):475-480. doi:10.1093/cid/ciq155
109. Davis Kimberly M; Nakamura, Shigeki; Weiser JN. Nod2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of *S. pneumoniae* colonization in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(9):3666-3676.
110. Li, J., Wang, J., Jiao, F. and Zhang J. Observation of Pneumococcal Phase Variation in Colony Morphology. *Bio Protoc*. 2017;7(15):2434. doi:10.21769/BioProtoc.2434
111. Le Monnier A, Carbonnelle E, Zahar JR, et al. Microbiological Diagnosis of Empyema in Children: Comparative Evaluations by Culture, Polymerase Chain Reaction, and Pneumococcal Antigen Detection in Pleural Fluids. *Clinical Infectious Diseases*. 2006;42(8):1135-1140. doi:10.1086/502680
112. Andreo F, Ruiz-Manzano J, Prat C, et al. Utility of pneumococcal urinary antigen detection in diagnosing exacerbations in COPD patients. *Respir Med*. 2010;104(3):397-403. doi:10.1016/j.rmed.2009.10.013

113. Suzuki N, Yuyama M, Maeda S, Ogawa H, Mashiko K, Kiyoura Y. Genotypic identification of presumptive *Streptococcus pneumoniae* by PCR using four genes highly specific for *S. pneumoniae*. *J Med Microbiol*. 2006;55(6):709-714. doi:10.1099/jmm.0.46296-0
114. Tarragó D, Fenoll A, Sánchez-Tatay D, et al. Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008;14(9):828-834. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02028.x
115. Tomita Y, Okamoto A, Yamada K, Yagi T, Hasegawa Y, Ohta M. A New microarray system to detect *Streptococcus pneumoniae* serotypes. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011. doi:10.1155/2011/352736
116. Ikryannikova LN, Lapin KN, Malakhova MV, Filimonova AV, Ilna EN, Dubovickaya VA, Sidorenko SV GVM. Misidentification of alpha-hemolytic streptococci by routine tests in clinical practice. *Infect Genet Evol*. 2011;11(7):1709-1715.
117. Massire C, Gertz RE, Svoboda P, et al. Concurrent serotyping and genotyping of pneumococci by use of PCR and electrospray ionization mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2012;50(6):2018-2025. doi:10.1128/JCM.06735-11
118. Wright AE, Parry Morgan W, Colebrook L, Dodgson RW. Observations on prophylactic inoculation against pneumococcus infections, and on the results which have been achieved by it. *The Lancet*. 1914;183(4714):1-10. doi:10.1016/S0140-6736(01)56370-9
119. Cecil, Russell L; Austin JH. Results of prophylactic inoculation against pneumococcus in 12,519 men. *Journal of Experimental Medicine*. 1918;(1):19-41.
120. Heidelberger, M; Avery O. The Soluble Specific Substance Of Pneumococcus. *Journal of Experimental Medicine*. 1923;38(1):73-79.
121. Avery OT, Goebel WF. Chemoimmunological studies on the soluble specific substance of pneumococcus: I. the isolation and properties of the acetyl polysaccharide of pneumococcus type i. *Journal of Experimental Medicine*. 1933;58(6):731-755. doi:10.1084/jem.58.6.731
122. Macleod BYCM, Hodges RG, Heidelberger M, Bernhard AWG. Prevention of Pneumococcal Pneumonia by Immunization with Specific Capsular Polysaccharides. Published online 1945.
123. Austrian, R; Gold J. Pneumococcal Bacteremia With Especial Reference To Bacteremic Pneumococcal Pneumonia. *Ann Intern Med*. 1964;60:759-776. doi:10.7326/0003-4819-60-5-759
124. Austrian R. Prevention of Pneumococcal Infection by Immunization with Capsular Polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*: Current Status of Polyvalent Vaccines. *Journal of Infectious Diseases*. 1977;136(Supplement 1):S38-S42. doi:10.1093/infdis/136.supplement.s38

125. Pomat WS, Lehmann D, Sanders RC, et al. Immunoglobulin G antibody responses to polyvalent pneumococcal vaccine in children in the highlands of Papua New Guinea. *Infect Immun*. 1994;62(5):1848-1853.
