



Departamento de Microbiología
Sección de Biología Molecular
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

“Estudio fenotípico y genotípico de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* causantes de enfermedad invasiva en el Hospital Universitario Virgen del Rocío”

Tesis que para aspirar al grado de Doctor en Farmacia presenta la Licenciada Doña Patricia Iraurgi Arcarazo.

Sevilla, 2012



Departamento de Microbiología

D^a. M^a José Torres Sánchez, Profesora Doctora de la Universidad de Sevilla y D. Javier Aznar Martín, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICAN:

que la tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla que lleva por título **“Estudio fenotípico y genotípico de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* causantes de enfermedad invasiva en el Hospital Universitario Virgen del Rocío”** ha sido realizada por D^a. Patricia Iraurgi Arcarazo bajo nuestra supervisión, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Y para que conste donde proceda firmamos el presente certificado en Sevilla a 9 de febrero de 2012.

Fdo. Dra. M^a José Torres Sánchez

Fdo. Prof Javier Aznar Martín

Addendum

Artículo aceptado en Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica pendiente de publicar: Iraurgi P, Torres MJ, Aznar J. Molecular Epidemiology of Fluoroquinolone Resistance in Invasive Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Seville.

Iraurgi P, Torres MJ, Gandia A, Vazquez I, Cabrera EG, Obando I, Garnacho J, Aznar J. Modified sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of invasive pneumococci recovered from Seville. Clin Microbiol Infect. 2010;16:1504–1507.

Estudio fenotípico y molecular de las resistencias a fluorquinolonas en *Streptococcus pneumoniae*. Iraurgi P, Torres M.J y Aznar J. XIV congreso SEIMC. 19-22 mayo 2010, Barcelona.

Modified sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of invasive *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. Iraurgi P, Torres MJ, Cabrera E, Lepe JA, Garnacho J, Obando I, Aznar J. 19th ECCMID. Congreso Europeo de la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas. 16 - 19 May 2009, Helsinki, Finlandia.

PCR múltiple secuencial para determinación los serotipos capsulares de *Streptococcus pneumoniae*. Iraurgi P, De Toro M, Torres MJ, G-Cabrera E, Garnacho J, Ortiz-Leiva C, Lepe JA, Aznar J. XIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica (SEIMC). 11-14 de mayo de 2008. Madrid.

Agradecimientos

Ante todo agradezco al Dr. Javier Aznar la oportunidad brindada para realizar la Tesis Doctoral y poder llevar a cabo este proyecto. Gracias por mostrarme siempre los errores realizados y el camino a seguir con paciencia y conocimiento. Por sus consejos para seguir adelante y por transmitirme el entusiasmo por la ciencia y la microbiología.

Gracias a la Dra. María José Torres por sus constantes animos, su serenidad y su comprensión durante todo este tiempo. El saber que estabas ahí lo ha hecho todo mucho más sencillo.

Al Dr. Ignacio Obando por facilitarme sus cepas y datos, y compartir su conocimiento.

A todo el Servicio de Microbiología del Virgen del Rocío, por haberme mostrado lo bueno y no tan bueno de esta profesión. Por haberme hecho sentir parte de un equipo y hacer que cada día fuera contenta a trabajar y a aprender.

A María y a Verónica por haberme prestado su apoyo durante toda mi estancia en Sevilla y haberme acogido y ayudado siempre que me ha hecho falta.

A Bernabé, por su paciencia y su apoyo. Por creer en mí y poder compartir y vivir juntos los mismos sueños y aspiraciones.

A toda mi familia y amigas, especialmente a mis padres y mi hermana, que sin su apoyo y comprensión incondicional nada hubiera sido posible.

ÍNDICES

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	2
1.1.1 Antecedentes históricos	2
1.1.2. Microbiología.....	3
1.1.3. Estructura	4
1.1.4. Aspectos epidemiológicos e importancia clínica.....	5
1.1.5. Patogénesis de la infección neumocócica.....	9
1.1.6. Factores de virulencia	10
1.1.7. Resistencias en <i>S. pneumoniae</i>	11
1.1.8. Vacunas.....	15
2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	19
3. OBJETIVOS	22
4. MATERIAL	24
4.1. Microorganismos	25
4.1.1. Muestras y aislamientos.....	25
4.1.2. Cepa patrón	31
4.2. Productos químicos y biológicos	32
4.3. Agentes antimicrobianos.....	34
4.4. Medios de cultivo.....	34
4.5. Soluciones y tampones.....	35
4.5.1. Soluciones para electroforesis	35
4.5.2. Soluciones para electroforesis en campo pulsado (ECP).....	35
5. MÉTODOS	39
5.1. Estudio de los datos clínicos	40
5.2. Procesamiento de las muestras clínicas	40
5.3. Pruebas de identificación y sensibilidad.....	40
5.4. Estudio de serotipado	44
5.4.1. Técnicas de Biología Molecular para estudio de serotipado	44

5.4.2. Diferenciación de los serotipos 6A/B/C	49
5.5. Tipificación molecular	52
5.5.1. Técnica de electroforesis en campo pulsado (ECP) para <i>S. pneumoniae</i>	52
5.5.2. Análisis de los datos obtenidos por ECP	57
5.5.3. Estudio clonal mediante multilocus sequence typing (MLST).....	58
5.6. Estudio de resistencia a fluorquinolonas	61
5.6.1. Detección de mutaciones mediante hibridación con sondas.....	62
5.6.2. Secuenciación de los genes QRDR.....	63
5.6.3. Estudio del efecto de las bombas de expulsión.....	65
6. RESULTADOS	68
6.1. Características epidemiológicas de los casos de ENI	69
6.2. Características clínicas y evolución	72
6.3. Características demográficas	76
6.4. Resultados microbiológicos	78
6.4.1. Aislamiento e identificación de los microorganismos	78
6.4.2. Estudio de sensibilidad	78
6.5. Estudio de serotipado	80
6.5.1. Serotipos obtenidos vs serotipos vacunales	87
6.5.2. Evolución interanual de los serotipos obtenidos.....	90
6.5.3. Serotipos obtenidos vs patologías.....	96
6.5.4. Serotipos obtenidos vs resistencias.....	99
6.6. Electroforesis en campo pulsante (ECP)	100
6.7. Estudio de resistencias a fluorquinolonas	111
6.7.1. Estudio fenotípico de la resistencia a fluorquinolonas	111
6.7.2. Estudio molecular de la resistencia a fluorquinolonas.....	113
6.7.3. Estudio del efecto de las bombas de expulsión.....	118
7. DISCUSIÓN	120
8. CONCLUSIONES	145
9. BIBLIOGRAFÍA	149

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cepas invasivas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> por año de aislamiento.....	26
Tabla 2: Recomendaciones del Documento M100-S20 del CLSI 2010 para el neumococo.	43
Tabla 3: Serotipos y cebadores utilizados para la PCR múltiple.....	44
Tabla 4: Distribución de serotipos en el esquema propuesto por el CDC y en el esquema modificado en el Hospital Universitario Virgen Del Rocío.....	47
Tabla 5: Mezcla de la reacción de serotipado.....	48
Tabla 6: Cebadores utilizados para la secuenciación del serogrupo 6.....	49
Tabla 7: Cebadores utilizados para serotipado de 6A/6B/6C.....	51
Tabla 8: Mezcla de la reacción de PCR para serotipado de 6A/6B/6C.....	51
Tabla 9: Mezcla de la reacción de PCR para amplificación de los genes “housekeeping”.....	60
Tabla 10: Mezcla de la reacción de PCR para la detección de resistencias por hibridación con sondas.....	62
Tabla 11: Oligonucleótidos utilizados para amplificar y secuenciar los genes QRDR.	64
Tabla 12: Mezcla de la reacción de PCR para la detección de resistencias en los genes QRDR por secuenciación.	64
Tabla 13: Distribución interanual de los aislamientos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> . .	69
Tabla 14: Distribución anual de cepas en adultos y niños, incluidas en el estudio.	71
Tabla 15: Distribución del número de pacientes y cepas en función del cuadro clínico.....	72
Tabla 16: Distribución de los casos de neumonía y empiema entre adultos y niños.....	73
Tabla 17: Distribución de los casos en función de la patología diagnosticada y el grupo de adultos o niños.	74
Tabla 18: Distribución de los neumococos causantes de NAC en función de la muestra en la que se hallaron.	75
Tabla 19: Distribución de los neumococos causantes de meningitis en función de la muestra en la que se aislaron.	75
Tabla 20: Distribución de los fallecidos en adultos y niños en función de la patología.....	76

Tabla 21: Distribución de los casos entre hombre y mujeres, en niños y en adultos. ...	77
Tabla 22: Distribución de muestras incluidas en el estudio.	78
Tabla 23: Sensibilidad acumulada de los aislamientos de <i>S. pneumoniae</i> a los diferentes antibióticos probados.	79
Tabla 24: Distribución de los serotipos en cada PCR y los resultados obtenidos de cada serotipo y cada reacción.....	85
Tabla 25: Distribución de los serotipos y su cobertura por las diferentes vacunas neumocócicas.	88
Tabla 26: Resultados de las pruebas de sensibilidad a fluorquinolonas por los diferentes métodos probados.	112
Tabla 27: CMI de NFX y LVX de los 14 aislamientos resistentes a NFX.....	113
Tabla 28: Resultados de la hibridación reversa con sondas de las cepas resistentes a norfloxacin.	114
Tabla 29: Mutaciones detectadas por secuenciación en los genes <i>parC</i> , <i>parE</i> y <i>gyrA</i>	115
Tabla 30: MLST de los neumococos resistentes a NFX.....	117
Tabla 31: Características fenotípicas y moleculares de las cepas resistentes a norfloxacin.	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: secuencia del segmento que diferencia el serotipo 6A del 6B.....	49
Figura 2: Algoritmo de identificación de los serotipos 6A, 6B y 6C (112).	50
Figura 3: Distribución interanual de los aislamientos en adultos y niños.	70
Figura 4: Distribución mensual de los aislamientos.....	70
Figura 5: Distribución mensual de los aislamientos incluidos en el estudio.....	71
Figura 6: Distribución interanual de las cepas incluidas en el estudio.....	72
Figura 7: Distribución de los aislamientos incluidos en el estudio en función de la edad.	77
Figura 8: Bandas de los cuatro serotipos, obtenidas tras la primera PCR múltiple del esquema.....	81
Figura 9: Bandas de tres serotipos, obtenidas tras la tercera PCR múltiple del esquema modificado.	82
Figura 10: Número de cepas obtenidas por cada serotipo, de mayor a menor frecuencia.....	82
Figura 11: Número de cepas obtenidas en adultos por cada serotipo, de mayor a menor frecuencia.....	83
Figura 12: Número de cepas obtenidas en niños por cada serotipo, de mayor a menor frecuencia.....	84
Figura 13: Comparación del porcentaje de aislamientos tipados con cada reacción, entre el esquema original y el modificado en aislamientos de adultos.	86
Figura 14: Comparación del porcentaje de aislamientos tipados con cada reacción, entre el esquema original y el modificado en aislamientos de niños.	86
Figura 15: Distribución de los subtipos del serotipo 6.	87
Figura 16: Porcentaje de casos de ENI en niños menores de 6 años en función de los serotipos vacunales.	89
Figura 17: Porcentaje de casos de ENI causados por los serotipos vacunales agrupados por tipo de vacuna y en función de los grupos de edad.....	90
Figura 18: Distribución anual de las cepas del serotipo 14.....	91
Figura 19: Distribución anual de las cepas del serotipo 23F.....	91
Figura 20: Distribución anual de las cepas del serogrupo 18.....	91
Figura 21: Distribución anual de las cepas del serotipo 6B.....	92
Figura 22: Distribución anual de las cepas del serotipo 19F.....	92

Figura 23: Distribución anual de las cepas del serotipo 4	92
Figura 24: Distribución anual de las cepas del serotipo 9V	93
Figura 25: Distribución anual de las cepas del serotipo 1	93
Figura 26: Distribución anual de las cepas del serotipo 7F	94
Figura 27: Distribución anual de las cepas del serotipo 6A	94
Figura 28: Distribución anual de las cepas del serotipo 3	94
Figura 29: Distribución anual de las cepas del serotipo 19A	95
Figura 30: Distribución anual de las cepas del serotipo 5	95
Figura 31: Distribución de los serotipos hallados entre los casos de NAC	96
Figura 32: Distribución de los serotipos hallados entre los casos de empiema.....	97
Figura 33: Distribución de los serotipos hallados entre los casos de meningitis.	98
Figura 34: Distribución de los serotipos hallados entre los casos de bacteriemias	98
Figura 35: Distribución de los serotipos hallados en cepas no-sensibles a penicilina ..	99
Figura 36: Distribución de los serotipos hallados en cepas eritromicina-resistentes ..	100
Figura 37: Imagen de una ECP de aislamientos de neumococo.....	101
Figura 38: Dendograma obtenido de las cepas de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 1.....	102
Figura 39: Dendograma obtenido de las cepas de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 3.....	103
Figura 40: Dendograma obtenido de las cepas de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 5.....	104
Figura 41: Dendograma obtenido de las cepas de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 7F	105
Figura 42: Dendograma obtenido de las cepas de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 12F	106
Figura 43: Dendograma obtenido de las cepas de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 14 y 9V ...	107
Figura 44: Dendograma obtenido de las cepas de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 19A.....	108
Figura 45: Dendograma obtenido de las cepas de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 22F	109
Figura 46: Dendograma obtenido de las cepas de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 33F	110
Figura 47: Dendograma obtenido de las cepas de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 6A.....	110
Figura 48: Dendograma obtenido de las cepas de <i>S. pneumoniae</i> serogrupo 6.	111
Figura 49: ECP de los aislamientos de <i>S. pneumoniae</i> resistentes a norfloxacin.....	117

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Streptococcus pneumoniae*

1.1.1 Antecedentes históricos

Streptococcus pneumoniae, fue descubierto simultáneamente por Pasteur y Sternberg en 1881, siendo uno de los primeros patógenos aislado, caracterizado y que jugó un papel muy importante en el desarrollo de la bacteriología moderna, la genética, la inmunología, la terapia antimicrobiana y el desarrollo de vacunas (1,2).

En la era preantibiótica la neumonía fue sumamente común, siendo responsable del 7% de los fallecimientos en Estados Unidos y Europa. La tasa de mortalidad más alta se encontraba entre los niños menores de 2 años, especialmente en aquellos con bronconeumonía o bacteriemia (2).

En 1886 se describieron otras localizaciones en las infecciones neumocócicas asociadas a la neumonía, aislándose neumococo en un exudado de la piamadre de un paciente que falleció de meningitis. En pocos años se registraron otras complicaciones como la artritis, la endocarditis, la peritonitis o la bacteriemia sin foco que indicaban infección hematógena. Las manifestaciones de la infección primaria englobaban el tracto respiratorio, incluyendo la neumonía, la traqueobronquitis, la otitis y la sinusitis (2).

El descubrimiento de la penicilina en 1940 supuso un avance importante en el tratamiento de la neumonía, aunque en poco tiempo ya se habían seleccionado neumococos mutantes resistentes. Veinte años más tarde emergió el primer aislamiento clínico con sensibilidad reducida. En poco tiempo, aparecieron cepas resistentes en Papúa Nueva Guinea y en la misma década, cepas con resistencia intermedia en Sudáfrica, Europa y Norte América (3).

Cuando se introdujo la vacuna polisacáridica, el foco de atención se centró en las neumonías en adultos, sin prestar mucha atención a las infecciones neumocócicas en niños pequeños, a pesar de que se estimaba que en países en vías de desarrollo, cada año

morían aproximadamente 2 millones de niños menores de 5 años como consecuencia de infecciones respiratorias (4). Sin embargo, en países industrializados, las infecciones neumocócicas más frecuentes entre niños menores de 2 años eran las otitis medias agudas (OMA) (2). Aproximadamente un tercio de las OMAs estaban causadas por neumococo (5), por esta razón se hacía necesaria una vacuna para la prevención de las otitis e infecciones del tracto respiratorio en niños. Cuando se obtuvo la licencia de la vacuna polisacáridica 14-valente, se puso de manifiesto que la respuesta inmune a esta vacuna era dependiente de la edad y muy débil en pacientes menores de 5 años (6,7). Tras esto, se consensuó que el primer paso en la prevención de las otitis media era desarrollar una vacuna neumocócica conjugada multivalente para niños, empezando por los serotipos 6A o 6B, 14, 19F y 23F (2).

Respecto al desarrollo de las vacunas, exceptuando las primeras basadas en células de neumococo enteras e inactivadas, posteriormente todas han sido basadas en polisacáridos capsulares serotipo-específicos purificados. Estas vacunas inducen la producción de anticuerpos serotipo-específicos en el humano, protegiéndolo así de infecciones debidas a estos serotipos (2).

1.1.2. Microbiología

Streptococcus pneumoniae o neumococo es un coco oval grampositivo. Tiene un diámetro de 0,5-1,2 μm y se agrupa de manera característica en parejas lanceoladas o en cadenas cortas. Sólo crece en medios enriquecidos suplementados con sangre, no forma esporas y es inmóvil. Son anaerobios facultativos y su crecimiento se ve favorecido en presencia de 3-5% de CO_2 . Cuando *S. pneumoniae* crece en la superficie de un medio de cultivo sólido, la cápsula da lugar a colonias con una apariencia mucoide y redonda (8). Si el periodo de incubación es prolongado, las cepas de neumococo experimentan autólisis debido a la susceptibilidad a los peróxidos producidos durante el crecimiento y a la acción de las autolisinas (9), presentando una invaginación o depresión en el centro de la colonia.

En agar-sangre, los neumococos producen colonias rodeadas por una zona vercosa de hemólisis alfa. Ésto permite diferenciar a *S. pneumoniae* de los estreptococos

β -hemolíticos, pero no de los estreptococos α -hemolíticos cohabitantes del tracto respiratorio superior, especialmente del grupo viridans (8). Pruebas específicas como la solubilidad en bilis y la sensibilidad a la optoquina permiten diferenciar el neumococo de los *Streptococcus* del grupo viridans. Otra prueba específica para la detección de neumococos es la reacción de Quellung, que consiste en el aumento de la cápsula después de añadir los antiseros capsulares específicos. Actualmente existen diferentes reactivos comerciales para test rápidos de identificación, basados en la detección visible del complejo antígeno-anticuerpo por aglutinación, resultado de la reacción entre los antígenos de la superficie neumocócica y los anticuerpos específicos de los diferentes serotipos que contiene el reactivo absorbidos a las partículas de látex (10).

1.1.3. Estructura

La composición de la pared celular de los neumococos y el de los estreptococos en general, es similar a la de otras bacterias grampositivas, que está compuesta principalmente por peptidoglucano, en el cual están introducidos distintos hidratos de carbono, ácidos teicoicos, lipoproteínas y antígenos protéicos de superficie. El peptidoglucano está constituido por largas cadenas de polisacárido unidas por enlaces peptídicos. El componente del polisacárido consiste en unidades alternas de los hidratos de carbono N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico, que forman un enlace β -1,4. Los ácidos teicoicos, los cuales contienen galactosamina, fosfato y colina, se encuentran anclados a la pared celular a través de enlaces fosfodiéster y se extienden a través de la cápsula. Esta estructura es específica de la especie y se llama polisacárido C. Éste, hace precipitar la proteína C reactiva en presencia de calcio (9). La colina desempeña una importante función en la activación de la autolisina durante la división celular. Los ácidos teicoicos estabilizan la pared celular y participan en la adherencia a la mucosa o a otras superficies (11). La pared celular está también constituida por ácidos lipoteicoicos, que químicamente son ácidos teicoicos formados por unidades de glicerol, pero anclados a los glucolípidos de la membrana celular (12).

El aspecto estructural distintivo del neumococo es su cápsula. Todas las cepas virulentas tienen cápsula de superficie compuesta por polímeros de polisacáridos de alto peso molecular, que son mezclas complejas de monosacáridos, oligosacáridos y en

ocasiones, otros componentes, y que tienen actividad antigénica. La cápsula se considera el factor de virulencia más importante y reconocido del neumococo. Hasta hace poco se habían descrito un total de 91 serotipos capsulares que difieren en los azúcares y enlaces de las unidades repetitivas y que son patógenos para el hombre (13). Debido a la reacción cruzada que existe entre algunos serotipos a causa de determinantes antigénicos comunes, se han agrupado en 46 serogrupos.

1.1.4. Aspectos epidemiológicos e importancia clínica

La enfermedad neumocócica tiene una gran relevancia socio-sanitaria. En todo el mundo mueren más de cinco millones de niños cada año a causa de la enfermedad neumocócica. *S. pneumoniae* se considera la principal causa de neumonía adquirida en la comunidad y su severidad puede ir desde una otitis media o neumonía hasta una septicemia o meningitis. Cuando la bacteria se aísla en otras localizaciones diferentes a secreciones respiratorias como sangre o líquidos biológicos, se considera una infección invasiva. La enfermedad neumocócica invasiva (ENI) en pacientes adultos sigue asociándose a una elevada mortalidad.

S. pneumoniae se encuentra en las vías respiratorias altas del 5-10% de los adultos sanos, no obstante, ha habido tasas de portadores superiores al 60% en poblaciones cerradas (14). En los adultos, la colonización y el estado de portador suelen prolongarse de 2 a 4 semanas (15). Los lactantes suelen colonizarse a los 3 o 4 meses con un serotipo concreto y se mantienen así alrededor de 4 meses. La mayor incidencia de colonización se da a los 2 a 3 años, pudiendo alcanzar una tasa de 40-60% (11,16,17). La incidencia también varía porque se ve afectada por los métodos empleados para detectar la bacteria y por la población estudiada (9). La colonización de los lactantes se asocia a la falta de anticuerpos anticapsulares específicos y los serotipos poco antigénicos (18). Las tasas de colonización suelen ser más frecuentes en los niños que asisten a guarderías, en comunidades cerradas y en los meses fríos. La mayor susceptibilidad de las personas ancianas a la enfermedad neumocócica se debe al envejecimiento del sistema inmunitario y la posterior disminución de la producción de anticuerpos (11,19).

Las infecciones neumocócicas ocurren durante toda la vida, pero son más frecuentes en individuos muy jóvenes (< 3 años de edad) y en ancianos (> 65 años) (14). La enfermedad neumocócica aparece cuando los microorganismos que colonizan la nasofaringe u orofaringe se diseminan a localizaciones como el pulmón, los senos paranasales, el oído o las meninges. La bacteriemia puede ocurrir en todas estas infecciones.

En los adultos, la enfermedad broncopulmonar subyacente y la inmunidad humoral comprometida predisponen a la enfermedad neumocócica (19). Las personas con asplenia funcional o que han sufrido esplenectomías quirúrgicas también tienen un mayor riesgo de desarrollar una bacteriemia neumocócica invasiva, que puede llegar a ser mortal (20). Debido al daño que causan los virus en los mecanismos de depuración bronquial, las infecciones respiratorias virales también predisponen a la infección neumocócica del aparato respiratorio. Los hemocultivos suelen ser positivos en el 20-30% de los pacientes con neumonía neumocócica (11).