126. de Roux A, Schmöele-Thoma B, Siber GR, et al. Comparison of Pneumococcal Conjugate Polysaccharide and Free Polysaccharide Vaccines in Elderly Adults: Conjugate Vaccine Elicits Improved Antibacterial Immune Responses and Immunological Memory. *Clinical Infectious Diseases*. 2008;46(7):1015-1023. doi:10.1086/529142
127. 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(2):359-366. doi:10.1016/j.vaccine.2014.11.011
128. Lesinski, G.B.; Julie Westerink MA. Vaccines Against Polysaccharide Antigens. *Current Drug Targets-Infectious disorders*. 2001;1:325-340.
129. Fletcher MA, Fritzell B. Brief review of the clinical effectiveness of PREVENAR® against otitis media. *Vaccine*. 2007;25(13):2507-2512. doi:10.1016/j.vaccine.2006.09.027
130. Fenoll A, Granizo JJ, Aguilar L, et al. Temporal trends of invasive streptococcus pneumoniae serotypes and antimicrobial resistance patterns in Spain from 1979 to 2007. *J Clin Microbiol*. 2009;47(4):1012-1020. doi:10.1128/JCM.01454-08
131. Reinert R, Jacobs MR, Kaplan SL. Pneumococcal disease caused by serotype 19A: Review of the literature and implications for future vaccine development. *Vaccine*. 2010;28(26):4249-4259. doi:10.1016/j.vaccine.2010.04.020
132. 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. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2009;16(3):376-381. doi:10.1128/CVI.00344-08
133. Nahm MH, Lin J, Finkelstein JA, Pelton SI. Increase in the Prevalence of the Newly Discovered Pneumococcal Serotype 6C in the Nasopharynx after Introduction of Pneumococcal Conjugate Vaccine. *J Infect Dis*. 2009;199(3):320-325. doi:10.1086/596064
134. Lebon A, Verkaik NJ, Labout JAM, et al. Natural antibodies against several pneumococcal virulence proteins in children during the pre-pneumococcal-vaccine era: The generation R study. *Infect Immun*. 2011;79(4):1680-1687. doi:10.1128/IAI.01379-10
135. HENRY F. MOORE, M.D., B.Ch., and ALAN M. CHESNEY MD. A further study of ethylhydrocuprein (optochin) in the treatment of acute lobar pneumonia. *Archives Internal Medicine*. 1918;21:659-681.
136. Witte W. Antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: epidemiological aspects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1999;44(90001):1-9. doi:10.1093/jac/44.suppl_1.1

137. Liñares J, Ardanuy C, Pallares R, Fenoll A. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010;16(5):402-410. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03182.x
138. Croucher NJ, Løchen A, Bentley SD. Pneumococcal Vaccines: Host Interactions, Population Dynamics, and Design Principles. *Annu Rev Microbiol*. 2018;72:521-549. doi:10.1146/annurev-micro-090817-062338
139. Trzciński K, Thompson CM, Lipsitch M. Single-step capsular transformation and acquisition of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*. 2004;186(11):3447-3452. doi:10.1128/JB.186.11.3447-3452.2004
140. Croucher NJ, Chewapreecha C, Hanage WP, et al. Evidence for soft selective sweeps in the evolution of pneumococcal multidrug resistance and vaccine escape. *Genome Biol Evol*. 2014;6(7):1589-1602. doi:10.1093/gbe/evu120
141. Dewé TCM, D'aeth JC, Croucher NJ. Genomic epidemiology of penicillin-non-susceptible *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Genom*. 2019;5(10):1-8. doi:10.1099/mgen.0.000305
142. del Campo R, Cafini F, Morosini MI, et al. Combinations of PBPs and MurM protein variants in early and contemporary high-level penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006;57(5):983-986. doi:10.1093/jac/dkl083
143. Pilishvili T, Lexau C, Farley MM, et al. Sustained Reductions in Invasive Pneumococcal Disease in the Era of Conjugate Vaccine. *J Infect Dis*. 2010;201(1):32-41. doi:10.1086/648593
144. Hansman D BMM. A resistant penumococcus. *Lancet*. 1967;2:264-265.
145. Hansman D, Glasgow H, Sturt J, Devitt L, Douglas R. Increased Resistance to Penicillin of Pneumococci Isolated from Man. *New England Journal of Medicine*. 1971;284(4):175-177. doi:10.1056/NEJM197101282840403
146. Fenoll, A; Martin Bourgon, C; Muñoz, R; Vicioso, D; Casal J. Serotype distribution and antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates producing systemic infection in Spain 1979-1989. *Clinical Infectious Diseases*. 1991;13(1):56-60.
147. Cherazard R, Epstein M, Doan TL, Salim T, Bharti S, Smith MA. Antimicrobial Resistant *Streptococcus pneumoniae*: Prevalence, Mechanisms, and Clinical Implications. *Am J Ther*. 2017;24(3):e361-e369. doi:10.1097/MJT.0000000000000551
148. Leclercq R, Courvalin P. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(9):2727-2734. doi:10.1128/AAC.46.9.2727-2734.2002
149. Calatayud L, Ardanuy C, Cercenado E, et al. Serotypes, clones, and mechanisms of resistance of erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates collected in

- Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(9):3240-3246. doi:10.1128/AAC.00157-07
150. Ardanuy C, Fenoll A, Berrón S, Calatayud L, Liñares J. Increase of the M phenotype among erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Spain related to the serotype 14 variant of the Spain9V-3 clone. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(9):3162-3165. doi:10.1128/AAC.00269-06
 151. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Clinical Infectious Diseases.* 2007;44(Supplement 2):S27-S72. doi:10.1086/511159
 152. de la Campa AG, Ferrándiz MJ, Martín-Galiano AJ, García MT, Tirado-Vélez JM. The transcriptome of *Streptococcus pneumoniae* induced by local and global changes in supercoiling. *Front Microbiol.* 2017;8(JUL). doi:10.3389/fmicb.2017.01447
 153. De La Campa AG, Balsalobre L, Ardanuy C, et al. Fluoroquinolone resistance in penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* Clones, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(10):1751-1759. doi:10.3201/eid1010.040382
 154. De La Campa AG, Ardanuy C, Balsalobre L, et al. Changes in fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* after 7-valent conjugate vaccination, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(6):905-911. doi:10.3201/eid1506.080684
 155. Smith HJ; NKHDZG. Dual activity of fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae*: the facts behind the claims. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2002;49(6):893-895. doi:10.1093/jac/dkf047
 156. Zhanel GG, Walkty A, Nichol K, Smith H, Noreddin A, Hoban DJ. Molecular characterization of fluoroquinolone resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates obtained from across Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;45(1):63-67. doi:10.1016/S0732-8893(02)00498-4
 157. Davidson R, Cavalcanti R, Brunton JL, Darrin J, Bast DJ, De Acevedo Jcs et al. Resistance to Levofloxacin and Failure of Treatment of Pneumococcal Pneumonia. *The New England of Journal Medicine.* 2002;346(10):747-750.
 158. Pérez-Trallero E, Marimon JM, Iglesias L, Larruskain J. Fluoroquinolone and macrolide treatment failure in pneumococcal pneumonia and selection of multidrug-resistant isolates. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(9):1159-1162. doi:10.3201/eid0909.020810
 159. Rodríguez Díaz JC, Guna Serrano R, Larrosa Escartín N MAM. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. In: *Procedimientos En Microbiología Clínica.* 2017.