S. pneumoniae es la causa más frecuente de bacteriemia, sepsis y meningitis bacteriana tanto en niños como en adultos (14). En los adultos, el neumococo representa alrededor de un tercio de las meningitis extrahospitalarias en los Estados Unidos y tiene una mortalidad asociada del 20-25% (21). En niños el neumococo representa el 40-50% de los casos de otitis media aguda (OMA) y se asocia a sinusitis y mastoiditis (22,23).

Con el uso de la penicilina han ocurrido dos cambios importantes a nivel mundial. El primero, fue que las epidemias debidas a los serotipos más invasivos, el 1, 2, 3, 5 y 7 eran menos frecuentes, ya que el tratamiento precoz interrumpía la cadena de transmisión y se reducía el número de portadores e infectados (2). El segundo, fue que los serotipos menos virulentos en niños, el 6, 9, 14, 19 y 23, tuvieron mayor éxito como colonizantes y empezaron a reemplazar a los serotipos epidémicos en las infecciones graves (24).

Veintitres de los 91 serotipos de neumococo producen enfermedad con más frecuencia que los otros, pudiendo alcanzar el 88% de las bacteriemias y meningitis neumocócicas (14). La edad de los pacientes y la distribución geográfica de los casos también varía. Estas diferencias se deben, al parecer, al incremento de los factores de

virulencia en estos tipos, pero no se han podido aclarar las causas específicas. Estas características no influyen en el tratamiento médico de los casos individuales, pero tienen importancia para idear estrategias de prevención, como las inmunizaciones.

La cápsula es el principal factor de virulencia del neumococo. Por tanto, la determinación del serotipo capsular en la enfermedad invasora tiene un doble interés: clínico porque va a condicionar la virulencia y por tanto la presentación clínica, y epidemiológico a la hora de formular y de conocer el impacto de las nuevas vacunas.

Clásicamente, el estudio de la distribución de serotipos se realiza mediante el aislamiento y posterior serotipificación de las cepas mediante la reacción de hinchazón capsular de Neufeld (Quellung). El alto coste de los antisueros, la subjetividad en la interpretación de los resultados y la necesidad de experiencia son grandes limitaciones de esta técnica.

Pai R. *et al* (25), basándose en los datos epidemiológicos del programa de vigilancia del CDC, han desarrollado un sistema basado en 7 PCRs múltiples secuenciales de los genes que codifican los diferentes tipos de antígenos capsulares e incluye el gen *cps* (antígeno capsular común a todos los *S. pneumoniae*) como control interno. Este sistema permite identificar el 95% de los serotipos más prevalentes en USA, utilizando un equipo básico de amplificación de ADN y de electroforesis. El esquema propuesto por el CDC ha sido utilizado en diferentes países para conocer la distribución de los serotipos capsulares de *S. pneumoniae* en aislamientos clínicos. En algunos casos este esquema ha sido modificado y adaptado a la prevalencia de los serotipos de cada área geográfica (26,27).

En España, entre 1990 y 1996, los diferentes serotipos hallados en función de la edad coincidían con otros estudios. Así, los serogrupos más frecuentes en niños eran el 6, 14, 18, 19 y 23, mientras que en adultos fueron el 3, 8 y 9 (28). Los serogrupos relacionados con la resistencia a penicilina fueron el 6, 9, 14, 19, and 23. Un trabajo realizado en España entre 1990 y 1999 por los mismos autores, donde se estudiaron 3921 cepas aisladas en niños menores de 15 años de los hospitales de todas las Comunidades Autónomas de España, mostró una cobertura de la vacuna heptavalente en aislamientos procedentes de hemocultivos de un 78% (29).

En 2000-2002 los serogrupos invasivos más frecuentes en niños seguían siendo los cinco nombrados anteriormente (6, 14, 18, 19 y 23) más el serotipo 1, mientras que en adultos, los 5 serogrupos más prevalentes entre 2000-2002 fueron el 3, 14, 1, 19 y 4 (8).

Según un estudio realizado en Estocolmo, la ENI está causada por 2 grupos clonales diferentes, uno incluye los clones altamente virulentos y el otro incluye los clones que producen ENI debido a su capacidad de colonización y difusión (30). Con respecto a la capacidad del neumococo para producir ENI, se cree que es más importante el serotipo capsular que el genotipo (31). No obstante, los aislamientos del mismo serotipo suelen ser genéticamente más similares que los de otro serotipo. Esto explica que muchos clones del mismo serotipo posean la misma capacidad de producir ENI (30).

Aunque vayamos adquiriendo un mayor conocimiento sobre los aspectos básicos de la patogénesis de la enfermedad neumocócica, todavía se desconocen los mecanismos y motivos exactos por los cuales ciertos clones son habitualmente los causantes de ENI. Para la caracterización de los aislamientos bacterianos se han desarrollado métodos tanto fenotípicos como genotípicos, que nos proporcionan una valiosa información para las investigaciones epidemiológicas. Las técnicas de análisis genético como el ribotyping, la electroforesis en campo pulsante (ECP) y el MLST (multilocus sequence typing) han mostrado tener un poder discriminatorio superior al serotipado (32).

Entre los métodos de tipado molecular, la ECP ha sido ampliamente utilizada para caracterizar diferentes microorganismos, incluyendo el *S. pneumoniae*, debido a su alto poder discriminatorio y se considera mejor que otras técnicas de tipado molecular (33-36). La ECP tiene la ventaja de no ser cara y ser altamente reproducible. Suele ser más efectiva para estudios epidemiológicos locales (37,38). Se ha visto que aislamientos de distintos serotipos pueden estar relacionados genéticamente y que aislamientos del mismo serotipo pueden mostrar diferentes patrones de ECP. La ECP puede discriminar aislamientos en función de su serotipo o lugar de infección (32).

La dinámica evolutiva del neumococo hace imprescindible el empleo de técnicas fenotípicas y de la epidemiología molecular para lograr sistemas de vigilancia más completos a nivel nacional como internacional.

1.1.5. Patogénesis de la infección neumocócica

La elevada prevalencia de la colonización neumocócica se debe al éxito con el que se adhiere y se multiplica en las células epiteliales de la nasofaringe humana. La colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* está mediada por la unión de las bacterias a las células epiteliales por medio de adhesinas de superficie (9), en concreto la proteína fijadora de colina se une a las colinas y los carbohidratos que cubren la pared de la célula epitelial de huésped. La aspiración de las secreciones respiratorias que contienen a estos neumococos puede culminar en una neumonía (39). En condiciones normales, los mecanismos de aclaramiento locales como la tos, los reflejos epiglóticos o la fagocitosis, son suficientes para eliminar con rapidez los microorganismos aspirados. Sin embargo, cuando existen factores del huésped que alteran la eficacia de estas defensas, los neumococos pueden llegar a los alveolos y multiplicarse. Entre estos factores se encuentran enfermedades pulmonares crónicas, lesión del epitelio bronquial por humo de tabaco o contaminación aérea y disfunción respiratoria por intoxicación alcohólica, narcóticos, anestesia y traumatismos (39).

Una vez que la bacteria se encuentra en el alveolo, parece que los factores de virulencia actúan en dos etapas. La primera se da al principio de la infección, como consecuencia de la actividad antifagocítica que proporciona la cápsula. La segunda etapa ocurre cuando los microorganismos empiezan a desintegrarse y a liberar diversos factores como la neumolisina, la autolisina y componentes de la pared celular (39). Estos factores atraen a las células inflamatorias hacia el foco de infección, favoreciendo la destrucción tisular.

La patogénesis de la infección neumocócica es consecuencia de la interacción entre los factores de virulencia neumocócicos y la respuesta inmune del huésped. Los determinantes de virulencia neumocócicos y su correspondiente respuesta inmune producen cuatro efectos clave: la adhesión, la invasión, la inflamación y el shock (40).

1.1.6. Factores de virulencia

Como ya se ha comentado anteriormente, la virulencia del *S. pneumoniae* se debe principalmente a su capacidad para resistir la fagocitosis y a la destrucción intracelular de las células fagocíticas (14). Esta resistencia a la fagocitosis se debe a su vez a la cápsula de polisacárido de la bacteria. De hecho, en modelos animales, cuando se inhibe la producción de la cápsula mediante técnicas genéticas, éstos se vuelven avirulentos (11). Los diferentes tipos capsulares varían en la capacidad para producir respuestas de anticuerpos humorales y en las propiedades biológicas que confieren mayor o menor virulencia (41).

La principal función de cápsula polisacáridica es la protección de la bacteria frente a la actividad fagocítica de las células del sistema inmunitario, principalmente los macrófagos. Por ello, los organismos capsulados son resistentes a la fagocitosis y se multiplican rápidamente, mientras que los neumococos no capsulados son fagocitados rápidamente.

Algunos productos celulares como la neumolisina o autolisina, podrían desempeñar un papel en la virulencia de los neumococos, ya que los mutantes defectuosos en la producción de estos componentes poseen una menor virulencia en modelos animales (11,42).

La neumolisina (Ply) es miembro de la familia de toxinas formadoras de poros transmembranales, entre las que se encuentran la toxina estafilocócica alfa, estreptolisina O de *S. pyogenes* y otras (43). El neumococo no secreta neumolisina, sino que se descarga como consecuencia de la lisis de los microorganismos (44,45). La neumolisina actúa uniéndose al colesterol en las membranas celulares de distintas células huéspedes. A continuación se introduce en la membrana y tras una oligomerización provoca unos poros transmembrana, que finalmente lisan las células (46). La neumolisina es una toxina bifuncional y además de sus propiedades citotóxicas, tienen la capacidad de activar directamente la vía clásica del complemento (46). Inhibe además la actividad bactericida de los leucocitos, reduce la movilidad ciliar del epitelio respiratorio y estimula la producción de citocinas por los macrófagos (47-49).

La autolisina (LytA), es responsable de la lisis celular que conlleva la liberación intracelular de la Ply y otros factores de virulencia (50). La mutagénesis del gen *lytA* previene la autólisis.

La neuraminidasa es un factor de virulencia que se ha encontrado en todos los neumococos estudiados. Este enzima escinde el ácido siálico terminal de los glucanos como la mucina, glicolípidos o las glicoproteínas que se encuentran en las superficies celulares, exponiendo nuevas porciones de la molécula que median la adherencia de las células bacteriana (51,52). Existen al menos dos tipos de neuraminidasa, NanA and NanB. Algunas cepas neumocócicas también producen hialuronidasa (hyl) e IgA proteasas, que facilitan la propagación y colonización bacteriana (53).

La proteína de unión a la colina A (CbpA) tiene una gran habilidad para reaccionar tanto con anticuerpos humanos como con el suero protector del ratón, ya que permite la adherencia al tejido huésped y la posterior colonización (53).

El antígeno de superficie A (PsaA) es otro factor de virulencia del neumococo. Se ha observado que los anticuerpos dirigidos a la PsaA en ratones confieren protección contra el neumococo y que los mutantes para la PsaA son avirulentos (52).

La proteína PspA es uno de los antígenos mejor caracterizado de la familia de las CBP (proteína de unión a colina). Se encuentra en la superficie de todos los neumococos (54) y su papel en la patogénesis del neumococo está demostrado (55,56). Su principal función es reducir la deposición de las moléculas del complemento C3b sobre la superficie del neumococo y la posterior aclaración mediada por el complemento (56). La PspA también se une a la lactoferrina (57,58), protegiendo al neumococo del efecto bactericida de la apolactoferrina y facilitando así la colonización de las mucosas (59).

1.1.7. Resistencias en *S. pneumoniae*

Tras el primer neumococo con sensibilidad disminuida a penicilina descrito en Australia en 1967 (60), la preocupación con respecto a las resistencias a los antibióticos en *S. pneumoniae* ha ido en aumento (3,61,62). Durante la década de 1970, la

resistencia a la penicilina entre las cepas de *S. pneumoniae* era rara en los Estados Unidos y sólo el 0.2% eran resistentes. La penicilina siguió siendo el tratamiento de elección mientras emergían las resistencias a tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos y cotrimoxazol (3). En 1978 emergen en África, cepas no solamente resistentes a los antibióticos nombrados, sino también completamente resistentes a la penicilina; esto marcó la era de los neumococos multirresistentes (63). Durante la década de 1980, fueron halladas cepas multirresistentes (resistencia a 3 o más tipos de antibióticos) en España y se extendieron globalmente (3). Durante la década de 1990, hubo un aumento de neumococos multirresistentes en Estados Unidos (64). Cuando en el año 2000, se introdujo la primera vacuna neumocócica conjugada en Estados Unidos, aproximadamente la mitad de los aislamientos de las enfermedades neumocócicas invasoras fueron resistentes a penicilina y/o a macrólidos (64).

Aunque la invasividad y la resistencia no están obligatoriamente relacionadas, sí tienen una importancia fundamental en el manejo de la enfermedad invasora y su evolución clínica. El estudio de la sensibilidad y de los mecanismos de resistencia a betalactámicos (sobre todo penicilina) y macrólidos, ha sido objeto de intenso estudio en las últimas décadas. Los problemas de resistencia a betalactámicos y macrólidos han conducido al empleo de nuevas moléculas en el tratamiento, como las fluorquinolonas.

La mayoría de los mecanismos de resistencia conocidos en bacterias han sido descritos para *S. pneumoniae*, con la excepción de la resistencia mediada por plásmidos. Sin embargo se ha descrito la resistencia mediada por un plásmido linealizado en un transposón y la inserción de éste en el cromosoma neumocócico. Es el caso del cloranfenicol (65). En el neumococo, la resistencia de al menos 3 clases de antibióticos está mediada por la mutación de una base en el gen cromosómico. Por ello, esta clase de resistencia podría ser fácilmente seleccionada por la terapia antibiótica y el amplio uso de estos antibióticos. El uso generalizado de un agente podría seleccionar una cepa multirresistente.

La resistencia a la penicilina se asocia con una alteración de las proteínas de unión a la penicilina (PBP) que tienen menor afinidad para fijar la penicilina a la pared de la célula bacteriana. Las PBPs son enzimas transpeptidasa que participan en la síntesis de peptidoglicano y cada especie bacteriana contiene un conjunto característico

de PBPs. Dependiendo de la estructura de los dominios y los aminoácidos conservados en el dominio N-terminal se distinguen las de clase A y clase B de alto peso molecular y la PBPs de bajo peso molecular. *S. pneumoniae* contiene 6 PBPs: tres PBPs de clase A de alto peso molecular (1A, 1B y 2A), dos de la clase B de alto peso molecular (2X y 2B) y la PBP3 de bajo peso molecular (66).

El primer mecanismo de resistencia a macrólidos descrito en *S. pneumoniae* fue una modificación post-transcripcional de la 23S rRNA por una adenina-N⁶ metiltransferasa (67). Los genes que codifican estas metilasas se designaron *erm* (erythromycin ribosome methylase) y se han hallado en numerosas bacterias grampositivas (53). Ocasionalmente el enzima ErmA del *S. pneumoniae* es codificado por el gen *ermA* de un *Streptococcus pyogenes* resistente (68). En Estados Unidos la resistencia a macrólidos a menudo suele ser debida al gen de reflujo *mefE* (69). Este gen está asociado con el 20-30% de las resistencias a macrólidos en la mayor parte del mundo. En Italia el reflujo está mediado por el gen *mefA* (70). Un pequeño porcentaje de la resistencia a macrólidos está mediada por mutaciones en la diana en todas las copias de genes para rRNA y/o mutaciones en los genes para proteínas ribosomales (71).

La resistencia a trimetropim-sulfametoxazol está mediada por mutaciones en los genes cromosómicos de la dihidrofolato reductasa (72) y la dihidropteroato sintetasa (73).

La resistencia a tetraciclinas está mediada por *tetM* y ocasionalmente *tetO* (74), y la de cloranfenicol por la adquisición de un gen cloranfenicol acetiltransferasa (75).

En 1962 apareció la primera quinolona, el ácido nalidíxico, obtenida por síntesis a partir de la cloroquina, pero no fue hasta 1978 cuando se inició la era de las quinolonas fluoradas, análogas del anterior. Debido a la incorporación del átomo de fluor en la posición 6 del anillo de dihidroquinoleína, poseen un amplio espectro de acción que engloba bacterias grampositivas, gramnegativas (como *Pseudomonas* y enterobacterias) y micobacterias. Se caracterizan también por estar dotadas de propiedades farmacológicas que las hacen útiles para el tratamiento de infecciones

sistémicas. Estos quimioterápicos bactericidas son inhibidores de la ADN-girasa y topoisomerasa IV, enzimas compuestas por cuatro subunidades (dos A y dos B).

Las fluorquinolonas como el levofloxacin, por su elevada actividad frente al neumococo, se recomienda en el tratamiento empírico de la neumonía adquirida en la comunidad que requiere ingreso (76,77). Aunque el porcentaje de resistencias a fluorquinolonas en neumococo se mantiene bajo en todo el mundo, el aumento de su utilización incrementa el riesgo de la aparición de aislados resistentes (78). En los últimos años se han descrito mutantes de primer paso a fluorquinolonas en aislamientos invasivos de neumococo en USA, Canadá y China (79,80). En España la tasa de resistencia se ha elevado del 0,9% en 1990 al 7,1% en el año 2000. Esta resistencia se traduce en fracasos terapéuticos (80,81). Recientemente en España se ha descrito un fracaso terapéutico, con evolución mortal, en un paciente con enfermedad invasiva en tratamiento con levofloxacin en el que se aisló una cepa de *S. pneumoniae* con mutación ParC (82).

La resistencia bacteriana a las fluoroquinolonas se debe a la alteración de las dianas de esta clase de antibióticos, la ADN topoisomerasa IV y la ADN girasa y a la expulsión activa de la molécula mediante bombas (83,84). La alteración de las enzimas se da por mutaciones en los genes QRDR (quinolone resistance-determining region) y la consiguiente sustitución de los aminoácidos. La mutación se puede dar sólo en una de las dianas o en ambas. En el primer caso tendríamos una mutante de primer paso y en el segundo, un mutante de resistencia de alto nivel (85). La sensibilidad disminuida se da sobre todo por mutaciones en la subunidad ParC de la topoisomerasa IV o en la subunidad GyrA de la ADN girasa y menos en ParE o GyrB (86-88). La diana alterada en los mutantes de primer paso depende de la FQ (87,89). Así, para pefloxacin, ciprofloxacino y levofloxacin la diana es el del gen *parC* y para esparfloxacino, moxifloxacin, gatifloxacin, gemifloxacin y garenoxacin es el *gyrA* (87,90,91). Estos resultados demuestran que la estructura de estos antibióticos determina su modo de acción frente a *S. pneumoniae*.

Con el propósito de detectar resistencias de bajo nivel y prevenir la selección in vivo de mutantes de segundo paso o fracasos terapéuticos, la Sociedad Francesa de Microbiología sugiere un método de cribado con norfloxacino (NFX) (92).

Aunque el principal mecanismo de resistencia a las fluoroquinolonas en *S.pneumoniae* se debe a mutaciones en las dianas de estos antibióticos, los procesos de transporte a través de la membrana, como las bombas de reflujo, también son responsables de la resistencia de bajo nivel o primer paso. Este mecanismo afecta principalmente a quinolonas hidrofílicas como la NFX y la ciprofloxacina (93,94). Las bombas de reflujo expulsan compuestos de diversas estructuras fuera de la bacteria, previniendo su acumulación intracelular. El alcaloide reserpina es una de las sustancias capaz de inhibir la actividad de algunas de estas bombas, aunque no se utiliza en la práctica clínica debido a su elevada toxicidad.

Hasta el año 2002 aproximadamente, la única bomba de expulsión conocida implicada en la resistencia a fluorquinolonas en el neumococo era la PmrA (95), aunque se han ido estudiando otras posibles proteínas implicadas en el fenotipo resistente (96,97).

1.1.8. Vacunas

Actualmente, tenemos dos tipos de vacunas neumocócicas, uno con polisacáridos puros y otro con polisacáridos conjugados con proteínas. La vacuna de polisacáridos puros está compuesta por 23 polisacáridos capsulares neumocócicos (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, and 33F) (98), que representan aproximadamente el 85-90% de los serotipos que causan ENI en adultos y niños. Una dosis de la vacuna polisacáridica, induce la producción de anticuerpos IgM e IgG en adultos sanos. Los anticuerpos IgG persisten durante varios años, ejerciendo un efecto protector durante ese tiempo. Sin embargo, estas vacunas no estimulan a las células T, por lo que no se obtiene una protección inmunitaria en los niños menores de 2 años (99). Su eficacia también es limitada en pacientes inmunodeprimidos y con neoplasias hematológicas.

Aun con las limitaciones indicadas y valorando la eficacia, seguridad y coste, la mayoría de los expertos recomiendan su uso para prevenir la bacteriemia neumocócica en grupos de riesgo. Las indicaciones consideradas son: 1) personas de 65 años o mayores; 2) personas de 2-64 años que tienen una enfermedad crónica; 3) personas que

presentan asplenia funcional o anatómica; 4) personas de 2-64 años que viven en circunstancias que los colocan en riesgo de ENI y 5) personas de 2 años o mayores que están inmunodeprimidas.

Recientemente, basados en la frecuencia de serotipos implicados en enfermedades severas del niño menor de 5 años de edad, se han propuesto 7, 10 y hasta 13 serotipos para ser incluidos en las diferentes formulaciones de vacunas conjugadas (29).

En el año 2000 en Estados Unidos, y en junio de 2001 en nuestro país, se comercializó la vacuna conjugada heptavalente (PCV7) antineumocócica que incluye los siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19V, 23F) más frecuentemente implicados en la etiología de la enfermedad invasora neumocócica en niños menores de 2 años en países desarrollados (80% de casos) (100). La PCV7 está compuesta por una proteína transportadora de toxina diftérica inerte ligada de forma covalente con los antígenos polisacáridos capsulares de siete serotipos de *S. pneumoniae* (11). Se recomienda la PCV7 para los niños de 2 años y menores y se administra a los 2, 4 y 6 meses de edad, con una inmunización de refuerzo a los 12 y 15 meses de edad. Para los niños de 2 a 5 años de edad el Advisory Committee on Immunization Practices de los Estados Unidos ha recomendado que los niños en alto riesgo de enfermedad neumocócica reciban tanto la PCV7 como la vacuna de polisacáridos para aumentar la respuesta inmunitaria. La vacuna conjugada PCV7 provoca una respuesta de anticuerpos dependientes de células T (100).