 160. Guerrero Gómez, C; Carrillo Sánchez Carlos. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. In: *Procedimientos En Microbiología Clínica.* 2003.

161. Mudany MA, Kikuchi K, Totsuka K, Uchiyama T. Evaluation of a new serotyping kit for *Streptococcus pneumoniae*. *J Med Microbiol*. 2003;52(11):975-980. doi:10.1099/jmm.0.05306-0
162. Zettler EW, Scheibe RM, Fritscher CC. Polymerase chain reaction used to detect *Streptococcus pneumoniae* resistance to penicillin *. 2004;30(February):521-527.
163. Pestova E, Beyer R, Cianciotto NP, Noskin GA, Peterson LR. Contribution of topoisomerase IV and DNA gyrase mutations in *Streptococcus pneumoniae* to resistance to novel fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(8):2000-2004. doi:10.1128/aac.43.8.2000
164. Jalal, H; Organji, S; Reynolds, J; Bennett, D; O'Mason EJMMR. Determination of penicillin susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology*. 1997;50(1):45-50. doi:10.1136/mp.50.1.45
165. Wood DE, Salzberg SL. *Kraken: Ultrafast Metagenomic Sequence Classification Using Exact Alignments*.; 2014. <http://ccb.jhu.edu/software/kraken/>.
166. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072-1075. doi:10.1093/bioinformatics/btt086
167. Eskola J, Takala A, Kela E, Pekkanen E, Kalliokoski R LM. Epidemiology of invasive pneumococcal infections in children in Finland. *JAMA*. 1992;268:3323-3327.
168. Kaltoft MS KH. Invasive pneumococcal infections in children in Denmark, 1981 to 1997. In: *Program and Abstracts of the 17th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases*. 1999:140.
169. George RC, Efstratiou A, Broughton K, Waight PA ME, DCE S. Invasive pneumococcal infection in children aged less than 6 years in England and Wales during 1995 and 1996. *J Clin Microbiol Infect*. 1997;3:130.
170. Kries R Von, Siedler A, Schmitt HJ, Reinert RR. Proportion of Invasive Pneumococcal Infections in German Children Preventable by Pneumococcal Conjugate Vaccines. *Clinical Infectious Diseases*. 2000;31(2):482-487.
171. Butler JC, Breiman RF, Lipman HB, Hofmann J FRR. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in the United States, 1978-1994: implications for development of a conjugate vaccine. *Journal of Infectious Diseases*. 1995;171(4):885-889.
172. Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Diekema DJ, Doern G V. Pneumococcal serotypes before and after introduction of conjugate vaccines, United States, 1999-2011. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(7):1074-1083. doi:10.3201/eid1907.121830
173. Hanquet G, Kissling E, Fenoll A, et al. Pneumococcal serotypes in children in 4 European countries. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(9):1428-1439. doi:10.3201/eid1609.100102

174. Jefferson T, Ferroni E, Curtale F, Giorgi Rossi P, Borgia P. *Streptococcus pneumoniae* in western Europe: serotype distribution and incidence in children less than 2 years old. *Lancet Infectious Diseases*. 2006;6(7):405-410. doi:10.1016/S1473-3099(06)70520-5
175. Robinson KA, Baughman W, Rothrock G, et al. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States, 1995-1998 opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. *J Am Med Assoc*. 2001;285(13):1729-1735. doi:10.1001/jama.285.13.1729
176. Romney MG, Hull MW, Gustafson R, et al. Large community outbreak of *Streptococcus pneumoniae* serotype 5 invasive infection in an impoverished, urban population. *Clinical Infectious Diseases*. 2008;47(6):768-774. doi:10.1086/591128
177. Porat N, Trefler R, Dagan R. Persistence of two invasive *Streptococcus pneumoniae* clones of serotypes 1 and 5 in comparison to that of multiple clones of serotypes 6B and 23F among children in Southern Israel. *J Clin Microbiol*. 2001;39(5):1827-1832. doi:10.1128/JCM.39.5.1827-1832.2001
178. Brueggemann AB, Peto TEA, Crook DW, Butler JC, Kristinsson KG, Spratt BG. Temporal and geographic stability of the serogroup-specific invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children. *Journal of Infectious Diseases*. 2004;190(7):1203-1211. doi:10.1086/423820
179. Id SW, Hillier K, Lim GH, Harris TM, Wilson SE, Deeks SL. The shifting epidemiology and serotype distribution of invasive pneumococcal disease in Ontario , Canada , 2007-2017. 2019;3:2007-2017.
180. Jung YH, Choe YJ, Lee CY, Jung SO, Lee DH, Yoo J il. Impact of national pneumococcal vaccination program on invasive pneumococcal diseases in South Korea. *Sci Rep*. 2022;12(1):15833. doi:10.1038/s41598-022-20363-9
181. Sings HL, de Wals P, Gessner BD, et al. Effectiveness of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine against Invasive Disease Caused by Serotype 3 in Children: A Systematic Review and Meta-analysis of Observational Studies. *Clinical Infectious Diseases*. 2019;68(12):2135-2143. doi:10.1093/cid/ciy920
182. Sara de Miguel, Mirian Domenech, Fernando González-Camacho, Julio Sempere, Dolores Vicioso, Juan Carlos Sanz, Luis García Comas, Carmen Ardanuy, Asunción Fenoll JY. Nationwide Trends of Invasive Pneumococcal Disease in Spain From 2009 Through 2019 in Children and Adults During the Pneumococcal Conjugate Vaccine Era. *Clinical Infectious Diseases*. Published online 2020. doi:https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1483
183. Amin-Chowdhury Z, Collins S, Sheppard C, et al. Characteristics of Invasive Pneumococcal Disease Caused by Emerging Serotypes after the Introduction of the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in England: A Prospective Observational Cohort Study, 2014-2018. *Clinical Infectious Diseases*. 2020;71(8):E235-E243. doi:10.1093/cid/ciaa043

184. Ladhani SN, Collins S, Djennad A, et al. Rapid increase in non-vaccine serotypes causing invasive pneumococcal disease in England and Wales, 2000–17: a prospective national observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(4):441-451. doi:10.1016/S1473-3099(18)30052-5
185. Moore MR, Link-Gelles R, Schaffner W, et al. Effect of use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children on invasive pneumococcal disease in children and adults in the USA: Analysis of multisite, population-based surveillance. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(3):301-309. doi:10.1016/S1473-3099(14)71081-3
186. Yildirim I, Little BA, Finkelstein J, et al. Surveillance of pneumococcal colonization and invasive pneumococcal disease reveals shift in prevalent carriage serotypes in Massachusetts' children to relatively low invasiveness. *Vaccine.* 2017;35(32):4002-4009. doi:10.1016/j.vaccine.2017.05.077
187. Golden AR, Baxter MR, Davidson RJ, et al. Comparison of antimicrobial resistance patterns in *Streptococcus pneumoniae* from respiratory and blood cultures in Canadian hospitals from 2007-16. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74:iv39-iv47. doi:10.1093/jac/dkz286
188. Park DC, Kim SH, Yong D, et al. Serotype distribution and antimicrobial resistance of invasive and noninvasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Korea between 2014 and 2016. *Ann Lab Med.* 2019;39(6):537-544. doi:10.3343/alm.2019.39.6.606
189. Olarte L, Kaplan SL, Barson WJ, et al. Invasive serotype 35B pneumococci including an expanding serotype switch lineage. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(2):405. doi:10.3201/eid2402.170982
190. Banerjee A, van Sorge NM, Sheen TR, Uchiyama S, Mitchell TJ, Doran KS. Activation of brain endothelium by pneumococcal neuraminidase NanA promotes bacterial internalization. *Cell Microbiol.* 2010;12(11):1576-1588. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01490.x
191. Prager O, Friedman A, Nebenzahl YM. Role of neural barriers in the pathogenesis and outcome of *Streptococcus pneumoniae* meningitis (Review). *Exp Ther Med.* 2017;13(3):799-809. doi:10.3892/etm.2017.4082
192. Hathaway LJ, Grandgirard D, Valente LG, Täuber MG, Leib SL. *Streptococcus pneumoniae* capsule determines disease severity in experimental pneumococcal meningitis. *Open Biol.* 2016;6(3). doi:10.1098/rsob.150269
193. Sanz JC, de Miguel S, Ordobás M, García Comas L. *Streptococcus pneumoniae* serotypes with meningeal tropism in cases of invasive pneumococcal disease. Community of Madrid, 2007-2018. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2020;38(8):371-374. doi:10.1016/j.eimc.2019.11.002
194. Smith JA, Struthers JK, Woodhead MA. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*: One hospital's experience. *Thorax.* 1996;51(SUPPL. 3):85-88.