Actualmente existen importantes controversias sobre la utilidad y eficacia a largo plazo de la vacuna conjugada antineumocócica en relación con su formulación idónea, debido a la problemática de reemplazamiento de serotipos en colonizantes nasofaríngeos y la relevancia de la transformación capsular como mecanismo de inmunoevasión de los serotipos capsulares. Una limitación de esta vacuna radica en el fenómeno de reemplazo de los serotipos circulantes por serotipos no vacunales. La vacuna heptavalente ha reducido la ENI causada por los serotipos vacunales e incluso la frecuencia total de resistencias entre estos serotipos (101), pero empezaron a reemerger los serotipos no vacunales y las tasas de infección total en algunas poblaciones ha vuelto a alcanzar los niveles prevacunales (102,103). Ha habido también un aumento

sustancial de neumonías complicadas y empiemas debidos a los serotipos 1, 3 y 19A (104).

En algunos países ha demostrado su eficacia (dependiente de la tasa de cobertura vacunal) tanto en la disminución de ENI como en la disminución de cepas multirresistentes, mientras que en otros este fenómeno no se ha constatado (105). Los datos en España son contradictorios, en Navarra y País Vasco la incidencia de la ENI disminuyó en un 64,3% en lactantes, un 39,7% en menores de 2 años y un 37,5% en menores de 60 meses. Sin embargo la incidencia por serotipos no vacunales permaneció inalterada. En Cataluña se demostró una eficacia postvacunal baja y en Gran Canaria no han demostrado una disminución de la incidencia en niños menores de 2 años, y en cambio han aumentado los casos por serotipos no vacunales. Los datos del Laboratorio de referencia de Neumococos del Instituto de Salud Carlos III indican una disminución de la incidencia de la proporción de los serotipos vacunales y un aumento de los no vacunales, sin que se pueda determinar con exactitud la causa de la emergencia de estos últimos (106). El reemplazo de serotipos neumocócicos tiene una génesis multifactorial y se debe seguir investigando. El “switching” del serotipo capsular, originalmente observado en experimentación con ratones, está también dándose en humanos y podría jugar un papel importante en la expansión de serotipos no vacunales (107,108).

El 24 de febrero de 2010, el FDA aprueba la nueva vacuna neumocócica conjugada tridecavalente (PCV13) para la prevención de ENI en niños de edad comprendida entre las 6 semanas y los 71 meses. La vacuna incluye 13 serotipos, los 7 que incluía la PCV7 más el 1, 3, 5, 6A, 7F y el 19A (100). La PCV13 fue formulada del mismo modo que la PCV7 y con la misma eficacia y seguridad. La PCV13 está aprobada también para la prevención de otitis media causada por los 7 serotipos incluidos en la PCV7; para los 6 serotipos restantes no hay datos de eficacia disponibles para otitis media.

Recientemente se ha empezado a investigar la contribución individual de los factores de virulencia nombrados anteriormente y su posible utilidad en la elaboración de nuevas vacunas. Esto se ha hecho probando neumococos virulentos en modelos animales que previamente habían sido inmunizados con antígenos purificados (109). Los mejores antígenos candidatos para el desarrollo de una vacuna parecen ser la

neumolisina, la autolisina y la proteína de superficie A (PspA). Sin embargo, la delección de *nanaA*, *hyl* y *cbpA* no tienen ningún impacto en la virulencia. Cuando se alteran dos genes a la vez, la virulencia se atenúa significativamente. Esto ocurre con dobles mutantes de *ply hyl*, *ply pspA* y *ply cbpA* (52).

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Streptococcus pneumoniae es uno de los agentes principales de meningitis, bacteriemia y sepsis tanto en adultos como niños. A pesar de la terapia antimicrobiana, la enfermedad neumocócica invasiva (ENI) persiste en niños como la mayor causa de morbi-mortalidad en el mundo. La inmunoquímica de la cápsula polisacáridica nos ha permitido distinguir 92 serotipos diferentes, aunque aproximadamente 15 son los causantes de la mayoría de la enfermedad neumocócica invasiva (ENI).

Creemos que en la población atendida en nuestra área de influencia ha habido un cambio en la epidemiología de la enfermedad invasora por *Streptococcus pneumoniae*, que puede deberse a varios factores.

Un factor determinante puede obedecer a la circulación de algunos serotipos concretos que pueden estar o no incluidos en la vacuna conjugada heptavalente. La introducción de la vacuna conjugada heptavalente en el año 2000, cambió la epidemiología de los serotipos circulantes. Así, el descenso de serotipos vacunales vino acompañado de un aumento de los serotipos no vacunales.

Por otro lado, la distribución de serotipos en la población adulta y pediátrica también es distinta, así como la prevalencia de resistencia a fluorquinolonas por su no utilización en población pediátrica.

Otro factor determinante puede ser la distribución clonal de las cepas circulantes tanto en la población adulta y pediátrica, así como su invasividad e influencia sobre la evolución clínica de la enfermedad. Los fenómenos de recombinación capsular que se han descrito entre diferentes clones podrían suponer la combinación de clones virulentos con serotipos no-vacunales y por lo tanto la evasión de la vacuna.

La hipótesis de nuestro trabajo es la existencia de una asociación no condicionada exclusivamente por las características de los pacientes, entre la gravedad de la enfermedad invasora por *Streptococcus pneumoniae* y la prevalencia de ciertos serotipos y ciertas clonas circulantes en la población, que en el caso de la población

adulto se asociaría con una mayor porcentaje de cepas con sensibilidad disminuida a fluorquinolonas, que bajo la presión antibiótica podrían mutar a cepas con resistencia de alto nivel.

Por otro lado, la vigilancia continua de los serotipos circulantes y el estudio rutinario de las cepas con sensibilidad disminuida a fluorquinolonas en los laboratorios de Microbiología Clínica requiere de técnicas sencillas y económicas. Por ello, nuestra segunda hipótesis es la utilización de técnicas de PCR para el serotipado y la necesidad de implantar un método de cribado para la detección de cepas con sensibilidad disminuida a fluorquinolonas.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es conocer la epidemiología de la enfermedad neumocócica invasiva mediante el serotipado, el estudio de clonalidad y el estudio de la sensibilidad disminuida a fluorquinolonas de los aislamientos invasivos de *Streptococcus pneumoniae* en el Hospital Universitario Virgen del Rocío.

Para alcanzar el objetivo principal, y confirmar las hipótesis planteadas se establecieron una serie de objetivos concretos.

1. Diseño y adaptación de la PCR multiplex de los CDC a los serotipos prevalentes en nuestro medio.
2. Caracterización de los serotipos de todos los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* invasivos en población adulta y pediátrica.
3. Determinar los patrones de sensibilidad de *Streptococcus pneumoniae* a los antibióticos y determinar la prevalencia de aislados con sensibilidad disminuida a fluorquinolonas.
4. Aplicación y evaluación del método de cribado sugerido por la Sociedad Francesa de Microbiología para la detección de aislados con sensibilidad disminuida a fluorquinolonas.
5. Estudio genotípico de las mutaciones en los genes QRDR (*parC*, *parE*, *gyrA* y *gyrB*) que condicionan la resistencia a fluorquinolonas.
6. Estudio de clonalidad de todos los aislamientos invasivos por electroforesis en campo pulsante, tras tratamiento con endonucleasas de restricción SmaI.
7. Correlacionar los datos microbiológicos y las manifestaciones clínicas de la enfermedad invasiva y evolución final de la misma.

4. MATERIAL

4. MATERIAL

4.1. MICROORGANISMOS

4.1.1. Muestras y aislamientos

Se recopilaron 274 aislamientos invasivos de *Streptococcus pneumoniae* procedentes de distintas muestras clínicas procesadas en el laboratorio de Microbiología y Parasitología Clínica de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío de Sevilla durante 2001-2008.

Todos los aislamientos fueron recuperados de líquidos estériles: sangre (222 aislamientos), líquido cefalorraquídeo (19 aislamientos), sangre y líquido cefalorraquídeo (19 aislamientos), líquido pleural (10 aislamientos), biopsia pulmonar (1), líquido peritoneal (1) y líquido sinovial (2 aislamientos).

115 de estos aislamientos pertenecían a pacientes pediátricos y 159 a adultos. 96 de los 115 aislamientos pediátricos fueron serotipados previamente mediante reacción de Quellung en el Laboratorio de Referencia de Neumococos del Centro Nacional de Microbiología.

Todos los aislamientos utilizados en este estudio procedían de pacientes distintos, excepto en un caso en el que un paciente tuvo dos episodios de ENI separados en el tiempo. En la siguiente tabla se muestra la relación de cepas y su año de aislamiento junto con el tipo de muestra y el servicio:

Tabla 1: Cepas invasivas de *Streptococcus pneumoniae* por año de aislamiento.

Nº	Año	Muestra	Servicio
1	2001	Sangre	H. Infantil
2	2001	Sangre	H. Infantil
3	2001	Sangre	H. Infantil
4	2001	Sangre	H. Infantil
5	2001	Sangre	H. Infantil
6	2001	Sangre	H. Infantil
7	2001	L.C.R.	H. Infantil
8	2001	Sangre	H. Infantil
9	2002	L.C.R./Sangre	H. Infantil
10	2002	L.C.R./Sangre	H. Infantil
11	2002	Sangre	H. Infantil
12	2002	L. pleural	H. Infantil
13	2002	Sangre	H. Infantil
14	2002	L. pleural	H. Infantil
15	2002	Sangre	H. Infantil
16	2002	L.C.R.	H. Infantil
17	2002	L.C.R./Sangre	H. Infantil
18	2002	Sangre	H. Infantil
19	2002	Sangre	H. Infantil
20	2003	Sangre	H. Infantil
21	2003	Sangre	H. Infantil
22	2003	Sangre	H. Infantil
23	2003	Sangre	H. Infantil
24	2003	Sangre	H. Infantil
25	2003	Sangre	H. Infantil
26	2003	Sangre	H. Infantil
27	2003	L.C.R./Sangre	H. Infantil
28	2003	L. articular	H. Infantil
29	2003	Sangre	H. Infantil
30	2003	Sangre	H. Infantil
31	2003	L.C.R.	H. Infantil
32	2003	L.C.R.	H. Infantil
33	2003	Sangre	H. Infantil
34	2003	Sangre	H. Infantil
35	2003	Sangre	H. Infantil
36	2003	Sangre	H. Infantil
37	2004	L.C.R.	H. Infantil
38	2004	Sangre	H. Infantil
39	2004	Sangre	H. Infantil
40	2004	Sangre	H. Infantil
41	2004	Sangre	H. Infantil
42	2004	Sangre	H. Infantil
43	2004	Sangre	H. Infantil
44	2004	L.C.R./Sangre	H. Infantil
45	2004	L.C.R./Sangre	H. Infantil
46	2004	Sangre	H. Infantil

N°	Año	Muestra	Servicio
47	2004	L.C.R.	H. Infantil
48	2004	Sangre	Observación
49	2004	Sangre	H. Infantil
50	2004	Sangre	Infecciosos
51	2004	Sangre	Medicina interna
52	2004	Sangre	Urgencias
53	2004	Sangre	H. Infantil
54	2004	Sangre	Reumatología
55	2004	Sangre	U.C.I.
56	2004	Sangre	Urgencias
57	2004	Sangre	U.C.I.
58	2004	Sangre	U.C.I.
59	2004	Sangre	Respiratorio
60	2004	L.C.R.	U.C.I.
61	2005	L. pleural	H. Infantil
62	2005	L. pleural	H. Infantil
63	2005	Sangre	H. Infantil
64	2005	Sangre	H. Infantil
65	2005	L.C.R./Sangre	H. Infantil
66	2005	L. pleural	H. Infantil
67	2005	Sangre	H. Infantil
68	2005	Sangre	H. Infantil
69	2005	Sangre	H. Infantil
70	2005	Sangre	H. Infantil
71	2005	L.C.R./Sangre	H. Infantil
72	2005	Sangre	H. Infantil
73	2005	Sangre	H. Infantil
74	2005	Sangre	H. Infantil
75	2005	Sangre	H. Infantil
76	2005	Sangre	H. Infantil
77	2005	Sangre	H. Infantil
78	2005	L.C.R.	H. Infantil
79	2005	L.C.R./Sangre	H. Infantil
80	2005	Sangre	H. Infantil
81	2005	Sangre	U.C.I.
82	2005	Sangre	U.C.I.
83	2005	Sangre	Urgencias
84	2005	Sangre	U.C.I.
85	2005	Sangre	U.C.I.
86	2005	Sangre	Respiratorio
87	2005	Sangre	Urgencias
88	2005	Sangre	Oncología
89	2005	Sangre	D. del Infantado
90	2005	Sangre	Respiratorio
91	2005	Sangre	Reumatología
92	2005	Sangre	Infecciosos
93	2005	Sangre	Desconocido

N°	Año	Muestra	Servicio
94	2005	Sangre	D. del Infantado
95	2005	Sangre	Urgencias
96	2005	Sangre	Oncohematología
97	2005	Sangre	D. del Infantado
98	2005	Sangre	Oncología
99	2005	Sangre	Urgencias
100	2005	Sangre	Urgencias
101	2005	Sangre	D. del Infantado
102	2005	Sangre	U.C.I.
103	2005	Sangre	U.C.I.
104	2005	Sangre	Infecciosos
105	2005	Sangre	Observación
106	2005	Sangre	U.C.I.
107	2005	Sangre	Infecciosos
108	2005	Sangre	Oncología
109	2005	L.C.R.	Observación
110	2005	Sangre	U.C.I.
111	2005	Sangre	U.C.I.
112	2005	Sangre	Digestivo
113	2005	L.C.R.	U.C.I.
114	2005	Sangre	Reumatología
115	2005	Sangre	U.C.I.
116	2005	L.C.R.	U.C.I.
117	2005	L.C.R.	Observación
118	2005	Sangre	Observación
119	2006	Sangre	H. Infantil
120	2006	Sangre	H. Infantil
121	2006	Sangre	H. Infantil
122	2006	Sangre	H. Infantil
123	2006	Sangre	H. Infantil
124	2006	Sangre	H. Infantil
125	2006	Sangre	H. Infantil
126	2006	Sangre	H. Infantil
127	2006	L. pleural	H. Infantil
128	2006	L.C.R./Sangre	H. Infantil
129	2006	L.C.R.	H. Infantil
130	2006	L. pleural	H. Infantil
131	2006	L. pleural	H. Infantil
132	2006	Sangre	H. Infantil
133	2006	Sangre	H. Infantil
134	2006	Sangre	H. Infantil
135	2006	Sangre	H. Infantil
136	2006	Sangre	H. Infantil
137	2006	Sangre	H. Infantil
138	2006	L.C.R.	H. Infantil
139	2006	Sangre	H. Infantil
140	2006	L.C.R.	H. Infantil

N°	Año	Muestra	Servicio
141	2006	Sangre	H. Infantil
142	2006	Sangre	Observación
143	2006	Sangre	U.C.I.
144	2006	L.C.R	U.C.I.
145	2006	Sangre	Medicina interna
146	2006	Sangre	Urgencias
147	2006	Sangre	Medicina interna
148	2006	Sangre	Oncohematología
149	2006	Sangre	Infecciosos
150	2006	Sangre	Medicina interna
151	2006	Sangre	Medicina interna
152	2006	Sangre	H. Infantil
153	2006	Sangre	U.C.I.
154	2006	L. pleural	Observación
155	2006	Sangre	Infecciosos
156	2006	Sangre	Infecciosos
157	2006	Sangre	U.C.I.
158	2006	Sangre	Medicina interna
159	2006	Sangre	Urgencias
160	2006	Sangre	Observación
161	2006	Sangre	Observación
162	2006	Sangre	Observación
163	2006	Sangre	U.C.I.
164	2006	Sangre	Respiratorio
165	2006	Sangre	U.C.I.
166	2006	Sangre	Oncohematología
167	2006	Sangre	Observación
168	2006	Sangre	Urgencias
169	2006	Sangre	Observación
170	2006	Sangre	Infecciosos
171	2006	Sangre	Respiratorio
172	2006	Sangre	Reumatología
173	2007	L.C.R	H. Infantil
174	2007	Sangre	H. Infantil
175	2007	Sangre	H. Infantil
176	2007	Sangre	H. Infantil
177	2007	L.C.R	H. Infantil
178	2007	Sangre	H. Infantil
179	2007	Sangre	H. Infantil
180	2007	Sangre	H. Infantil
181	2007	Sangre	H. Infantil
182	2007	Sangre	H. Infantil
183	2007	Sangre	H. Infantil
184	2007	Sangre	Medicina interna
185	2007	Sangre	Observación
186	2007	Sangre	U.C.I.
187	2007	Sangre	Medicina interna

N°	Año	Muestra	Servicio
188	2007	Sangre	Traumatología
189	2007	L.C.R./Sangre	U.C.I.
190	2007	Sangre	D. del Infantado
191	2007	Sangre	U.C.I.
192	2007	Sangre	Recoger lab
193	2007	Sangre	U.C.I.
194	2007	Sangre	Psiquiatría
195	2007	L.C.R	Traumatología
196	2007	Sangre	Medicina interna
197	2007	Sangre	Oncohematología
198	2007	Sangre	H. Infantil
199	2007	Sangre	H. Infantil
200	2007	Sangre	Observación
201	2007	Sangre	Infecciosos
202	2007	Sangre	Infecciosos
203	2007	Sangre	Urgencias
204	2007	Sangre	Cardiología
205	2007	Sangre	Urgencias
206	2007	Sangre	Reumatología
207	2007	Sangre	Observación
208	2007	Sangre	U.C.I.
209	2007	Sangre	U.C.I.
210	2007	Sangre	D. del Infantado
211	2007	Sangre	Medicina interna
212	2007	Sangre	Observación
213	2007	Sangre	Observación
214	2007	Sangre	D. del Infantado
215	2007	Sangre	D. del Infantado
216	2007	Sangre	H. Infantil
217	2007	Sangre	Urgencias
218	2007	Sangre	U.C.I.
219	2007	Sangre	Urgencias
220	2007	Sangre	Observación
221	2007	Sangre	Reumatología
222	2007	L.C.R./Sangre	H. VALME
223	2008	Sangre	Urgencias
224	2008	Sangre	D. del Infantado
225	2008	Sangre	Medicina interna
226	2008	Sangre	Urgencias
227	2008	Sangre	Consultas externas
228	2008	Sangre	U.C.I.
229	2008	Sangre	U.C.I.
230	2008	Sangre	Medicina interna
231	2008	Sangre	H. Infantil
232	2008	Sangre	Trasplante
233	2008	Sangre	Reumatología
234	2008	Sangre	Cardiología

N°	Año	Muestra	Servicio
235	2008	Sangre	Reumatología
236	2008	Sangre	Urgencias
237	2008	L.C.R	U.C.I.
238	2008	Sangre	Infecciosos
239	2008	Sangre	Medicina interna
240	2008	Sangre	Urgencias
241	2008	Sangre	Urgencias
242	2008	Sangre	Urgencias
243	2008	L.C.R./Sangre	U.C.I.
244	2008	Sangre	Urgencias
245	2008	Sangre	H. Infantil
246	2008	Sangre	Medicina interna
247	2008	Sangre	H. Infantil
248	2008	Sangre	Observación
249	2008	Sangre	Observación
250	2008	Sangre	Urgencias
251	2008	Sangre	Observación
252	2008	Sangre	Infecciosos
253	2008	Sangre	H. Infantil
254	2008	Sangre	Urgencias
255	2008	Sangre	Observación
256	2008	Sangre	Medicina interna
257	2008	L.C.R./Sangre	H. Infantil
258	2008	Sangre	Urgencias
259	2008	Sangre	Dialisis
260	2008	Sangre	Medicina interna
261	2008	L. Pleural	H. Infantil
262	2008	Sangre	H. Maternal
263	2008	Sangre	Respiratorio
264	2008	Sangre	VALME
265	2008	Sangre	VALME
266	2008	Sangre/peritoneal	Medicina Interna
267	2008	Sangre	Urgencias
268	2008	Bx. Pulmonar	H. Infantil
269	2008	L.C.R./Sangre	H. Infantil
270	2008	Sangre	Respiratorio
271	2008	L. Sinovial	Observación
272	2008	L.C.R./Sangre	U.C.I.
273	2008	Sangre	Medicina interna
274	2008	Sangre	Urgencias

4.1.2. Cepa patrón

Como cepa control se utilizó *S. pneumoniae* ATCC 49619.

4.2. PRODUCTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS

- Ácido bórico (Pharmacia Biotech 17-1322-01)
- Ácido clorhídrico concentrado (Panreac 181345).
- Agarosa (Bethesda Research 5510UB).
- Agarosa de bajo punto de fusión (Low Melt Preparative Grade Agarose, Bio-Rad 162-0017)
- Agarosa para PFGE (Pulsed Field Certified Agarose, Bio-Rad 162-0137)
- Agua destilada ultrapura
- Albúmina Bovina Sérica (Sigma A 2153)
- ARNasa (Promega 0890).
- Blood & Tissue Kit (250) (DNeasy® Qiagen 69506)
- Brij-58 (Sigma P5884-1006 102K0205)
- Bromuro de Etidio (Roche Molecular Biochemicals 200 271).
- Buffer Tampón de restricción (Roche Diagnostics 10 656 348001)
- CAP-Resistenz (GenID® GmbH, RDB2145 12 tests).
- Cloruro Sódico (Panreac 131659).
- Decolorizador (Francisco Soria Melguizo S.A. 99 48 63)
- dNTP Desoxinucleótidos trifosfato (10mM) (Amershan Pharmacia Biotech US77118)
- EDTA Na₂ o ácido etilendiaminotetracético disódico (Sigma E-5134)
- Enzima de restricción *Sma*I (Roche Diagnostics 10 656 348001)

- Etanol absoluto 98% (Disco E-7148)
- GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase (Promega M8305)
- Hidróxido sódico (Panreac 131687)
- Lauril sulfato sódico (SDS) (Sigma L5750)
- Lisozima clorhídrica (Roche Molecular Biochemicals 1 585 657)
- Marcador de peso molecular Lambda Ladders PFG Marker (BioLabs N0340S)
- Marcador de peso molecular Low Range PFG Marker (BioLabs N0350S)
- N-lauroylsarcosina (Feinbiochemica-Heidelberg Serva 27570)
- Norfloxacin polvo (Sigma-Aldrich N9890).
- Optoquina (Oxoid X3483A)
- Pastorex[™] Meningitis (Bio-Rad 61607).
- Patrón de peso molecular BPL-100 (Arnershan Pharmacia Biotech 27-4001-01).
- Proteinasa-K (Sigma P6556)
- PCR Purification Kit (250)(QIAquick[®] Quiagen 28106)
- Reserpina en polvo 1g (Sigma-Aldrich R-0875).
- Safranina (Francisco Soria Melguizo S.A. 99 85 50)
- Sales de bilis (Oxoid; BBL (BD)
- Tris-Clorhídrico (Roche Molecular Biochemicals 812846)
- Trizma base o Tris-base (Sigma T-8404)

- Slidex Pneumo-kit® (Biomérieux 58821).
- Suero fisiológico (Suspensión médium. Biomérieux®)
- Violeta Cristal (Francisco Soria Melguizo S.A. 99 87 42)
- Yodo (Francisco Soria Melguizo S.A. 99 80 65)

4.3. AGENTES ANTIMICROBIANOS

En la realización de las pruebas de sensibilidad de las cepas estudiadas se emplearon los siguientes antimicrobianos:

- Penicilina E-test (Biomérieux 502518)
- Cefotaxima E-test (Biomérieux 505618)
- Eritromicina E-test (Biomérieux 510518)
- Meropenem E-test (Biomérieux 513808)
- Levofloxacino E-test (Biomérieux 527418)
- Vancomicina E-test (Biomérieux 525518)
- Norfloxacino E-test (Biomérieux 519508)
- Norfloxacino 5µg disco (Oxoid CT0668B)

4.4. MEDIOS DE CULTIVO

- Agar sangre (BioMérieux)
 - Sangre desfibrinada estéril.....5 ml
 - Agar nutritivo modificado.....100 ml

- Mueller Hinton con sangre (Biomérieux)
- Caldo Mueller Hinton (Scharlau Chemie, S.A)
 - Peptona.....17,5 g
 - Almidón.....1,5 g
 - Infusión de carne.....2 g

El pH final es 7.3 +/- 0.2. Para su preparación se añaden 21 g de polvo por litro de agua destilada. Autoclavar.