195. Sigurdur E. Vilhelmsson, Alexander Tomasz and KGKristinsson. Molecular Evolution in a Multidrug-Resistant Lineage of *Streptococcus pneumoniae*: Emergence of Strains Belonging to the Serotype 6B Icelandic Clone That Lost Antibiotic Resistance Traits. *J Clin Microbiol.* 2000;38(4):1375-1381.
196. Tubau F, Liñares J, Martín R. Resistencia antimicrobiana en *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Cubana Pediatr.* 2000;83(3):288-295.
197. Reinert RR, Reinert S, Van Der Linden M, Cil MY, Al-Lahham A, Appelbaum P. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in eight European countries from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(7):2903-2913. doi:10.1128/AAC.49.7.2903-2913.2005
198. Vallès X, Marcos A, Pinart M, et al. Hospitalized community-acquired pneumonia due to *Streptococcus pneumoniae*: Has resistance to antibiotics decreased? *Chest.* 2006;130(3):800-806. doi:10.1378/chest.130.3.800
199. Farrell DJ, Klugman KP, Pichichero M. Increased antimicrobial resistance among nonvaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* in the pediatric population after the introduction of 7-valent pneumococcal vaccine in the United States. *Pediatric Infectious Disease Journal.* 2007;26(2):123-128. doi:10.1097/01.inf.0000253059.84602.c3
200. Ubukata K, Takata M, Morozumi M, et al. Effects of pneumococcal conjugate vaccine on genotypic penicillin resistance and serotype changes, Japan, 2010–2017. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(11):2010-2020. doi:10.3201/eid2411.180326
201. Jokinen J, Rinta-Kokko H, Siira L, et al. Impact of ten-valent pneumococcal conjugate vaccination on invasive pneumococcal disease in Finnish children - A population-based study. *PLoS One.* 2015;10(3). doi:10.1371/journal.pone.0120290
202. Brandileone MCC, Almeida SCG, Bokermann S, et al. Dynamics of antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* following PCV10 introduction in Brazil: Nationwide surveillance from 2007 to 2019. *Vaccine.* 2021;39(23):3207-3215. doi:10.1016/j.vaccine.2021.02.063
203. Lee HY, Wu TL, Su LH, et al. Invasive pneumococcal disease caused by ceftriaxone-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* 2018;51(4):500-509. doi:10.1016/j.jmii.2016.12.004
204. De la Osa-Busto M, Reyes-Hernández K, Reyes-Gómez U, et al. Sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Streptococcus pneumoniae*. Período 2012-2015, en niños menores de 6 años que cursaron con neumonía. *Revista Médico-Científica de la Secretaría de Salud Jalisco.* 2017;3(4):161-167.