4.5. SOLUCIONES Y TAMPONES

4.5.1. Soluciones para electroforesis

➤ Tampón de carga :

- Azul de bromofenol.....0,25% (p/v)
- Xylene cyanole FF.....0,25% (p/v)
- Glicerol.....30% (p/v)

Disolver los componentes para un volumen total de 10 ml.

4.5.2. Soluciones para electroforesis en campo pulsado (ECP)

➤ Solución PIV :

- Tris-HCl 1M pH8.....10 ml
- NaCl 5M.....200 ml
- Agua destilada estéril.....790 ml

Autoclavar en alícuotas de 250 ó 500 ml.

➤ Solución EDTA Na₂ 0,5 M a pH 8:

- EDTA Na₂.....18,61 g
- Hidróxido sódico.....2 g
- Agua destilada.....80 ml

Disolver el EDTA Na₂ en el agua destilada a 60°C en agitación. Añadir el hidróxido sódico ajustando el pH. Completar con agua destilada hasta 100mL. Autoclavar y conservar a temperatura ambiente.

➤ Tampón Tris-EDTA (TE) 10x pH 8 :

- Tris-HCl 1 M pH 8.....1 ml
- EDTA Na₂ 0,5 M a pH 8.....0,2 ml
- Agua destilada.....98,8 ml

Autoclavar y guardar a temperatura ambiente. Diluir TE 10x a 1/10 para obtener TE 1x, y a 1/100 para obtener TE 0,1x.

➤ Solución de lisozima (50 mg/ml):

- Lisozima.....50 mg
- Agua destilada estéril.....1 ml

Conservar en pequeñas alícuotas a -20°C.

➤ Solución de Lauryl Sulfato Sódico (SDS) al 10% :

- SDS.....10 g
- Agua destilada.....100 ml

Disolver a 65° durante 20 minutos. Conservar a temperatura ambiente.

➤ Solución de Proteinasa K (10 mg/ml) :

- Proteinasa K.....10 mg
- Agua destilada estéril.....1 ml

Conservar en pequeñas alícuotas a -20°C.

➤ Solución de Cloruro sódico (NaCl) 5 M :

- NaCl.....29,2 g
- Agua destilada.....100 ml

Autoclavar y conservar a temperatura ambiente.

➤ Solución básica de lisis (ST):

- Tris-HCl 1M pH 8.....0,6 ml
- NaCl 5 M.....20 ml
- EDTA 0,5 M pH 8.....20 ml
- SDS 10 %.....2 ml
- Sarcosil 10 %.....5 ml
- Agua destilada (c.s.p.)100 ml

Completar con agua destilada hasta 100ml. Autoclavar en alícuotas de 100 ó 200 ml.

➤ Solución para la incubación con proteinasa-K(ES):

- EDTA Na₂ 0,5 M pH 8.....90 ml
- Sarcosil 10%.....10 ml

Autoclavar en alícuotas de 100 ó 200 ml.

- Tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 10x pH 8:
- Tris base.....108 g
 - Ácido bórico.....55 g
 - EDTA Na₂ 0,5 M pH 8.....40 ml
 - Agua destilada (c.s.p).....1L

Disolver los componentes. Autoclavar y guardar a temperatura ambiente.

- Solución de bromuro de etidio (10 mg/ml)(BrEt):
- Bromuro de Etidio.....1 g
 - Agua destilada.....100 ml

Disolver con ayuda de un agitador magnético durante varias horas hasta disolver el colorante. Cubrir el recipiente con papel de aluminio y conservar a temperatura ambiente.

4.6. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ANTIBIÓTICO Y RESERPINA

Norfloxacino

La solución madre del norfloxacino se preparó a una concentración de 1 mg/ml en NaOH 0.5 N. Se conservaron a -20 °C y protegidas de la luz.

Reserpina

La reserpina se preparó en una solución al 50% (v/v) de agua y metanol y a una concentración de ácido acético del 1%.

5. MÉTODOS

5. MÉTODOS

5.1. ESTUDIO DE LOS DATOS CLÍNICOS

Los datos clínicos y demográficos del estudio se obtuvieron mediante la revisión de la historia clínica. Las comparaciones entre los datos obtenidos como variables independientes se llevaron a cabo mediante el análisis de Chi cuadrado (χ^2) para variables cualitativas.

5.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS

Los neumococos estudiados en este trabajo fueron aislados a partir de muestras invasivas siguiendo los Protocolos Normalizados de Trabajo de cada sección correspondiente del Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica de los HH.UU. Virgen del Rocío de Sevilla.

Todas las muestras se sembraron en agar-sangre y fueron cultivadas en un 5% de CO₂ a 37°C durante 24-48 horas.

Se recuperaron 274 aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* de un total de 560 que hubo entre 2002 y 2008 en Sevilla, 115 aislamientos pediátricos, de los cuales 96 fueron previamente serotipados de modo convencional, y 159 aislamientos de adultos. Todos los aislamientos recuperados fueron de muestras invasivas: sangre, LCR, líquido peritoneal, biopsia pulmonar, líquido pleural y líquido sinovial.

5.3. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN Y SENSIBILIDAD

Los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* se identificaron basándose en la morfología de las colonias, la sensibilidad a la optoquina y la solubilidad en bilis. Así, a las colonias α -hemolíticas, ya fueran mucosas o con el centro de la colonia umbilicado, se les realizó la prueba de sensibilidad a optoquina y solubilidad en bilis para diferenciar

a *Streptococcus pneumoniae* de los demás estreptococos α -hemolíticos. Las pruebas de aglutinación en latex comercialmente disponibles (Slidex Pneumo-kit® o Pneumoslide™) se utilizaron también para ayudar a identificar algunos aislamientos de *S. pneumoniae* en placas de agar sangre. En las muestras en las que se requirió una tinción de Gram urgente y se observaron cocos lanceolados grampositivos agrupados en pares haciendo contacto por sus extremos (diplococos), la identificación se orientó hacia el neumococo realizándose una aglutinación con el método comercial de aglutinación (Pastorex™ Meningitis) en muestra directa. La conservación de los microorganismos se realizó a -70° C en viales específicos con un medio especial basado en leche para la conservación de microorganismos.

Pruebas de identificación

➤ Tinción de Gram:

- Preparar frotis para microscopía.
- Cubrir la preparación con colorante cristal violeta durante 1 minuto.
- Lavar con agua.
- Añadir lugol. Dejar actuar 30 segundos
- Lavar con agua.
- Decolorar con alcohol etílico durante aproximadamente 10 segundos.
- Lavar con abundante agua, para bloquear la decoloración
- Cubrir con safranina durante 1 minuto.
- Lavar con agua.
- Secar a temperatura ambiente.
- Observar al microscopio con objetivo de inmersión (100x). Las bacterias Gram positivas se observaran teñidas de color violeta, y las Gram negativas de color rojo.

- Prueba de sensibilidad a la optoquina
 - La prueba de sensibilidad a la optoquina se realizó con un disco de 6 mm y 5 µg de optoquina (Oxoid; BBL (BD)). Con esto diferenciamos las cepas de *S. pneumoniae* de las de estreptococo viridans. Las cepas sensibles a optoquina corresponden a *S. pneumoniae*.

- Prueba de solubilidad en bilis
 - La prueba de solubilidad en bilis se desarrolló en aislamientos con pequeñas zonas de inhibición en la prueba de sensibilidad a la optoquina. Se desarrolló usando el método en tubo, añadiendo 0,25ml de desoxicolato de sodio al 2% (sales biliares) a uno de los tubos con una suspensión de células bacterianas con una turbidez de 0,5 McFarland y suero salino al otro tubo. A continuación se comprobó la turbidez visualmente (10).

Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

- Método de difusión en placa

Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana de los neumococos se realizaron mediante el método de difusión en placa usando tiras de E-test de diferentes antimicrobianos.

Para la preparación del inóculo, se recogieron varias colonias del microorganismo con ayuda de un asa estéril desechable de la placa de aislamiento. Se suspendieron en un tubo con de 2 ml de suero fisiológico (Suspensión médium. Biomérieux®). Se agitaron hasta la completa disolución de las colonias y se ajustó con la ayuda de un turbidímetro a la concentración de 0.5 McFarland.

A continuación se introdujo un hisopo dentro de la suspensión de neumococo y se inocularon las placas de Müller-Hinton previamente retiradas de la nevera para que estuvieran a temperatura ambiente en el momento de su utilización.

Posteriormente se colocaron las tiras de E-test manualmente, asegurándose de que contacten perfectamente con la superficie del agar.

La interpretación del antibiograma se realizó siguiendo las recomendaciones del CLSI de cada año. Teniendo en cuenta que los puntos de corte para la penicilina y la cefotaxima en el neumococo han ido cambiando, para este estudio se han seguido las recomendaciones del documento M100-S20, CLSI 2010 (110) (tabla 2).

Tabla 2: Recomendaciones del Documento M100-S20 del CLSI 2010 para el neumococo.

Antibiótico	S	I	R
Penicilina parenteral(meningitis)	$\leq 0,06$	-	$\geq 0,12$
Penicilina parenteral(no-meningitis)	≤ 2	4	≥ 8
Penicilina oral	$\leq 0,06$	0,12-1	≥ 2
Cefotaxima (meningitis)	$\leq 0,5$	1	≥ 2
Cefotaxima (no-meningitis)	≤ 1	2	≥ 4
Eritromicina	$\leq 0,25$	0,5	≥ 1
Meropenem	$\leq 0,25$	0,5	≥ 1
Levofloxacin	≤ 2	4	≥ 8
Vancomicina	≤ 1	-	-

5.4. ESTUDIO DE SEROTIPADO

5.4.1. Técnicas de Biología Molecular para estudio de serotipado

➤ **Extracción de ADN:**

La extracción del ADN se realizó a partir de cultivo puro de *Streptococcus pneumoniae* en placas de Columbia Blood agar, mediante el sistema Quiagen (DNeasy®) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se conservó a -20°C hasta su análisis.

➤ **PCR múltiple:**

El protocolo de PCR múltiple propuesto por el CDC (25) consiste en 7 reacciones secuenciales ordenadas en función de la prevalencia de serotipos. Cada una de las 7 reacciones incluye 4 parejas de cebadores dirigidas a 4 secuencias diferentes específicas de cada serotipo y un control de amplificación. Este control es una pareja de cebadores que amplifica una región muy conservada de 160 pb en el operón *cps* del neumococo (Tabla3).

Tabla 3: Serotipos y cebadores utilizados para la PCR múltiple.

Cebadores	Secuencia de cebadores (5'→3')	Concentración (μM)	Tamaño del producto (bp)
1-f	CTC TAT AGA ATG GAG TAT ATA AAC TAT GGT TA	1,5	280
1-r	CCA AAG AAA ATA CTA ACA TTA TCA CAA TAT TGG C	1,5	
3-f	ATG GTG TGA TTT CTC CTA GAT TGG AAA GTA G	1,5	371
3-r	CTT CTC CAA TTG CTT ACC AAG TGC AAT AAC G	1,5	
4-f	CTG TTA CTT GTT CTG GAC TCT CGA TAA TTG G	1,5	430
4-r	GCC CAC TCC TGT TAA AAT CCT ACC CGC ATT G	1,5	
5-f	ATA CCT ACA CAA CTT CTG ATT ATG CCT TTG TG	1	362
5-r	GCT CGA TAA ACA TAA TCA ATA TTT GAA AAA GTA TG	1	

Cebadores	Secuencia de cebadores (5'→3')	Concentración (μ M)	Tamaño del producto (bp)
6A/B-f	AAT TTG TAT TTT ATT CAT GCC TAT ATC TGG	0,5	250
6A/B-r	TTA GCG GAG ATA ATT TAA AAT GAT GAC TA	0,5	
7F-f	CCT ACG GGA GGA TAT AAA ATT ATT TTT GAG	2	826
7F-r	CAA ATA CAC CAC TAT AGG CTG TTG AGA CTA AC	2	
7C-f	CTA TCT CAG TCA TCT ATT GTT AAA GTT TAC GAC GGG A	1,5	260
7C-r	GAA CAT AGA TGT TGA GAC ATC TTT TGT AAT TTC	1,5	
8-f	GAT GCC ATG AAT CAA GCA GTG GCT ATA AAT C	1,5	294
8-r	ATC CTC GTG TAT AAT TTC AGG TAT GCC ACC	1,5	
9V-f	CTT CGT TAG TTA AAA TTC TAA ATT TTT CTA AG	1,5	753
9V-r	GTC CCA ATA CCA GTC CTT GCA ACA CAA G	1,5	
10A-f	GGT GTA GAT TTA CCA TTA GTG TCG GCA GAC	1,5	628
10A-r	GAA TTT CTT CTT TAA GAT TCG GAT ATT TCT C	1,5	
11A-f	GGA CAT GTT CAG GTG ATT TCC CAA TAT AGT G	1	463
11A-r	GAT TAT GAG TGT AAT TTA TTC CAA CTT CTC CC	1	
12F-f	GCA ACA AAC GGC GTG AAA GTA GTT G	1,5	376
12F-r	CAA GAT GAA TAT CAC TAC CAA TAA CAA AAC	1,5	
14-f	CTT GGC GCA GGT GTC AGA ATT CCC TCT AC	1,5	208
14-r	GCC AAA ATA CTG ACA AAG CTA GAA TAT AGC C	1,5	
15A-f	ATT AGT ACA GCT GCT GGA ATA TCT CTT C	1,5	436
15A-r	GAT CTA GTG AAC GTA CTA TTC CAA AC	1,5	
15B/C-f	CAT CCG CTT ATT AAT TGA AGT AAT CTG AAC C	1,5	496
15B/C-r	CTG TTC AGA TAG GCC ATT TAC AGC TTT AAA TC	1,5	
16F-f	CAT TCC TTT TGT ATA TAG TGC TAG TTC ATC C	2	988
16F-r	TTC GTG ATG ATA ATT CCA ATG ATC AAA CAA GAG	2	
17F-f	GAT GTA ACA AAT TTG TAG CGA CTA AGG TCT GC	1,5	693

Cebadores	Secuencia de cebadores (5'→3')	Concentración (μ M)	Tamaño del producto (bp)
17F-r	CTT AAT AGC TCT CAT TAT TCT TTT TTT AAG CC	1,5	
Sg18-f	TTA TCT GTA AAC CAT ATC AGC ATC TGA AAC	1,25	573
Sg18-r	GTT AGT CCT GTT TTA GAT TTA TTT GGT GAT GT	1,25	
19A-f	CAT CCG CTT ATT AAT TGA AGT AAT CTG AAC C	1	478
19A-r	GAG CAG TCA ATA AGA TGA GAC GAT AGT TAG	1	
19F-f	GTT AAG ATT GCT GAT CGA TTA ATT GAT ATC C	1,5	304
19F-r	GTA ATA TGT CTT TAG GGC GTT TAT GGC GAT AG	1,5	
20-f	GAG CAA GAG TTT TTC ACC TGA CAG CGA GAA G	1,5	514
20-r	CTA AAT TCC TGT AAT TTA GCT AAA ACT CTT ATC	1,5	
22F-f	GAG TAT AGC CAG ATT ATG GCA GTT TTA TTG TC	1,5	643
22F-r	CTC CAG CAC TTG CGC TGG AAA CAA CAG ACA AC	1,5	
23F-f	GTA ACA GTT GCT GTA GAG GGA ATT GGC TTT TC	1,5	384
23F-r	CAC AAC ACC TAA CAC ACG ATG GCT ATA TGA TTC	1,5	
31-f	GGA AGT TTT CAA GGA TAT GAT AGT GGT GGT GC	2	701
31-r	CCG AAT AAT ATA TTC AAT ATA TTC CTA CTC	2	
33F-f	GAA GGC AAT CAA TGT GAT TGT GTC GCG	1	338
33F-r	CTT CAA AAT GAA GAT TAT AGT ACC CTT CTA C	1	
34-f	GCT TTT GTA AGA GGA GAT TAT TTT CAC CCA AC	1,5	408
34-r	CAA TCC GAC TAA GTC TTC AGT AAA AAA CTT TAC	1,5	
35B-f	GAT AAG TCT GTT GTG GAG ACT TAA AAA GAA TG	1	677
35B-r	CTT TCC AGA TAA TTA CAG GTA TTC CTG AAG CAA G	1	
35F-f	GAA CAT AGT CGC TAT TGT ATT TTA TTT AAA GCA A	1,5	517
35F-r	GAC TAG GAG CAT TAT TCC TAG AGC GAG TAA ACC	1,5	
38-f	CGT TCT TTT ATC TCA CTG TAT AGT ATC TTT ATG	1,5	574
38-r	ATG TTT GAA TTA AAG CTA ACG TAA CAA TCC	1,5	

Cebadores	Secuencia de cebadores (5'→3')	Concentración (μM)	Tamaño del producto (bp)
<i>cpsA-f</i>	GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC	0,5	160
<i>cpsA-r</i>	GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC	0,5	

En este trabajo hemos modificado el orden de los cebadores con el objetivo de mejorar la eficiencia del esquema original para la vigilancia epidemiológica de nuestra área geográfica. Los principales cambios realizados fueron incluir el serotipo 5 en el esquema, concretamente en la tercera PCR y adelantar el serotipo 1 de la sexta PCR del esquema de Pai *et al.* a la tercera PCR. El resto de las combinaciones se realizaron de manera que los tamaños de los cebadores de cada reacción se diferenciaron en más de 50 pb para una mejor resolución del gel.

Tabla 4: Distribución de serotipos en el esquema propuesto por el CDC y en el esquema modificado en el Hospital Universitario Virgen Del Rocío (H.U.V.R).

	C.D.C.				H.U.V.R.			
PCR-1	19A	3	22F	6	19A	3	22F	6
PCR-2	4	14	12F	9V	4	14	12F	7F
PCR-3	23F	7F	11A	33F	1	16F	35F	5
PCR-4	19F	16F	Sg18	35B	23F	9V	11A	8
PCR-5	8	15B/C	38	31	19F	15A	18	35B
PCR-6	1	10	35F	34	33F	15B/C	38	31
PCR-7	20	7C	17F	15A	20	7C	17F	34
Srtp	5				10			

La amplificación se realizó en un termociclador Applied Biosystem 2700, utilizando un volumen total de reacción de 50 μl. Los componentes de la PCR se indican en la siguiente tabla.

Tabla 5: Mezcla de la reacción de serotipado.

	Volumen (µl)
Tampón 5x	5 µl
MgCl₂ (50mM) concentración final de 2,5 mM	2,5µl
Desoxinucleótidos (dNTPs) 10mM	2 µl
Taq DNA polimerasa (2.0 U)	0,5 µl
Cebadores 20 µM	Depende del cebador
ADN	1 µl
H₂O estéril	Hasta 50 µl

La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones:

- un primer paso de 4 min a 94 °C,
- 30 ciclos de amplificación con
 - 45 s a 94 °C
 - 45 s a 54 °C
 - 2 min 30 s a 65 °C
- 10 min a 65 °C
- Mantener a 4°C

El análisis de los productos de amplificación de la PCR se hizo mediante electroforesis de 10 µl del producto de amplificación en agarosa al 2% en TBE 0,5x durante 60 minutos a 100V.

5.4.2. Diferenciación de los serotipos 6A/B/C

Debido al alto grado de homología que existe entre los serotipos 6A/C y 6B, los fragmentos amplificados con la PCR múltiple son indistinguibles. Por ello, tras realizar el serotipado por PCR, en los aislamientos del serogrupo 6, se llevó a cabo la secuenciación del amplicón (111). Ésta se hizo tras un paso previo de purificación de los productos de PCR mediante el protocolo descrito en el MinElute 96 UF PCR Purificación kit (Quiagen, UK), obteniéndose 20 µl de producto purificado de PCR a partir de los 50 µl de la reacción de amplificación. El ADN correspondiente de cada cepa se envió a NBT (Newbiotechnic S.A.- NBT. Sevilla) para su secuenciación.

Tal y como se ha descrito previamente (111), la secuenciación permitirá detectar el polimorfismo de nucleótido simple que se encuentra en el codón 195 del gen *cps*, y que permite diferenciar el serotipo 6A del 6B. Además del polimorfismo en la posición 195, Pai *et al.* observaron otra sustitución en la posición 192 que diferenciaba todos los aislamientos del serotipo 6A del 6B (figura 1).

Figura 1: secuencia del segmento que diferencia el serotipo 6A del 6B.

	Ser	Asn
6B	TG TCT CAT GAT AAT TAT TTT GCA AA	
6A	TG GCT CAT GAT AGT TAT TTT GCA AA	
	Ala	Ser

Los cebadores utilizados para la secuenciación fueron los mismos que se utilizaron en la PCR múltiple (tabla 6).

Tabla 6: Cebadores utilizados para la secuenciación del serogrupo 6.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto	Posición del nucleótido
6A/B-f	AAT TTG TAT TTT ATT CAT GCC TAT ATC TGG	250	8656
6A/B-r	TTA GCG GAG ATA ATT TAA AAT GAT GAC TA		8877

Con la secuenciación pudimos distinguir los serotipos 6A/C del 6B. Para distinguir entre los serotipos 6A y 6C, se les realizó una PCR adicional con unos cebadores específicos del serotipo 6C (112) que permitió determinar si eran A o C. Para ello utilizamos el algoritmo de la figura 2, propuesto por Jin *et al.* (112).

Figura 2: Algoritmo de identificación de los serotipos 6A, 6B y 6C (112).