205. Aliberti S, Cook GS, Babu BL, et al. International prevalence and risk factors evaluation for drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* pneumonia. *Journal of Infection.* 2019;79(4):300-311. doi:10.1016/j.jinf.2019.07.004

206. Reinert RR, Ringelstein A, Van Der Linden M, Cil MY, Al-Lahham A, Schmitz FJ. Molecular epidemiology of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Europe. *J Clin Microbiol.* 2005;43(3):1294-1300. doi:10.1128/JCM.43.3.1294-1300.2005
207. Artiles F, Horcajada-Herrera I, Noguera-Catalán J, Álamo-Antúnez I, Bordes-Benítez A, Lafarga-Capuz B. Resistencia antibiótica a los macrólidos en *Streptococcus pneumoniae* en las islas de Gran Canaria y Lanzarote: Mecanismos moleculares y relación con serogrupos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007;25(9):570-575. doi:10.1157/13111183
208. Schroeder MR, Stephens DS. Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6(SEP):1-9. doi:10.3389/fcimb.2016.00098
209. Stephens DS, Zughaier SM, Whitney CG, et al. Incidence of macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* after introduction of the pneumococcal conjugate vaccine: Population-based assessment. *Lancet.* 2005;365(9462):855-863. doi:10.1016/S0140-6736(05)71043-6
210. Bley C, Van Der Linden M, Reinert RR. *mef(A)* is the predominant macrolide resistance determinant in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* in Germany. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;37(5):425-431. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.01.019
211. Sharma D, Baughman W, Holst A, et al. Pneumococcal carriage and invasive disease in children before introduction of the 13-valent conjugate vaccine: Comparison with the era before 7-valent conjugate vaccine. *Pediatric Infectious Disease Journal.* 2013;32(2):45-53. doi:10.1097/INF.0b013e3182788fdd
212. Desai AP, Sharma D, Crispell EK, et al. Decline in pneumococcal nasopharyngeal carriage of vaccine serotypes after the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children in Atlanta, Georgia. *Pediatric Infectious Disease Journal.* 2015;34(11):1168-1174. doi:10.1097/INF.0000000000000849
213. Sunagawa S, Fujita J, Higa F, et al. Comparison of drug sensitivity and genotypes of clinically isolated strains of levofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae* obtained from Okinawa Island, the Japanese main island and Hong Kong. *Journal of Antibiotics.* 2011;64(8):539-545. doi:10.1038/ja.2011.46
214. Muñoz R, de La Campa AG. ParC subunit of DNA topoisomerase IV of *Streptococcus pneumoniae* is a primary target of fluoroquinolones and cooperates with DNA gyrase A subunit in forming resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(10):2252-2257. doi:10.1128/aac.40.10.2252
215. Martín-Galiano AJ, de la Campa AG. High-efficiency generation of antibiotic-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* by PCR and transformation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(4):1257-1261. doi:10.1128/AAC.47.4.1257-1261.2003
216. Iraurgi P, Torres MJ, Aznar J. Molecular epidemiology of fluoroquinolone resistance in invasive clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Seville. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(4):180-183. doi:10.1016/j.eimc.2011.10.006

217. Hsieh YC, Chang LY, Huang YC, Lin HC, Huang LM, Hsueh PR. Circulation of international clones of levofloxacin non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* in Taiwan. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010;16(7):973-978. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02951.x
218. Smith AM, Klugman KP. Alterations in PBP 1a essential for high-level penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(6):1329-1333. doi:10.1128/aac.42.6.1329
219. Du Plessis M, Smith AM, Klugman KP. Application of pbp1A PCR in identification of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 1999;37(3):628-632. doi:10.1128/jcm.37.3.628-632.1999
220. Nagai K, Matsuo Y, Tsumura N, Sakata Y, Kato H. Antimicrobial susceptibilities and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* in southwestern Japan and correlation of penicillin-binding protein 2b and 2x mutations in susceptibilities of penicillin G and cefotaxime. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000;37(2):107-113. doi:10.1016/S0732-8893(00)00127-9