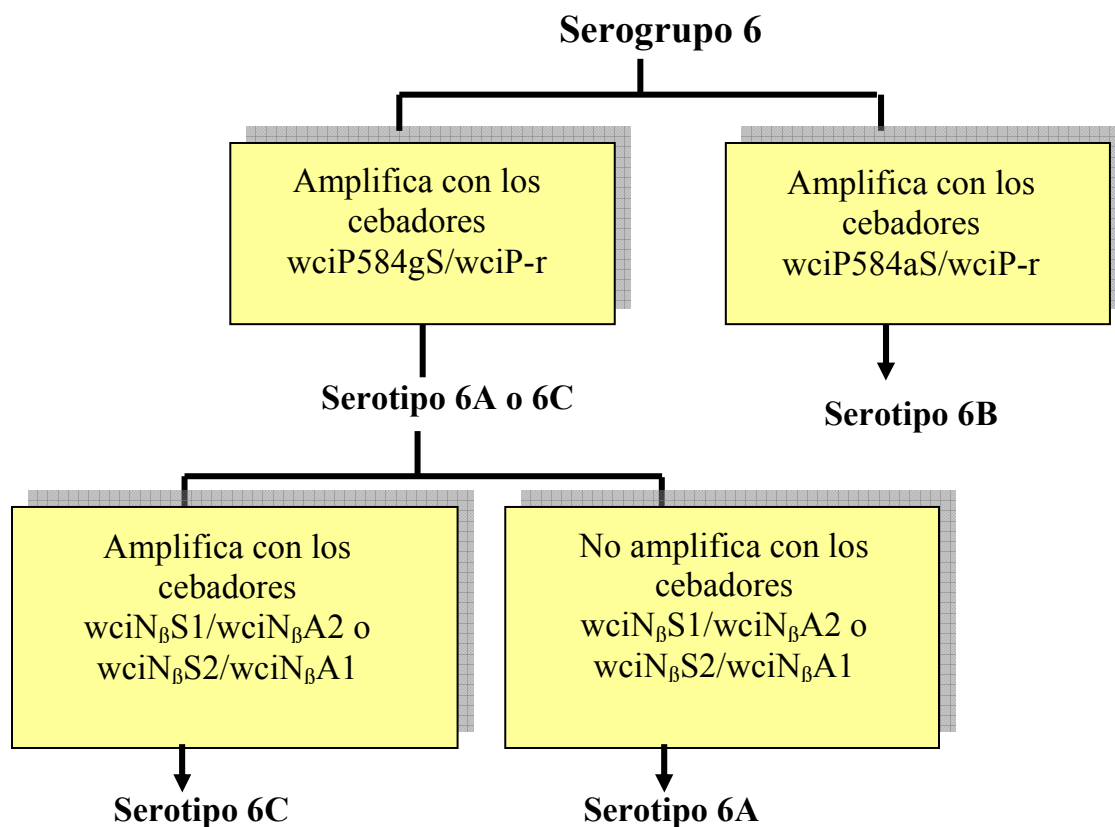


Tabla 7: Cebadores utilizados para serotipado de 6A/6B/6C.

Cebador	Serotipo	Número de acceso en GenBank	Secuencia	Posición
wciN _β S1	6C	EF538714	ATC TCT AAA TCT GAA TAT GAA GCG GCT CAA TC	6969
wciN _β S2	6C	EF538714	CGG CTC AAT CTT TAA AAA TAC CCC TTA AGA AAT TGA C	6982
wciN _β A1	6C	EF538714	CCA CCC ACC CTG TTA TAA AAA ATG AGC TTC G	7290
wciN _β A2	6C	EF538714	GAA CTG AGC TAA ATA ATC CTC TGG ATT ATC CAC C	7319
wciP584gS	6A, 6C	CR931638	ATT TAT ATA TAG AAA AAC TGG CTC ATG ATA G	8855
wciP584aS	6B	CR931639	AAG ATT ATT TAT ATA TAG AAA AAC TGT CTC ATG ATA A	8747
wciP-r	6A, 6C, 6B	AF246897	GCG GAG ATA ATT TAA AAT GAT GAC TAG TTG	8248

Los componentes de la PCR se indican en la siguiente tabla.

Tabla 8: Mezcla de la reacción de PCR para serotipado de 6A/6B/6C.

	Volumen (μl)
Tampón 10x	2,5 μl
MgCl₂ (25mM) concentración final de 1,5 mM	1,5μl
Desoxinucleótidos (dNTPs) 2,5 mM	1 μl
Taq DNA polimerasa (5 U/ μl)	0,1 μl
Cebadores (50 pmol/μl)	0,125 μl
ADN	2 μl
H₂O estéril	Hasta 25 μl

La PCR se realizó en Applied Biosystem 2700 bajo las siguientes condiciones:

- 5 min a 95°C;
- 35 ciclos de amplificación con
 - 30 s a 94 °C
 - 60 s a 62 °C
 - 60 s a 72 °C.
- 10 min a 72 °C.

El análisis de los productos de amplificación de la PCR se hizo mediante electroforesis en agarosa al 2%.

5.5. TIPIFICACIÓN MOLECULAR

5.5.1. Técnica de electroforesis en campo pulsado (ECP) para *S. pneumoniae*

La tipificación molecular de microorganismos mediante ECP tiene como objeto conocer la relación clonal entre aislados y, por tanto, derivados recientes de un microorganismo ancestral común. A la vez debe diferenciar aislados no relacionados, independientemente de que pertenezcan a la misma especie microbiológica o taxón.

La electroforesis en campo pulsado o ECP permite obtener un patrón de los fragmentos de restricción generados tras la digestión del ADN cromosómico total mediante utilización de enzimas de restricción de baja frecuencia de corte. Muchos de estos fragmentos son de gran tamaño y no pueden separarse por técnicas de electroforesis convencional, en las que se aplica un campo eléctrico constante, sino que requieren técnicas en la que la orientación del campo eléctrico sea variable

periódicamente, estas son las denominadas técnicas de electroforesis en campo pulsante (ECP) o *pulse-field gel electrophoresis*.

Mediante este procedimiento se consigue dividir el cromosoma bacteriano en patrones sencillos, de 10 a 20 bandas, lo cual facilita la comparación de unos aislados con otros, permitiendo establecer grados de similitud genética entre las bacterias estudiadas.

➤ **Extracción del ADN cromosómico**

✓ Preparación del inóculo del microorganismo

- Rotular tubos *eppendorf* de 1,5 ml con los números identificativos de cepas y dispensar 200 µl de solución PIV resuspendiendo a continuación el pellet de la cepa asignada.
- Preparar las cubetas del espectrofotómetro con 1ml de PIV y añadir 5 µl de la suspensión microbiana preparada en el apartado anterior.
- Medir la densidad óptica (OD_{620}) en el espectrofotómetro y calcular el volumen de PIV necesario para la dilución según la siguiente ecuación:

$$Vol_{dil} = (OD_{620} \times 40 \times 210) - 210$$

- Añadir el volumen de PIV necesario para la dilución anterior.
- ✓ Elaboración de los bloques de agarosa
- Mantener una solución de agarosa al 1,5% de bajo punto de fusión fundida ($>40^{\circ}C$).
 - Mezclar 200µL de la suspensión bacteriana y 200µL de la solución de agarosa fundida en nuevos *eppendorf*, convenientemente rotulados. Mezclar suavemente con la pipeta y dispensar en los moldes.

- Conservar los moldes 5 minutos a -20°C y, como mínimo, 10 minutos a temperatura ambiente.
- ✓ Lisis
 - Preparar tantos ml de tampón de lisis (ST) como microorganismos se estén analizando. Para obtener la solución de lisis, se añadiran al ST 5 μl de Rnasa (10mg/ml), 2 μl de lisozima (50mg/ml) y 50 μl de Brij al 10%. En tubos de plástico estériles desechables, convenientemente rotulados, dispensar 1ml de dicha solución.
 - Una vez transcurridos, como mínimo, 10 minutos a temperatura ambiente, transferir los bloques a tubos de 10 ml que contengan 1ml de solución de lisis. Todos los bloques obtenidos del mismo microorganismo deben depositarse en el mismo tubo.
 - Incubar a 37°C durante 5 horas.
- ✓ Tratamiento con proteinasa-K
 - Decantar la solución de lisis y sustituirla por 1 ml de una solución (ES) de proteinasa-K (1mg/ml) recién preparada
 - Incubar durante 18 horas a 50°C .
- ✓ Lavados
 - Decantar la solución de proteinasa-K y sustituirla, llenando completamente el tubo, por tampón TE. Disponer los tubos horizontalmente en un agitador orbital y mantenerlos en agitación suave durante 30-45 minutos. Al cabo de ese tiempo, decantar el TE y sustituirlo por uno nuevo repitiendo el proceso. Es necesario repetir este proceso durante 4 ó 5 veces.
 - Finalizados los lavados los bloques se conservan en TE a 4°C .

➤ **Digestión del ADN con enzimas de restricción**

- ✓ Rotular tubos *ependorf* de 1,5 ml con los números de las cepas elegidas y depositar en su interior un bloque extraído del tubo inicial.
- ✓ Preparar la solución de restricción. Esta reacción se llevará a cabo en un volumen de 60µl del tampón de restricción, al que se le añadirá 1µl de enzima de restricción *SmaI* (10 Unidades) y 1,2µl de albúmina bovina sérica (BSA).
- ✓ Añadir 60µl de la solución de restricción en cada uno de los tubos *ependorf* conteniendo el bloque correspondiente, asegurándose de que el disco queda inmerso en la solución.
- ✓ Se incuba a 25°C durante 18 horas.

➤ **Electroforesis en campo pulsátil (ECP)**

- ✓ Preparación del gel de agarosa al 1%
 - Preparar un gel de agarosa al 1% en 0,5xTBE mezclando los siguientes componentes e hirviendo durante 5-10 minutos.

Volumen final	Agarosa	10xTBE	Agua bidestilada
100 ml (16 pocillos)	1g	5 ml	95 ml
150 ml (30 pocillos)	1,5g	7,5 ml	142,4 ml

- Dejar enfriar la solución en agitación durante 30 minutos.
- Preparar el molde de ECP de BioRad, encajando la bandeja en el soporte. Seleccionar el peine correspondiente (16 ó 30 pocillos), y colocar consecutivamente en cada uno de los dientes un bloque.

Es recomendable la colocación en los extremos de los marcadores de peso molecular. Como marcador molecular se utilizó *lambda ladder* y low range (BioLabs). Colocar el peine ya cargado con los discos en las ranuras del molde de ECP.

- Verter cuidadosamente la agarosa, evitando que ésta arrastre alguno de los bloques, y esperar 30 minutos hasta que la agarosa solidifique.
- ✓ Colocación en el sistema CHEF-DRIII
- Preparar 2 L de tampón de electroforesis 0,5xTBE (100 ml 10xTBE en 1900 ml de agua bidestilada) y verter en la cubeta de electroforesis.
 - Poner en marcha.
 - Las condiciones de los pulsos para *Streptococcus pneumoniae* son 1-30s. El voltaje (*volts/cm*) siempre se mantiene en 6.00 y el ángulo se mantiene en 120°.
 - Bomba de recirculación del tampón de electroforesis. Debe programarse a una velocidad aproximada de 1L/m.
 - Se ajusta el refrigerador a 11°C y el tiempo a 20 horas.
 - Desmontar el molde que contiene al gel y depositarlo, sujeto a la bandeja, en la cubeta de ECP. Comprobar que la cubeta contiene el marco adecuado para la bandeja, ajustar ésta en el espacio correspondiente y cerrar la tapa de la cubeta.
 - Conectar los electrodos y poner en marcha el sistema.
- ✓ Extracción del gel y tinción
- Una vez finalizados los ciclos de ECP, abrir la tapa de la cubeta y extraer el gel sujeto a la bandeja. La cubeta debe vaciarse del

tampón de electroforesis, utilizando el conector designado para ello, y lavarse con agua bidestilada, si no se va a volver a utilizar inmediatamente.

- Desprender el gel de la bandeja y sumergirlo en una solución de bromuro de etidio (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 30 minutos, a temperatura ambiente.
- Visualizar el gel en el transiluminador de luz ultravioleta y fotografiarlo.

5.5.2. Análisis de los datos obtenidos por ECP

Se empleó el programa informático BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) para el análisis e interpretación de los patrones de ECP. Este programa permite establecer el valor de similitud entre patrones de electroforesis de diferentes cepas, basándose en el número de bandas obtenidas y sus correspondientes pesos moleculares. De esta forma, se crean dendogramas que permiten el agrupamiento de las cepas.

El primer paso en el análisis de los resultados es la normalización de los geles. Esta normalización consiste en asignar a estas bandas el mismo peso (posición) a pesar de las diferencias generadas en el proceso analítico. Una vez normalizados los geles, para calcular la similitud entre un par de cepas pueden usarse varios coeficientes. El más usado es el coeficiente de Dice que se basa en la posición de las bandas.

El algoritmo matemático que se utiliza más comúnmente para construir dendogramas a partir de la matriz de similitud, es el método de agrupación por pares no ponderados, usando promedios (*Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages*: UPGMA). En un dendograma, el punto de corte para considerar las cepas como relacionadas es arbitrario pero la experiencia y la concordancia de sistemas de tipado ayudan a seleccionar el más adecuado.

En nuestro estudio, se empleó el método UPGMA, según el cual, el valor de similitud entre las bandas se calcula de acuerdo a la posición de las mismas. Se usó el

coeficiente de similaridad de Dice, para la comparación de los fragmentos de ADN, con una optimización de 1% y una posición de tolerancia de 1%.

Se definió como clon a los grupos de dos o más aislamientos que presentan una similitud $\geq 90\%$ en el dendograma.

5.5.3. Estudio clonal mediante multilocus sequence typing (MLST)

El MLST es una herramienta de tipificación molecular que caracteriza los aislamientos utilizando las secuencias de ADN de fragmentos internos de genes “*housekeeping*” que codifican enzimas metabólicas. De cada gen se secuencia aproximadamente un fragmento interno de 450-500 pb. Las diferentes secuencias de cada gen se comparan con las ya existentes en una base de datos centralizada y se les asigna un número que identifica el alelo. Cada uno de estos números, define junto con los otros 6, el perfil alélico o el tipo de secuencia (“*sequence type*”) de ese aislamiento.

La mayoría de las bacterias poseen suficiente variabilidad en estos 7 genes como para que se generen billones de perfiles alélicos distinguibles. El MLST se caracteriza por asignar los alelos de los 7 loci directamente mediante secuenciación del ADN, en lugar de por la movilidad electroforética de los productos de cada gen. La ventaja del MLST frente a otras técnicas de tipificación, es la facilidad para comparar los resultados con una base de datos centralizada. Sin embargo tiene un coste mayor.

Esta técnica se realizó únicamente a las cepas de neumococo resistentes a norfloxacina.

- Extracción del ADN

La extracción del ADN se realizó a partir de cultivo puro de *Streptococcus pneumoniae* en placas de Columbia Blood agar, mediante el sistema Quiagen (DNeasy®) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se conservó a -20°C hasta su análisis.

- Amplificación del ADN por PCR

El esquema de MLST del neumococo utiliza los fragmentos internos de los siguientes 7 genes:

aroE (shikimato deshidrogenasa)

gdh (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa)

gki (glucosa kinasa)

recP (transcetolasa)

spi (peptidasa señal I)

xpt (xantina fosforribosiltransferasa)

ddl (D-alanina-D-alanina ligasa)

Los cebadores utilizados para la amplificación de los fragmentos internos de los genes anteriores fueron los siguientes (www.mlst.net):

aroE-up, 5'-GCC TTT GAG GCG ACA GC

aroE-dn, 5'-TGC AGT TCA (G/A)AA ACA T(A/T)T TCT AA

gdh-up, 5'-ATG GAC AAA CCA GC(G/A/T/C) AG(C/T) TT

gdh-dn, 5'-GCT TGA GGT CCC AT(G/A) CT(G/A/T/C) CC

gki-up, 5'-GGC ATT GGA ATG GGA TCA CC

gki-dn, 5'-TCT CCC GCA GCT GAC AC

recP-up, 5'-GCC AAC TCA GGT CAT CCA GG

recP-dn, 5'- TGC AAC CGT AGC ATT GTA AC

spi-up, 5'-TTA TTC CTC CTG ATT CTG TC

spi-dn, 5'-GTG ATT GGC CAG AAG CGG AA

xpt-up, 5'-TTA TTA GAA GAG CGC ATC CT

xpt-dn, 5'-AGA TCT GCC TCC TTA AAT AC

ddl-up, 5'-TGC (C/T)CA AGT TCC TTA TGT GG

ddl-dn, 5'-CAC TGG GT(G/A) AAA CC(A/T) GGC AT

Los componentes de la PCR se indican en la siguiente tabla:

Tabla 9: Mezcla de la reacción de PCR para amplificación de los genes “housekeeping”.

	Volumen (µl)
Tampón 10x	5 µl
Desoxinucleótidos (dNTPs) 10 mM	1 µl
Taq DNA polimerasa (5 U/ µl)	0,5 µl
Cebadores (10µM)	1 µl
ADN	1 µl
H₂O estéril	Hasta 50 µl

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

- Desnaturalización durante 5 min a 95°C
- Amplificación (30 ciclos)
 - 1 min a 95°C
 - 1 min a 50°C

- 1 min a 72°C
 - Extensión durante 30s a 72°C
 - Mantener a 4°C
-
- Purificación del ADN

La purificación del producto de amplificación tras la PCR de cada uno de los 7 cebadores se realizó con el sistema comercial QIAquick® PCR Purification Kit (250) (QUIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

- Secuenciación del ADN

El ADN correspondiente de cada fragmento y cepa se envió a NBT (Newbiotechnic S.A.- NBT. Sevilla) para su secuenciación.

- Análisis de las secuencias

Una vez obtenidas las secuencias, la asignación de cada alelo y el perfil alélico se llevó a cabo mediante la página web de MLST (www.mlst.net).

5.6. ESTUDIO DE RESISTENCIA A FLUORQUINOLONAS

La sensibilidad a levofloxacino (LVX) se determinó mediante el método de difusión E-test y la de norfloxacino (NFX) mediante el método de difusión E-test y disco de 5µg, en placas de Müller-Hinton Sangre (bioMerieux) a 0,5 McFarland. Los aislamientos con una CMI a norfloxacino >16 µg/ml y un halo de inhibición <10 mm se consideraron cepas con resistencia de primer paso o de bajo nivel y los aislamientos con una CMI a norfloxacino >16 µg/ml y una CMI a LVX ≥ 8 µg/ml, se consideraron cepas con resistencia de alto nivel.

5.6.1. Detección de mutaciones mediante hibridación con sondas

A los 14 aislamientos con la CMI a NFX >16 µg/ml se les realizó la identificación de las mutaciones que codifican la resistencia a FQs mediante amplificación por PCR seguida de una hibridación reversa con sondas específicas de las secuencias *gyrA* y *parC* (GenID® GmbH, Straßberg) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los componentes de la PCR comercial se indican en la siguiente tabla.

Tabla 10: Mezcla de la reacción de PCR para la detección de resistencias por hibridación con sondas.

	Volumen (µl)
Tampón 10x	2,5 µl
MgCl₂ (25mM) concentración final de 2 mM	2 µl
Desoxinucleótidos (dNTPs) 2,5 mM	1 µl
Taq DNA polimerasa (5 U/ µl)	0,2 µl
Cebadores	15 µl
ADN	1 µl
H₂O estéril	Hasta 25 µl

La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones:

- un primer paso de 5 min a 95 °C
- 10 ciclos con:
 - 30 s a 95 °C
 - 2 min a 60 °C
- 22 ciclos con:
 - 10 s a 95°C

- 30 s a 55°C
- 30 s a 72°C
- 8 min a 72 °C
- Mantener a 4°C

El análisis de los productos de amplificación de la PCR se hizo mediante electroforesis en agarosa al 2%, utilizando 5 µl del producto de PCR.

A continuación, siguiendo las instrucciones del fabricante, se procedió a la reacción de hibridación mediante sondas de oligonucleótidos específicos de las secuencias *gyrA* y *parC*, que se encontraban inmovilizadas en membranas de nitrocelulosa.

5.6.2. Secuenciación de los genes QRDR

Se secuenciaron los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* de los 14 aislamientos con la CMI a NFX >16 µg/L. Para ello, se realizó previamente la amplificación mediante PCR con los cebadores y las condiciones que se especifican a continuación (tabla 11 y 12) (115).

Tabla 11: Oligonucleótidos utilizados para amplificar y secuenciar los genes QRDR.

Gen amplificado	Cebador	Secuencia (5'-3')	Posición
<i>gyrA</i>	GyrA-f	CGTTTTAGTGGTTTAGAGGC	85
	GyrA-r	GACCAACTTCACTGCATCA	567
<i>gyrB</i>	GyrB-f	TTCTCCGATTTCTCATG	1105
	GyrB-r	CCCGGCTGGATATATTCT	1665
<i>parC</i>	ParC-f	CGCCCTAGATACTGTGTGA	98
	ParC-r	AAATCCCAGTCGAACCAT	493
<i>parE</i>	ParE-f	TGTGGATGGAATAGTGGC	1054
	ParE-r	ACCGAACTGTTTACGGAGT	1697

Tabla 12: Mezcla de la reacción de PCR para la detección de resistencias en los genes QRDR por secuenciación.

	Volumen (µl)
Tampón 5x	20 µl
MgCl ₂ (25mM) concentración final de 1,2 mM	6µl
Desoxinucleótidos (Concentración final 0,2 mM)	2 µl
Taq DNA polimerasa 2,5 U	0,5 µl
Cebadores (25 pmol/µl)	2,5 µl
ADN	2 µl
H ₂ O estéril	Hasta 100 µl

El volumen total de la mezcla fue de 100 μ l. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

- un primer paso de 5 min a 95 °C
- 35 ciclos de amplificación con:
 - 45 s a 95°C
 - 30 s a 55°C
 - 2,5 min a 72°C
- 10 min a 72°C

Tras la purificación de los productos de PCR con el sistema comercial QIAquick® PCR Purification Kit (250) (QUIAGEN), se envió el ADN correspondiente de cada cepa a NBT (Newbiotechnic S.A.- NBT. Sevilla) para su secuenciación. Los oligonucleótidos enviados para la iniciación de la secuenciación se describen en la tabla 11.

5.6.3. Estudio del efecto de las bombas de expulsión

En los aislamientos con la CMI a NFX >16 μ g/ml se estudió el efecto de las bombas de expulsión. Para ello, se calculó la CMI de NFX mediante la técnica de microdilución en caldo, con y sin reserpina.

- Preparación del medio Mueller-Hinton caldo.

Disolver 21 gramos del polvo Mueller-Hinton (Scharlau Chemie, S.A) en 1 litro de agua destilada. A continuación autoclavar el medio y almacenar entre 2-8°C.

El medio Mueller-Hinton fue suplementado con un 5% (v/v) de sangre de caballo. Para usar esta sangre debe estar completamente lisada, mezclando

asépticamente volúmenes iguales de sangre de caballo y agua destilada estéril y a continuación se centrifuga a 12.000 r.p.m durante 20 minutos. Una vez centrifugado se decanta el sobrenadante y se vuelve a centrifugar si es necesario. Completado este proceso la sangre lisada de caballo estaría lista para ser añadida al medio de Mueller-Hinton caldo a una concentración final de 5%.

➤ Solución de NFX

En la preparación de la solución de NFX se utilizó polvo valorado suministrado por Sigma® y se siguieron las normas del *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) (114), utilizándose concentraciones de antimicrobiano decrecientes desde 1024 a 1 µg/ml.

➤ Cepas Patrón

Se utilizó *S. pneumoniae* ATCC 49619 como cepa control.

➤ Pruebas de sensibilidad en caldo

- Inóculo bacteriano: Se utilizó un inóculo de 5×10^5 UFC/ml para cada una de las cepas estudiadas. Se preparó un inóculo de 0,5 McFarland (1×10^8 UFC/ml) en 2 ml de medio de suspensión a partir de un cultivo puro. Se ajusta este inóculo, se preparan tubos estériles con 10 ml de medio Mueller-Hinton caldo y se añade 100 µl del inóculo 0,5 McFarland. Esta dilución, 1:100, es la que se usa para inocular las placas de microdilución.
- Inoculación de placas de microdilución: Se inoculan todos los pocillos con 50 µl de Mueller-Hinton caldo (Scharlau Chemie, S.A). Se añaden 50 µl del antibiótico en una concentración dos veces superior a la que desee tener en ese pocillo. Se pasan 50 µl desde este pocillo al pocillo siguiente y así sucesivamente con lo que vamos realizando diluciones seriada en suero fisiológico (Suspensión médium. Biomérieux®). Finalmente se añaden 50 µl del inóculo bacteriano excepto en el pocillo correspondiente al control de esterilidad. Se prepararon placas de

microdilución por duplicado, y en una de ellas se añadió reserpina (10 $\mu\text{g/ml}$) al caldo de Mueller-Hinton con NFX.

- Incubación: Todas las placas se incubaron a 35°C durante 20-24 horas.
- Lectura de las placas: Para la lectura de las placas nos basamos en la definición de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), que se define como la concentración más baja de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento de los microorganismos en los pocillos de la placa de microdilución detectado de forma visual. Los aislamientos que con reserpina mostraron una disminución de cuatro o más diluciones en su CMI, se consideraron positivos al efecto de la reserpina y por tanto al efecto de las bombas de expulsión.

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

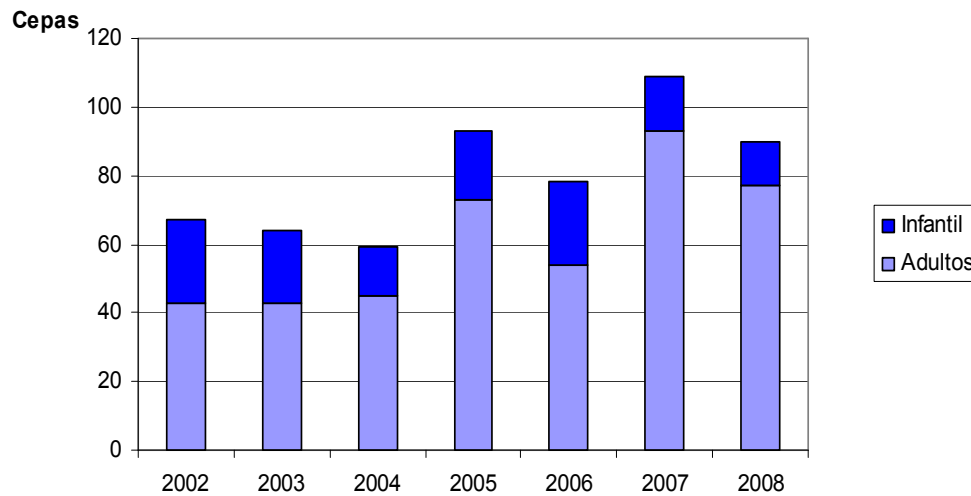
6.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LOS CASOS DE ENI

En el periodo 2002-2008, se aislaron en nuestro centro 560 cepas invasivas de *Streptococcus pneumoniae* [132 muestras de niños (21 LCR, 9 líquidos pleurales, 102 hemocultivos) y 428 muestras de adultos (49 LCR, 38 líquidos pleurales, 7 líquidos articulares, 2 líquidos peritoneales y 332 hemocultivos)]. En la tabla 13 podemos observar el número total de neumococos aislados por año en adultos y niños, considerándose como niños los menores de 15 años.

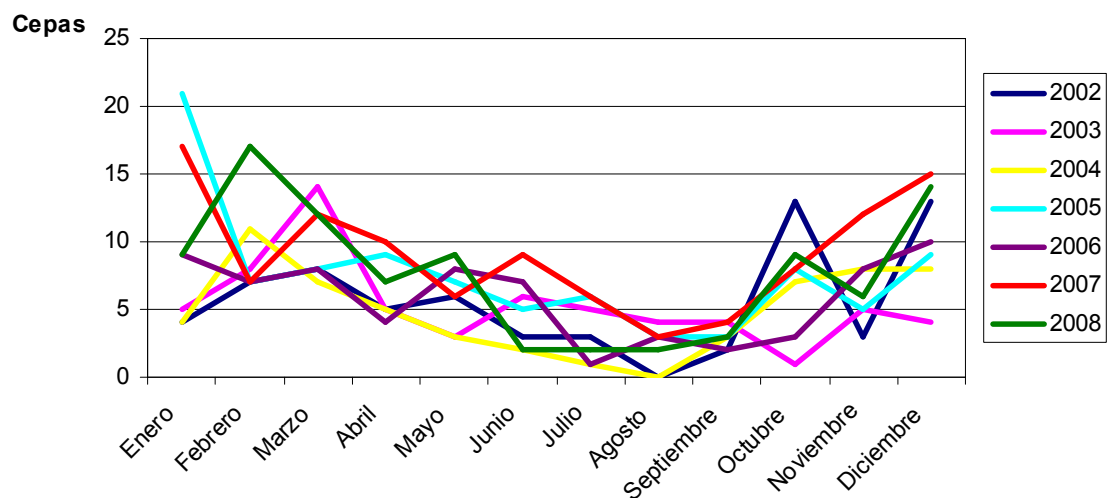
Tabla 13: Distribución interanual de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*.

Año	Cepas totales	Adultos	Niños
2002	67	43	24
2003	64	43	21
2004	59	45	14
2005	93	73	20
2006	78	54	24
2007	109	93	16
2008	90	77	13
Total	560	428	132

Se puede observar tanto, en la tabla 13 como en la figura 3, un aumento de casos totales a partir del año 2005, alcanzándose el pico máximo con 109 aislamientos en el año 2007. Este aumento de aislamientos de los últimos 4 años es debido a casos diagnosticados en adultos. En niños, sin embargo, no se ha detectado tendencia a la subida.

Figura 3: Distribución interanual de los aislamientos en adultos y niños.

Cuando estudiamos la distribución de los neumococos aislados en el laboratorio en función de los meses y comparamos los diferentes años, vimos que el patrón que seguían era siempre el mismo. Entre septiembre y octubre empiezan a aumentar los casos, alcanzando los picos entre diciembre y marzo y disminuyendo de nuevo hasta septiembre. El mayor número de casos coincide con la época invernal y el menor con el verano (Figura 4).

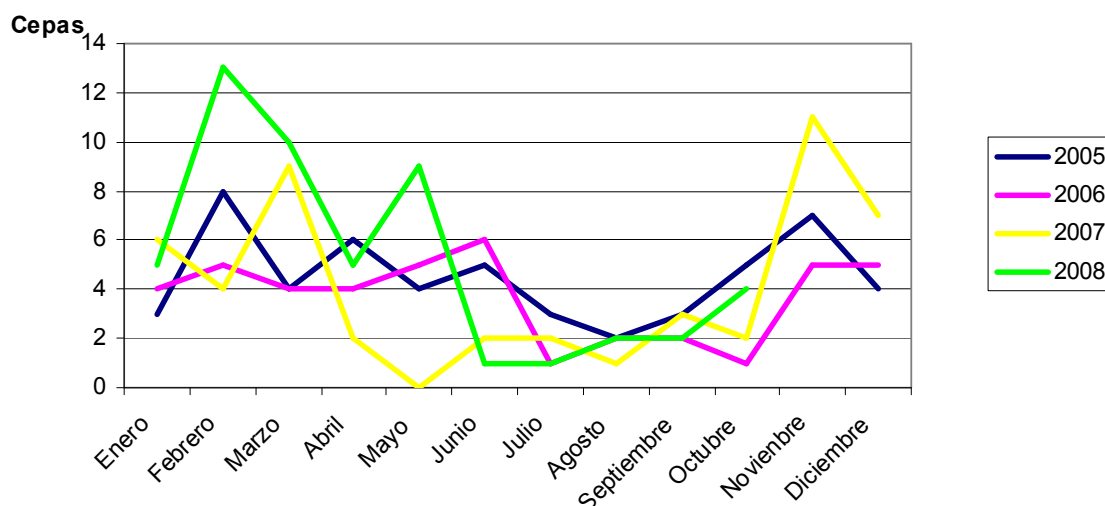
Figura 4: Distribución mensual de los aislamientos.

Debido a que el trabajo descriptivo se diseñó de manera retrospectiva, no se pudieron rescatar todas las cepas aisladas en el periodo de estudio, por lo que estas

cifras se han obtenido de la base de datos donde se archiva el trabajo diario del Servicio de Microbiología.

En la figura 5 se observa la representación de la distribución mensual de las cepas incluidas en el estudio entre 2005 y 2008, comprobándose que el patrón que siguen nuestras cepas es similar al número total de cepas.

Figura 5: Distribución mensual de los aislamientos incluidos en el estudio.



En la tabla 14 se muestra el número de cepas recuperadas en total y las que pertenecían a adultos y niños. En la columna del número total de cepas, entre paréntesis, se indica el porcentaje de cepas recuperadas del total de cepas que se aislaron ese año.

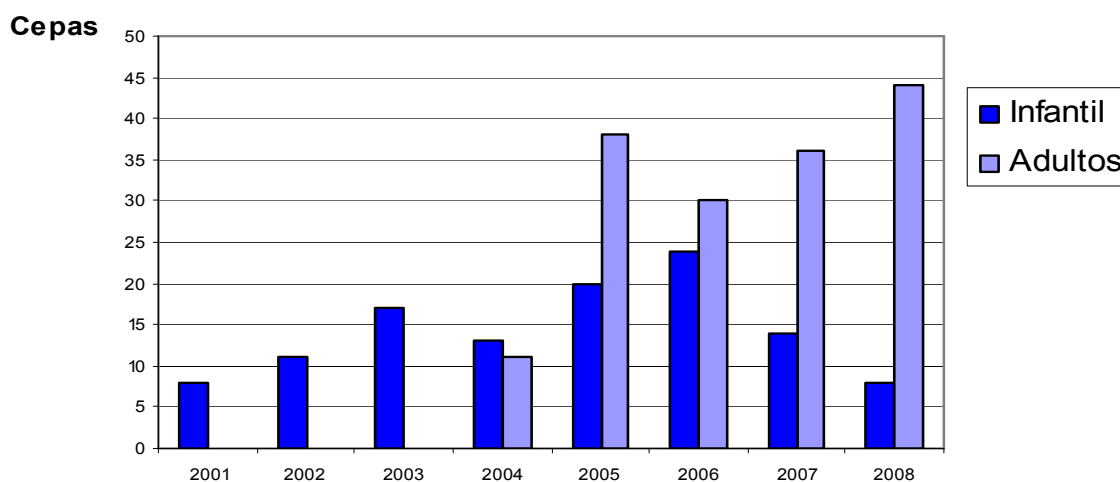
Tabla 14: Distribución anual de cepas en adultos y niños, incluidas en el estudio.

Año	Total (%)	Adultos	Niños
2001	8 (ND)	ND	8
2002	11 (16.4)	ND	11
2003	17 (26.5)	ND	17
2004	24 (40.6)	11	13
2005	58 (63.7)	38	20
2006	54 (77.1)	30	24
2007	50 (45.8)	36	14
2008	52 (57.7)	44	8
Total	274 (49)	159	115

ND: No Disponible

Entre los años 2001 y 2003 apenas se pudieron recuperar neumococos del cepario. Los pocos aislamientos que se incluyeron para el estudio fueron cedidos de otro estudio realizado en el hospital y pertenecían todos a la población pediátrica. En el 2001 no sabemos el número total de neumococos que se aislaron, ya que no hay datos disponibles de ese año. Entre los años 2004 y 2008 se pudieron recuperar entre el 40% y el 77% de las cepas. En total se incluyeron 274 (49%) aislamientos, distribuidos entre niños y adultos como se muestra en la figura 6.

Figura 6: Distribución interanual de las cepas incluidas en el estudio.



6.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y EVOLUCIÓN

En cuanto a las patologías descritas en los pacientes, los diagnósticos más frecuentes fueron la neumonía adquirida en la comunidad (NAC) con 146 casos, la bacteriemia con 71 casos y la meningitis con 52 casos (tabla 15).

Tabla 15: Distribución del número de pacientes y cepas en función del cuadro clínico.

Cuadro clínico	Nº pacientes (%)	Nº aislamientos invasivos
NAC	146 (53)	150
Bacteriemia	71 (26)	76
Meningitis	52 (19)	72
Otros	5 (2)	6
Total	274	304

Aunque en algunos pacientes se aislara el neumococo en varias muestras invasivas (no se aportan datos de aislamientos en muestras no invasivas), para el posterior estudio sólo se consideró una cepa por paciente.

Entre todos estos casos se describió un shock séptico en 8 pacientes, 2 con meningitis, 3 con neumonía y 3 con una sepsis sin foco. Una de las dos meningitis tenía un foco ótico.

En el apartado “otros” de la tabla 15 se han agrupado un caso de osteomielitis, 2 casos de artritis séptica y 2 casos de peritonitis.

El caso de la osteomielitis fue en un niño de un mes de edad que también tenía un absceso epidural y en el que el neumococo se aisló en sangre.

Las artritis fueron en un adulto y en un niño, y en ambos, el neumococo se aisló en líquido articular.

Los dos casos de peritonitis fueron en adultos. El neumococo se aisló en sangre en ambos casos y en líquido peritoneal en uno de ellos.

Respecto a los 146 casos de enfermedad neumocócica invasiva (ENI) diagnosticados como neumonía, 94 (64,4%) pertenecían a adultos y 52 (35,6%) a niños. Por otro lado, 26 de los pacientes con neumonía desarrollaron un empiema. De éstos últimos, 10 fueron adultos y 16 niños (tabla 16).

Tabla 16: Distribución de los casos de neumonía y empiema entre adultos y niños.

	Adultos	Niños	Total
NAC	84	36	120
NAC-Empiema	10	16	26
Total NAC	94	52	146

Si tenemos en cuenta el número de empiemas desarrollados respecto a las neumonías totales de cada grupo, vemos que en niños el 30,8% de estas neumonías desarrollaron un empiema y el 10,6% en adultos, obteniéndose un valor de $p=0,0023$.

Por otro lado, tal y como se observa en la tabla 17, de los 159 *S. pneumoniae* aislados en adultos, las neumonías supusieron el 59% (94 pacientes), mientras que de los 115 aislamientos infantiles, las neumonías supusieron el 45% (52 pacientes). Si aceptamos un nivel de significación de 0,05, podemos afirmar que hubo diferencias significativas.

El 6,3 % de las patologías en adultos fueron empiemas. En niños éstas llegaron al 14%, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. De los 16 niños con un empiema, 9 eran menores de 1 año, 3 tenían 2 años, 1 tenía 3 años, otro 5 años, otro 9 años y otro 12.

En 71 pacientes se aisló el neumococo sólo en sangre, sin ningún foco aparente. Con un 26,4% de bacteriemias en adultos y un 25,2% en niños, la diferencia no fue significativa entre ellos.

En 52 pacientes el diagnóstico fue de una meningitis, 32 casos de niños y 20 de adultos. En cinco de los adultos se describió un foco ótico. Los casos de meningitis, alcanzaron el 12,6% y el 28% de los *S. pneumoniae* aislados en adultos y niños respectivamente. La diferencia fue estadísticamente significativa.

Tabla 17: Distribución de los casos en función de la patología diagnosticada y el grupo de adultos o niños.

	Adultos (%)	Niños (%)	Total	p*
NAC	84 (53)	36 (31,3)	120	0,0228
NAC-Empiema	10 (6,3)	16 (14)	26	0,0336
Meningitis	20 (12,6)	32 (28)	52	0,0015
Bacteriemia	42 (26,4)	29 (25,2)	71	0,8233
Otros	3	2	5	-
Total	159	115	274	

* χ^2

Vemos, por tanto, que los adultos presentan más neumonías pero menos empiemas que los niños y que éstos tienen más empiemas y meningitis.

Si analizamos la rentabilidad diagnóstica en función del tipo de muestra en la que se aislaron las cepas en cada patología, observamos que de los 146 casos de NAC, en 135 el neumococo se aisló en el hemocultivo (tabla 18), como era esperable ya que sólo hemos considerado la ENI.

Tabla 18: Distribución de los neumococos causantes de NAC en función de la muestra en la que se hallaron.

Patología (n)	Sangre	L.Pleural	Bx pulm.
NAC (120)	119	-	1
NAC-Empiema (26)	16	10	-
Total NAC (146)	135	10	1

De estos 135 neumococos aislados en hemocultivos, 16 pertenecían a pacientes con diagnóstico de empiema, pero sin aislamiento en el líquido pleural. En los 10 casos restantes de empiema, el neumococo se aisló en líquido pleural. Nueve de estos 10 pacientes fueron niños. Teniendo en cuenta que el líquido pleural se estudió en 22 de los 26 casos de empiema, podríamos decir que el líquido pleural tiene una rentabilidad diagnóstica del 45% y que la rentabilidad del hemocultivo para los empiemas fue de 61,5%. Por otro lado, hubo un caso de un niño de 324 días que ingresó con broncoespasmos y tras su fallecimiento se aisló el neumococo en una biopsia pulmonar.

Es de destacar que de los 52 pacientes diagnosticados de meningitis, en 14 (27%) casos *S. pneumoniae* se aisló exclusivamente en hemocultivos. En 19 casos sólo en L.C.R. y en otros 19 casos se aisló tanto en hemocultivo como en L.C.R. (tabla 19). Por tanto la rentabilidad diagnóstica del hemocultivo ha sido del 63,5% y del 73% en L.C.R.

Tabla 19: Distribución de los neumococos causantes de meningitis en función de la muestra en la que se aislaron.

Patología (n)	Sangre	LCR	S+LCR
Meningitis (52)	14	19	19

En total, fallecieron 33 pacientes (12%), 7 de los cuales eran niños, 3 con meningitis, 3 con neumonía y 1 con una sepsis. De los 26 (16%) adultos fallecidos, hubo 1 caso con un empiema, 1 caso con meningitis de origen ótico, 4 sepsis y 20 neumonías (tabla 20). La mortalidad en adultos alcanzó el 16%, mientras que en los niños supuso el 6%.

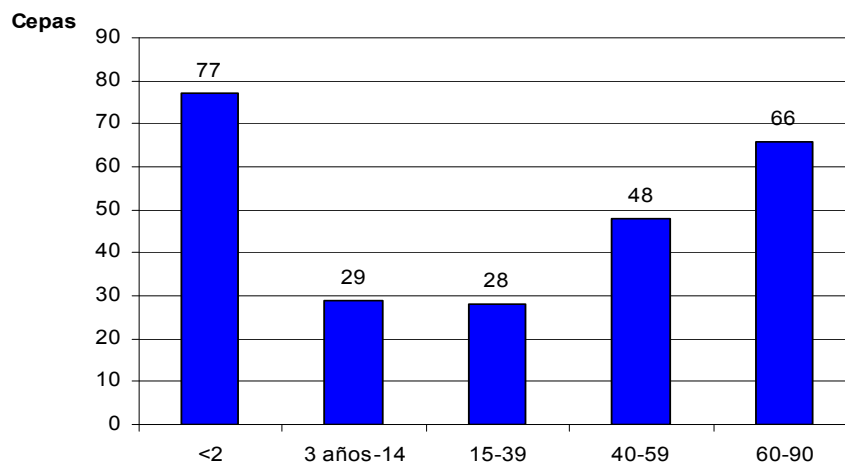
Tabla 20: Distribución de los fallecidos en adultos y niños en función de la patología.

	Adultos	Niños
NAC	20	3
NAC-Empiema	1	0
Sepsis	4	1
Meningitis	1	3
Total	26	7

6.3. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

a. Edad

Se obtuvo el dato de la edad en 248 de 273 pacientes. Al comparar el número de pacientes en cada grupo etario, observamos que existe un predominio de casos en el grupo de niños menores de 2 años seguido del grupo de edad comprendida entre los 60 y 90 años. Las edades más afectadas son, por tanto, las de los extremos de la vida (figura 7).

Figura 7: Distribución de los aislamientos incluidos en el estudio en función de la edad.

b. Género

Respecto al sexo de los pacientes, 165 (60.4%) eran hombres y 108 (39.6%) mujeres. Si observamos la diferencia de género separando la población infantil de la adulta obtenemos los resultados que se indican en la tabla 21.

Tabla 21: Distribución de los casos entre hombre y mujeres, en niños y en adultos.

	Adultos	Niños	p*
Hombres	105 (66.4%)	60 (52.2%)	0,0172
Mujeres	53 (33.6%)	55 (47.8%)	
Total	158	115	

* χ^2

En la población adulta, el 66,4% de los afectados fueron hombres y el 33,6% mujeres. En la población infantil el 52,2% fueron niños y el 47,8% niñas. La diferencia que encontramos fue significativa.

En adultos, si observamos la diferencia de la mortalidad en función del sexo, vemos que de los 26 fallecidos que hubo, 18 (69%) fueron hombres y 8 (31%) mujeres, porcentajes similares a la distribución de la ENI en función del género.

6.4 RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

6.4.1. Aislamiento e identificación de los microorganismos

Las cepas se identificaron, en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen del Rocío, como *Streptococcus pneumoniae* basándose en la morfología de las colonias, la sensibilidad a la optoquina y la solubilidad en bilis. En agar sangre se observó crecimiento abundante a las 18-24 horas de incubación en CO₂ al 5% y 37°C. Las colonias presentaron una morfología circular, con un diámetro de 0.5-2 mm. Su aspecto era brillante, con una pequeña invaginación en el centro y rodeadas por una zona verdosa de hemólisis alfa. El número y tipo de muestra en la que se aisló e identificó *Streptococcus pneumoniae* se indica en la tabla 22.

Tabla 22: Distribución de muestras incluidas en el estudio.

MUESTRA	NÚMERO
Sangre	222
L.C.R.	19
Sangre y L.C.R.	19
Líquido Pleural	10
Líquido Sinovial	2
Biopsia Pulmonar	1
Líquido Peritoneal/Sangre	1
Total	274

6.4.2. Estudio de sensibilidad

Las pruebas de sensibilidad de cada aislado de *S. pneumoniae* se realizaron siguiendo los protocolos vigentes en cada momento y en la sección en la que se procesó la muestra. Las pruebas de sensibilidad se realizaron mediante E-test y se interpretaron siguiendo las guías del CLSI. En el caso del *S. pneumoniae*, los puntos de corte para la

interpretación de las categorías han variado en los últimos años. Los resultados de la tabla 23 se expresan siguiendo las recomendaciones del CLSI del 2010.

El porcentaje de sensibilidad acumulada de los aislamientos de *S. pneumoniae* para los antibióticos probados se puede observar en la tabla 23.

Tabla 23: Sensibilidad acumulada de los aislamientos de *S. pneumoniae* a los diferentes antibióticos probados.

Antibiótico	N	% Sensibilidad
Penicilina (meningitis)	50	76%
Penicilina (no-meningitis)	204	98%
Cefotaxima (meningitis)	49	92%
Cefotaxima (no-meningitis)	205	98%
Eritromicina	252	77%
Meropenem	188	95,2%
Levofloxacina	274	99,3%
Vancomicina	194	100%

Se estudió la actividad de la penicilina y cefotaxima en 254 aislamientos. En estos casos, los criterios de sensibilidad (%) se establecieron basándonos en los puntos de corte en función del cuadro clínico, diferenciando entre los aislados de meningitis y el resto de cuadros clínicos y la administración parenteral de la penicilina y de cefotaxima. Así, en los aislados en meningitis, la sensibilidad acumulada para la penicilina y la cefotaxima fue del 76% y del 92% respectivamente, mientras que en el resto, la sensibilidad fue del 98% para ambos antibióticos.

La tasa más alta de resistencia se encontró con eritromicina detectándose un 33% de cepas resistentes. En cuanto al meropenem, la levofloxacina y la vancomicina, las sensibilidades fueron del 95,2%, 99,3% y del 100% respectivamente.

6.5. ESTUDIO DE SEROTIPADO

Como ya se ha mencionado anteriormente, 96 aislamientos procedentes de muestras infantiles fueron serotipados previamente mediante reacción de Quellung en el Laboratorio de Referencia de Neumococos del Centro Nacional de Microbiología. Esto sirvió para comparar los resultados posteriores obtenidos por PCR y valorar el esquema de 7 PCR múltiples secuenciales diseñadas por el C.D.C. (Estados Unidos) para serotipado de *S. pneumoniae*.

La concordancia entre la PCR múltiple secuencial y el serotipado convencional realizado en los aislamientos de pacientes pediátricos fue del 85%. Sin embargo, en 3 de los diez aislamientos en los que no obtuvimos ningún serotipo por PCR, pero sí amplificó la secuencia del gen *cps*, el serotipado convencional identificó un serotipo no incluido en el esquema (dos del serotipo 24 y uno del 13). Teniendo en cuenta esto, la concordancia fue del 88,5%.

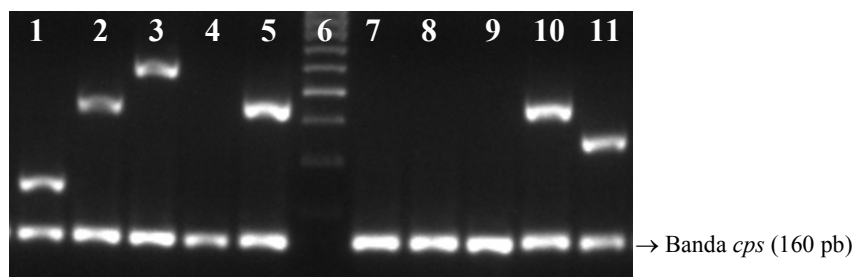
Este primer estudio demostró la utilidad del protocolo del CDC para la identificación de los serotipos de *S. pneumoniae* invasivos, pero la secuencia de PCR múltiples hubo que adaptarla a la prevalencia local para optimizar su rendimiento. Basándonos en la bibliografía, realizamos nuevas combinaciones de serotipos en cada reacción de PCR, de manera que con las primeras reacciones pudieramos identificar los serotipos más frecuentes, siempre y cuando esas combinaciones fueran posibles desde el punto de vista del peso molecular y por lo tanto de la interpretación de la electroforesis. En la tabla 4, se muestran las diferencias en las combinaciones de serotipos por cada PCR propuesta por el CDC y la nuestra. En esta última aparecen en sombreado las principales modificaciones.

Tabla 4: Distribución de serotipos en el esquema propuesto por el CDC y en el esquema modificado en el Hospital Universitario Virgen Del Rocío.

	C.D.C.				H.U.V.R.			
PCR-1	19A	3	22F	6	19A	3	22F	6
PCR-2	4	14	12F	9V	4	14	12F	7F
PCR-3	23F	7F	11A	33F	1	16F	35F	5
PCR-4	19F	16F	18	35B	23F	9V	11A	8
PCR-5	8	15B/C	38	31	19F	15A	18	35B
PCR-6	1	10	35F	34	33F	15B/C	38	31
PCR-7	20	7C	17F	15A	20	7C	17F	34
Srtp	5				10			

La primera reacción de PCR no se modificó con respecto al esquema original debido a que los 4 serotipos que la conforman eran frecuentes también en nuestro medio y la PCR estaba ya optimizada. En la siguiente imagen se muestra el resultado de la electroforesis de la primera PCR.

Figura 8: Bandas de los cuatro serotipos, obtenidas tras la primera PCR múltiple del esquema.

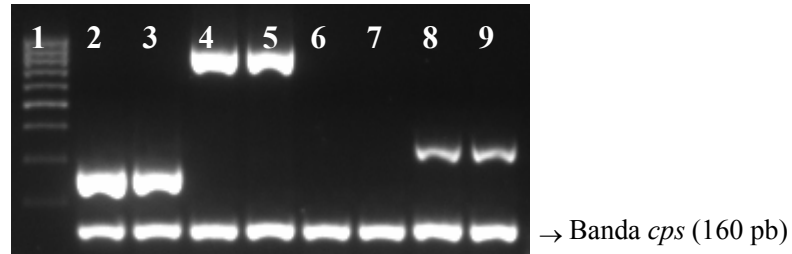


De izquierda a derecha: 1. Serotipo 6 (250 pb), 2. Serotipo 19A (475 pb), 3. Serotipo 22F (643 pb), 4. No serotipo, 5. Serotipo 19A (475 pb), 6. Marcador de 100 pb, 7, 8 y 9. No serotipo, 10. Serotipo 19A (475 pb), 11. Serotipo 3 (371 pb).

Con el objetivo de mejorar la eficiencia del esquema original para la vigilancia epidemiológica de nuestra área geográfica, los principales cambios realizados fueron incluir el serotipo 5 en el esquema, concretamente en la tercera PCR y adelantar el serotipo 1 de la sexta PCR del esquema de Pai *et al.* (25) a la tercera PCR. El resto de

las combinaciones se realizaron de manera que los tamaños de los cebadores de cada reacción se diferenciaron en más de 50 pb para una mejor resolución del gel.

Figura 9: Bandas de tres serotipos, obtenidas tras la tercera PCR múltiple del esquema modificado.

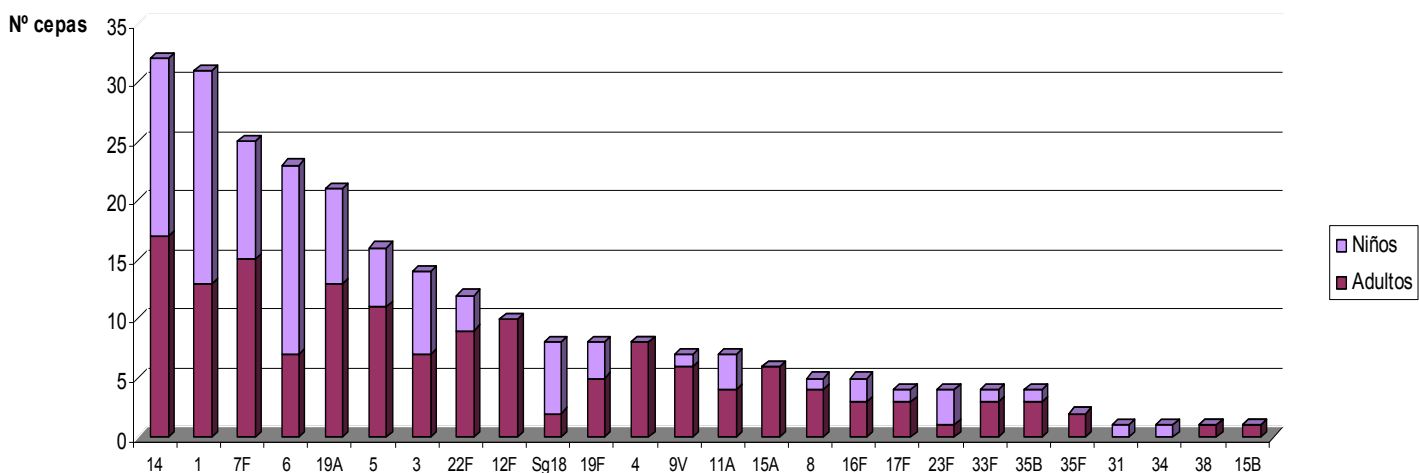


De izquierda a derecha: 1. Marcador de 100 pb, 2. Serotipo 1 (280 pb), 3. Serotipo 1 (280 pb), 4. Serotipo 16F (988 pb), 5. Serotipo 16F (988 pb), 6. y 7. No serotipo, 8. Serotipo 5 (362 pb), 9. Serotipo 5 (362 pb).

Por PCR múltiple tipamos el 95% (260/274) de los aislamientos. Si tenemos en cuenta el grupo de edad, se tiparon el 97% (154/159) de los aislamientos en adultos y el 92,2% (106/115) de los aislamientos pediátricos. En tres aislamientos de adultos (1,8%) y en siete aislamientos pediátricos (6,1%) no se identificó el serotipo, pero sí amplificó la secuencia del gen *cps*. En dos aislamientos de cada grupo (1,3% y 1,7%) no obtuvimos amplificación del control interno.

En la figura 10 se ha representado el número total de cepas tipadas por cada serotipo, ordenadas de mayor a menor frecuencia. Se puede observar que los 9 serotipos más frecuentes forman parte de las primeras tres reacciones de PCR.

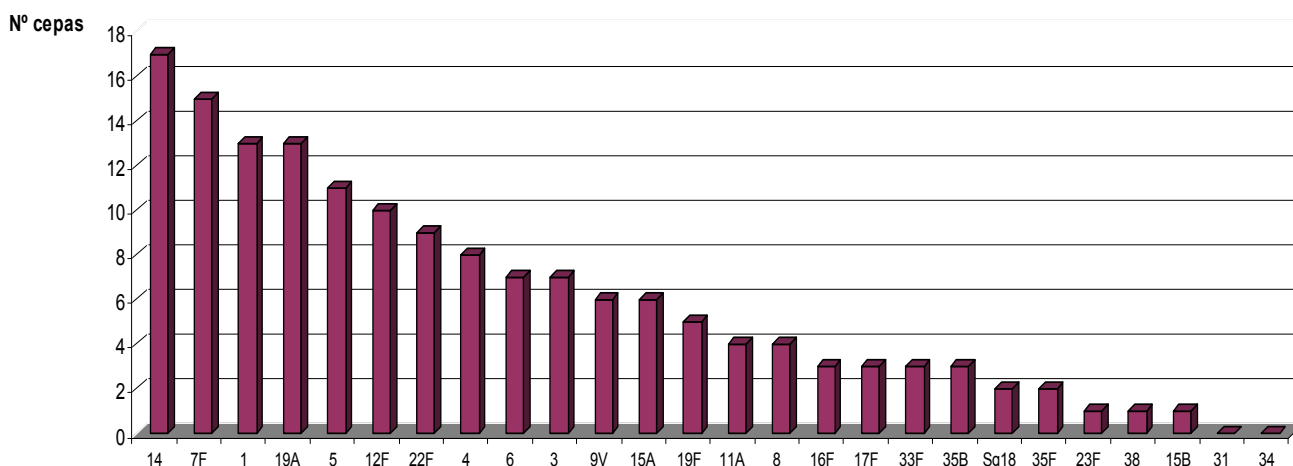
Figura 10: Número de cepas obtenidas por cada serotipo, de mayor a menor frecuencia.



En cada barra del gráfico se distingue también el número de cepas obtenidas de adultos o niños que pertenecen a ese serotipo. Aunque los serotipos más frecuentes aparecen en ambos grupos, si comparamos el orden de frecuencia obtenido en adultos y niños por separado, vemos que no es igual al total. En las dos gráficas siguientes se representan los serotipos más frecuentes en adultos y niños.

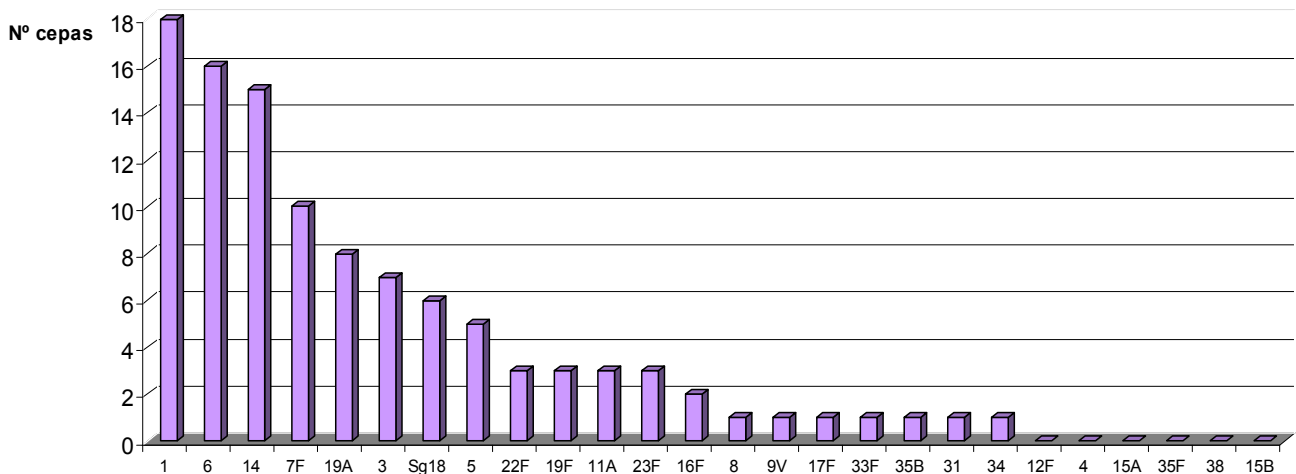
En la figura 11 observamos que aunque el orden de frecuencia en adultos varíe respecto al total, los 10 serotipos más frecuentes siguen siendo serotipos que podemos tipar con las primeras tres PCRs. En adultos el número de casos está más repartido entre los diferentes serotipos que en la población pediátrica. El número encontrado de serotipos, veinticuatro, es más alto en los adultos que en la población pediátrica con veinte serotipos distintos.

Figura 11: Número de cepas obtenidas en adultos por cada serotipo, de mayor a menor frecuencia.



Los serotipos más frecuentes en niños también están incluidos en las primeras reacciones (figura 12). En el caso de los niños la distribución de serotipos que encontramos es más heterogénea. Esto facilita el serotipado en cuanto a orientar la búsqueda de los más frecuentes y aumenta la eficiencia del método, ya que con menos reacciones de PCR se identifican más serotipos.

Figura 12: Número de cepas obtenidas en niños por cada serotipo, de mayor a menor frecuencia.



En la tabla 24 se pueden observar los datos del porcentaje tipado con cada reacción de PCR y los datos del porcentaje acumulativo que se obtiene tras la suma de las reacciones.

El tamaño del fragmento amplificado en pares de bases para cada serotipo nos permite variar las posibles combinaciones para poder realizar una PCR múltiple. Esto hace que el esquema quede abierto a nuevas modificaciones e incluso a poder tipar más de cuatro serotipos de una vez, si los tamaños de los fragmentos amplificados permiten una buena discriminación.

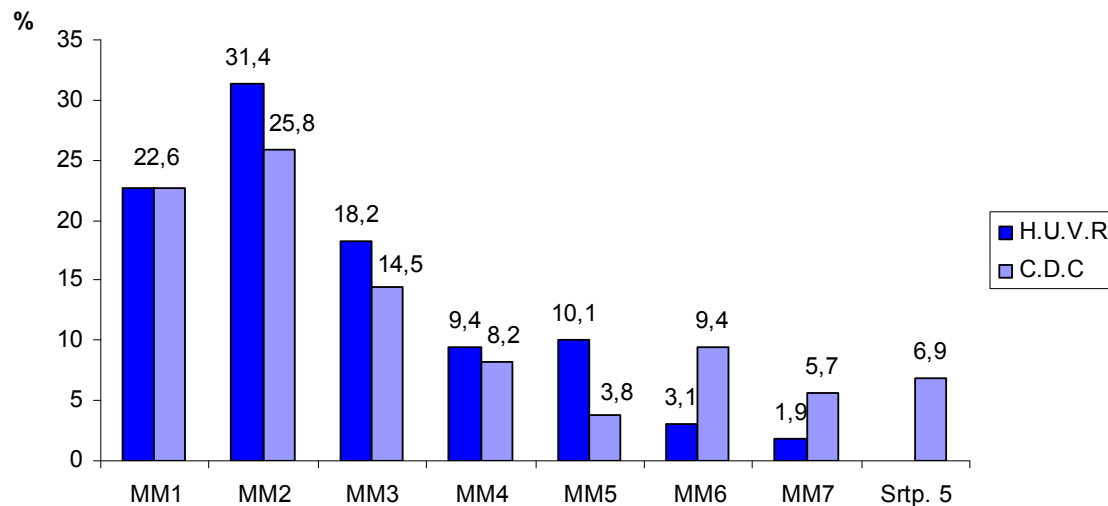
Tabla 24: Distribución de los serotipos en cada PCR y los resultados obtenidos de cada serotipo y cada reacción.

Serotipos incluidos en cada PCR	Producto de PCR esperado (pb)	Serotipos obtenidos en adultos (%) n:159	Valor acumulativo (%)	Serotipos obtenidos en niños (%) n:115	Valor acumulativo (%)
PCR 1		36 (22,6)	36 (22,6)	34 (29,6)	34 (29,6)
19A	478	13		8	
3	371	7		7	
22F	643	9		3	
6	250	7		16	
PCR 2		50 (31,4)	86 (54)	25 (21,7)	59 (51,3)
4	430	8		0	
14	208	17		15	
12F	376	10		0	
7F	826	15		10	
PCR 3		29 (18,2)	115 (72,3)	25 (21,7)	84 (73,0)
1	280	13		18	
16F	988	3		2	
35F	517	2		0	
5	362	11		5	
PCR 4		15 (9,4)	130 (81,7)	8 (7,0)	92 (80,0)
23F	384	1		3	
9V	753	6		1	
11A	463	4		3	
8	294	4		1	
PCR 5		16 (10,1)	146 (92)	10 (8,7)	102 (88,7)
19F	304	5		3	
15A	436	6		0	
18	573	2		6	
35B	677	3		1	
PCR 6		5 (3,1)	151 (95)	2 (1,7)	104 (90,4)
33F	338	3		1	
15B/C	496	1		0	
38	574	1		0	
31	701	0		1	
PCR 7		3 (1,9)	154 (97)	2 (1,7)	106 (92,2)
20	514	0		0	
7C	260	0		0	
17F	693	3		1	
34	408	0		1	
10	628	0		0	
No amplificación		2 (1,3)		2 (1,7)	
No tipables		3 (1,8)		7 (6,1)	

Si comparamos los resultados obtenidos con el esquema modificado y los que habríamos obtenido con el esquema original, vemos que se ha mejorado la eficiencia del esquema tanto en adultos como en niños, ya que el porcentaje de cepas tipadas con las

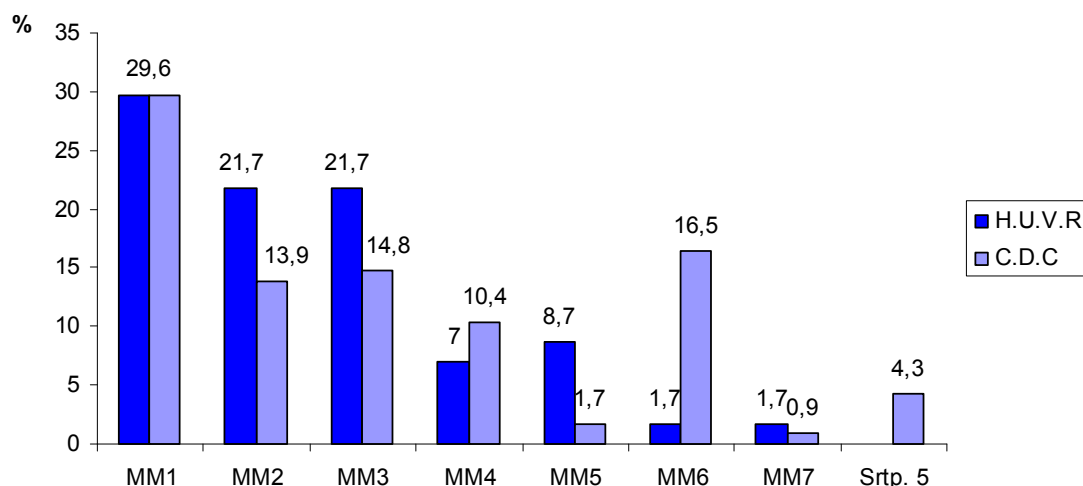
primeras reacciones es mayor en ambos casos (figura 13 y 14). Además, incluyendo el serotipo 5, que el esquema original no lo incluía, aumenta el número de cepas tipadas.

Figura 13: Comparación del porcentaje de aislamientos tipados con cada reacción, entre el esquema original y el modificado en aislamientos de adultos.



Como se observa en la última columna de las figura 13 y 14, el serotipo 5 se detectó en el 6,9% y 4,3% de las cepas, respectivamente y no estaba incluido en el protocolo.

Figura 14: Comparación del porcentaje de aislamientos tipados con cada reacción, entre el esquema original y el modificado en aislamientos de niños.



En los aislamientos de pacientes adultos, el esquema modificado de la PCR múltiple secuencial nos permitió tipar el 72,3% de las cepas con las primeras tres reacciones y con las dos PCR siguientes se tipó el 92%, mientras que aplicando el

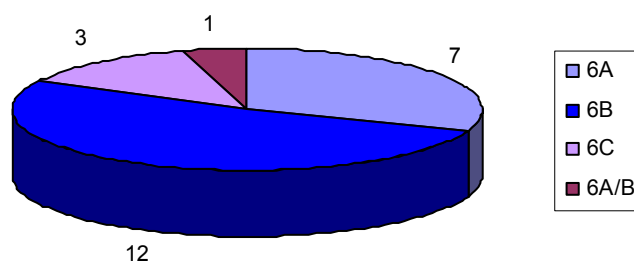
esquema original, hubieramos tipado el 63% y el 74,9% respectivamente (Fig. 13).

En los aislamientos del grupo pediátrico, los resultados obtenidos fueron el 73% versus 58,3% con las tres primeras reacciones y el 88,7% versus el 70,4% con dos PCRs adicionales (Fig. 14).

El cebador utilizado para tipar el serogrupo 6, amplificaba un fragmento que no permitía distinguir entre los diferentes serotipos de este grupo, de modo que hubo que aplicar otras técnicas a los aislamientos con este serogrupo.

Por secuenciación de los 23 aislamientos 6A/B se identificaron 10 como 6A/C y 12 como 6B. En un caso no se pudo diferenciar. De los 10 6A/C, obtuvimos 3 aislamientos del serotipo 6C por PCR. La distribución final del serotipo 6 fue: doce cepas del 6B, siete cepas del serotipo 6A, tres cepas del 6C y una cepa que no se pudo diferenciar (figura 15).

Figura 15: Distribución de los subtipos del serotipo 6.



6.5.1. Serotipos obtenidos vs serotipos vacunales

Cómo ya se ha mencionado anteriormente, en 1983 se autoriza en Estados Unidos una vacuna antineumocócica no conjugada que contiene los antígenos polisacáridicos capsulares de 23 serotipos. En febrero del año 2000, la FDA aprobó la vacuna conjugada heptavalente antineumocócica en Estados Unidos que incluye los siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) más frecuentemente implicados en la etiología de la enfermedad invasora neumocócica en niños menores de 2 años. En 2009 se aprobó la vacuna decavalente con tres serotipos más (1, 5 y 7F) y en febrero de 2010

sale la vacuna tridecavalente que engloba los 13 serotipos más comunes, los 10 anteriores más el 19A, el 3 y el 6A.

En la tabla 25 se muestran ordenados por el número de casos los serotipos obtenidos y la cobertura de éstos por las diferentes vacunas neumocócicas. El serotipo mayoritario en nuestro caso, el 14, está cubierto por todas las vacunas, pero los siguientes cinco serotipos más frecuentes no los cubre el la vacuna heptavalente. Sin embargo, con la PCV13 quedarían cubiertos los 7 primeros.

La vacuna no conjugada cubriría nuestros 15 serotipos más frecuentes, excepto el 6A, que sí lo cubre la PCV13.

Tabla 25: Distribución de los serotipos y su cobertura por las diferentes vacunas neumocócicas.

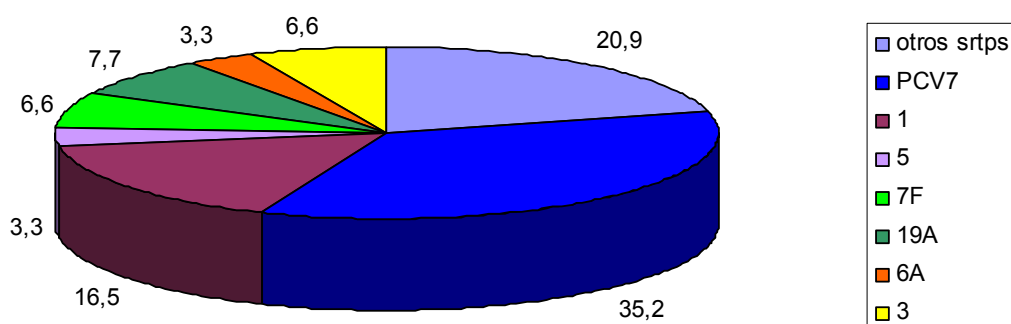
Serotipo	Nº de casos	PCV7	PCV10	PCV13	PPV23
14	32	+	+	+	+
1	31		+	+	+
7F	25		+	+	+
19A	21			+	+
5	16		+	+	+
3	14			+	+
6B	12	+	+	+	+
22F	12				+
12F	10				+
4	8	+	+	+	+
19F	8	+	+	+	+
Sg18	8	+	+	+	+
6A	7			+	
9V	7	+	+	+	+
11A	7				+
15A	6				
8	5				+
16F	5				
35B	4				
17F	4				+
23F	4	+	+	+	+
33F	4				+
6C	3				

Serotipo	Nº de casos	PCV7	PCV10	PCV13	PPV23
35F	2				
15B/C	1				+
38	1				
31	1				
34	1				

No obstante, la prevalencia de los distintos serotipos en los diferentes grupos de edad varía y con ello la composición e indicación de las vacunas. Por ello, hemos estudiado los serotipos obtenidos en niños menores de 6 años y la cobertura de éstos por las diferentes vacunas indicadas para ellos.

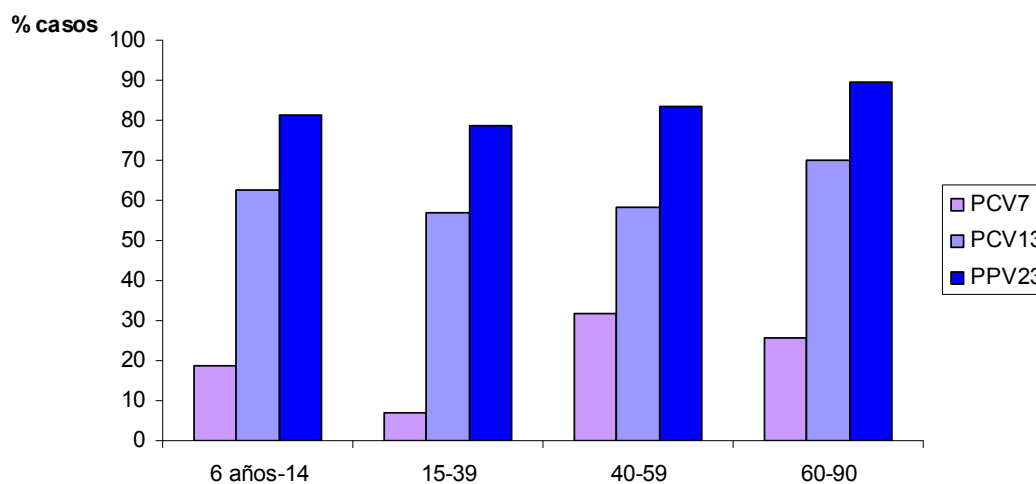
Así, encontramos que con la PCV7 cubrimos el 35,2% de los casos. Si a esto le sumamos los 6 serotipos más que cubre la PCV13, abarcaríamos casi el 80% de los casos en niños menores de 6 años (figura 16).

Figura 16: Porcentaje de casos de ENI en niños menores de 6 años en función de los serotipos vacunales.



Si comparamos el porcentaje de cobertura de las diferentes vacunas según los grupos de edad a partir de los 6 años, podemos observar que con la PCV7 cubrimos entre el 7 y el 31% de los casos, con la PCV13 entre el 60-70% de los casos y con la PPV23 entre el 80-90% de los casos (figura 17).

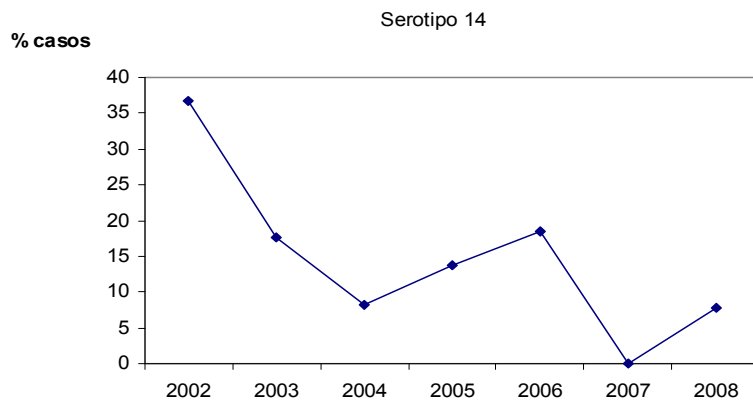
Figura 17: Porcentaje de casos de ENI causados por los serotipos vacunales agrupados por tipo de vacuna y en función de los grupos de edad.



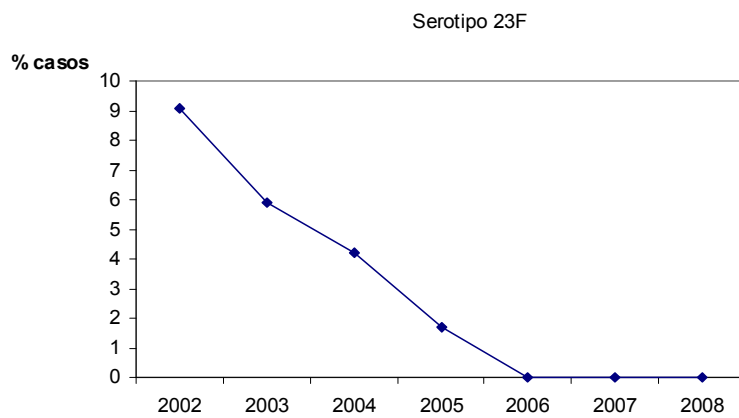
6.5.2. Evolución interanual de los serotipos obtenidos

Teniendo en cuenta las limitaciones del corto periodo de estudio y el tamaño muestral, definir la tendencia o patrón a seguir por cada serotipo no es fácil. Además, la escasa tasa de vacunación en España, dificulta la valoración del efecto de la vacuna tanto en los serotipos vacunales como en los no vacunales, aunque se sepa que la vacuna también tiene efecto sobre la población no vacunada.

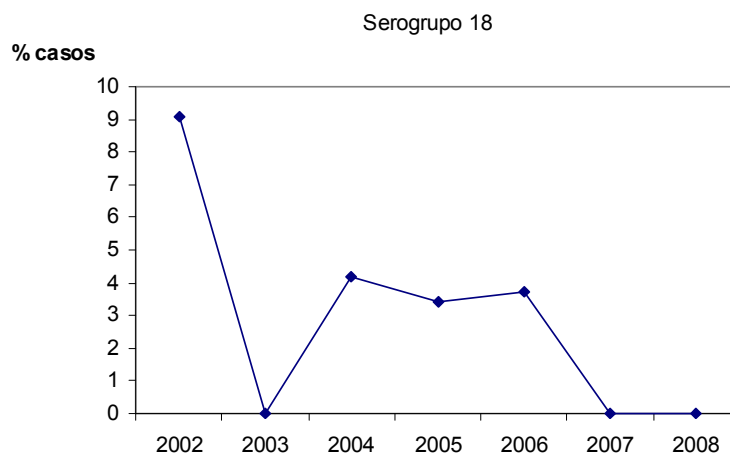
En las siguientes gráficas se representan los porcentajes obtenidos cada año de los diferentes serotipos. Las figuras siguientes (Figuras 18 a 24), muestran la evolución de los serotipos de la vacuna heptavalente (14, 23F, 18C, 6B, 19F, 4, 9V).

Figura 18: Distribución anual de las cepas del serotipo 14 (n= 32)

Los resultados obtenidos con el serotipo 14, muestran una tendencia a la bajada en los últimos años.

Figura 19: Distribución anual de las cepas del serotipo 23F (n= 4)

Tal y como se observa en la gráfica 17, el serotipo 23F muestra una tendencia a la bajada en los últimos años.

Figura 20: Distribución anual de las cepas del serogrupo 18 (n= 8)

El serogrupo 18, al igual que el serotipo 6B y el 19F (figura 20, 21 y 22) también parecen tener una tendencia a la baja.

Figura 21: Distribución anual de las cepas del serotipo 6B (n=12)

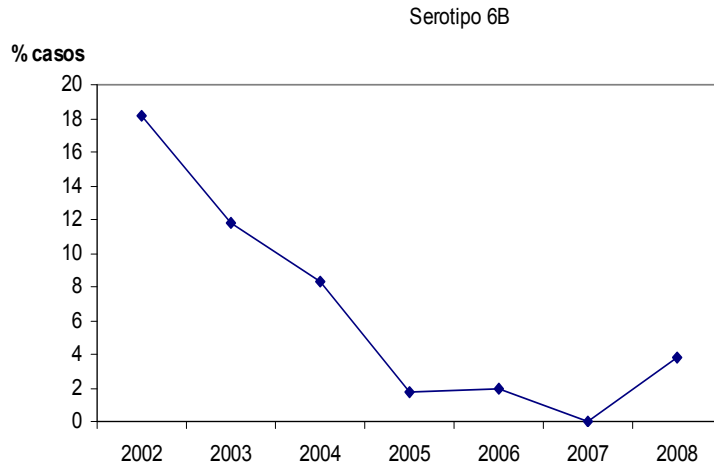


Figura 22: Distribución anual de las cepas del serotipo 19F (n=8)

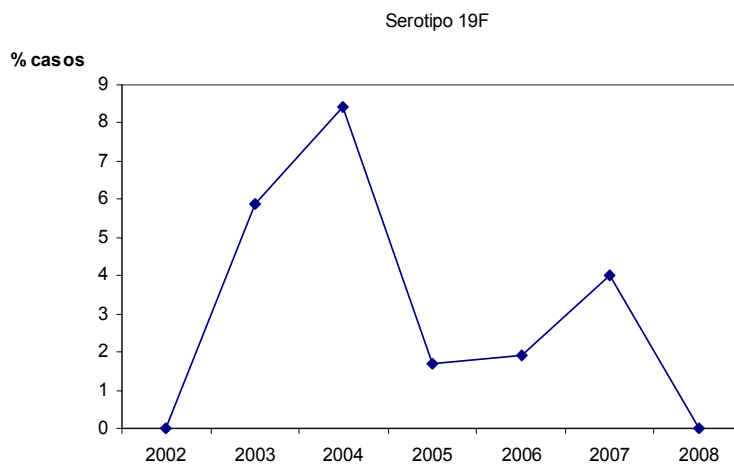


Figura 23: Distribución anual de las cepas del serotipo 4 (n=8)

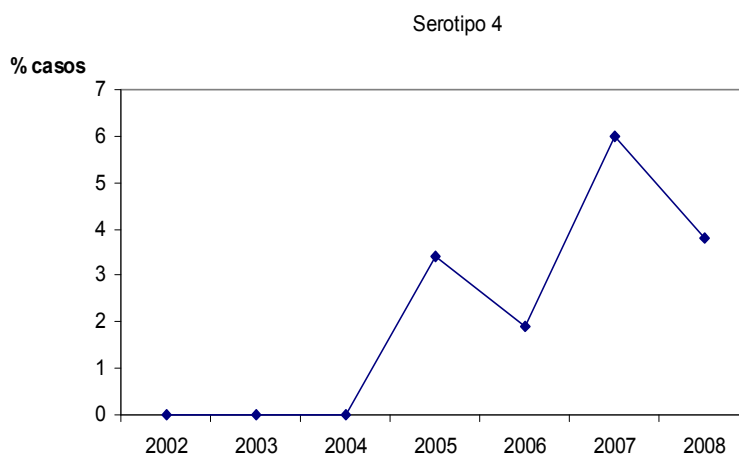
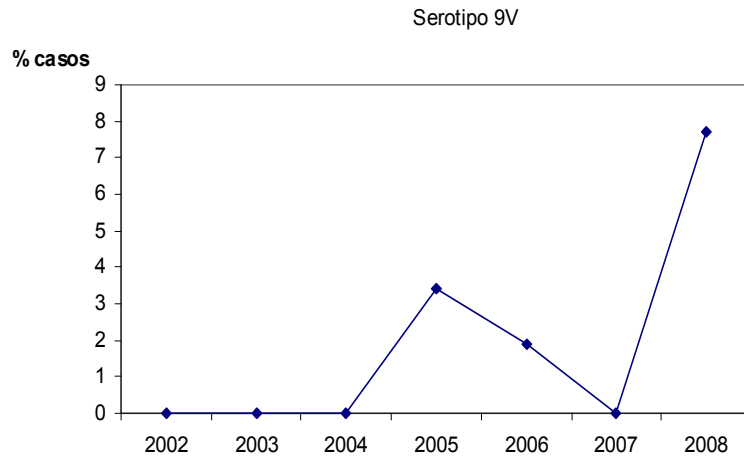


Figura 24: Distribución anual de las cepas del serotipo 9V (n=7)

Hasta ahora hemos visto la evolución de los serotipos de la vacuna heptavalente. Exceptuando el serotipo 4 y el 9V, en los demás se observa una tendencia a disminuir.

En las Figuras 25 a 30 se recoge la evolución de los serotipos 1, 7F, 6A, 3, 19A y 5, que son los añadidos a la formulación de la vacuna PCV13.

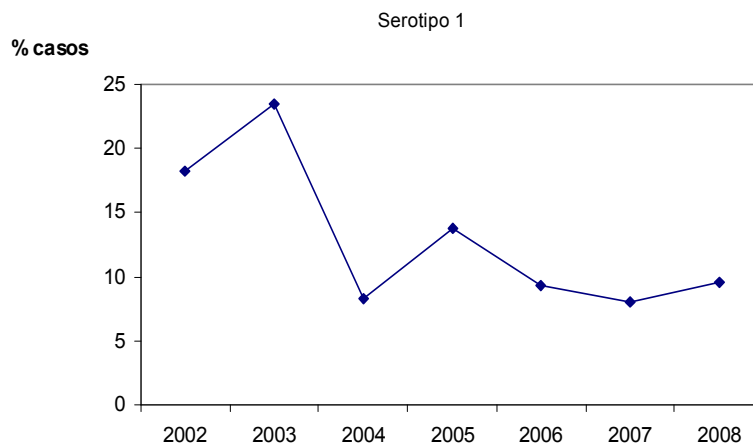
Figura 25: Distribución anual de las cepas del serotipo 1(n=31)

Figura 26: Distribución anual de las cepas del serotipo 7F (n=25)

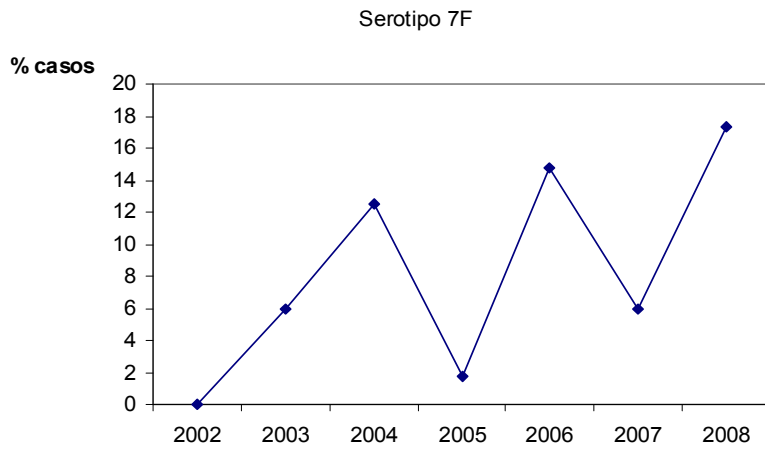


Figura 27: Distribución anual de las cepas del serotipo 6A (n=7)

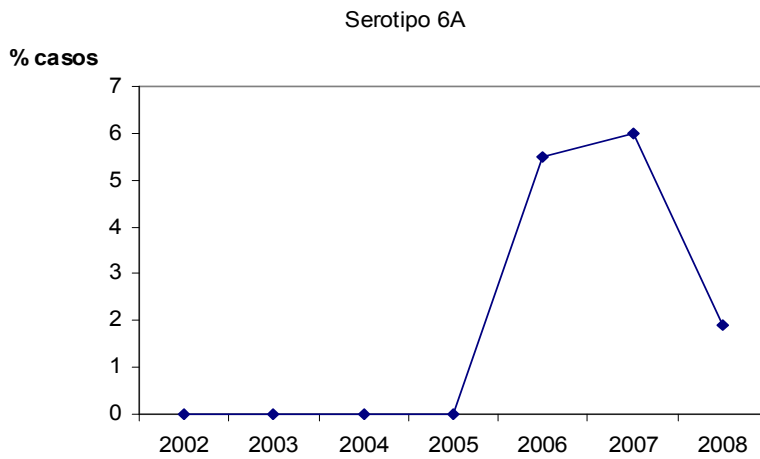


Figura 28: Distribución anual de las cepas del serotipo 3 (n=14)

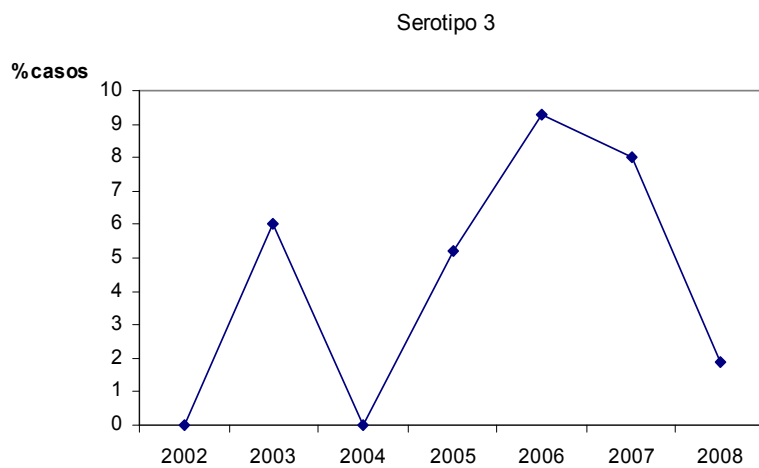
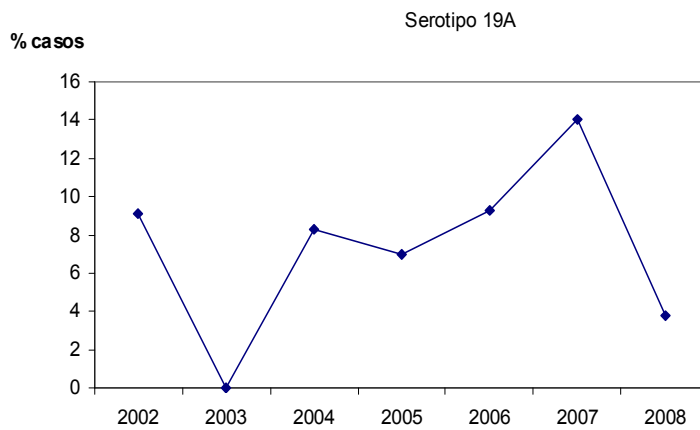
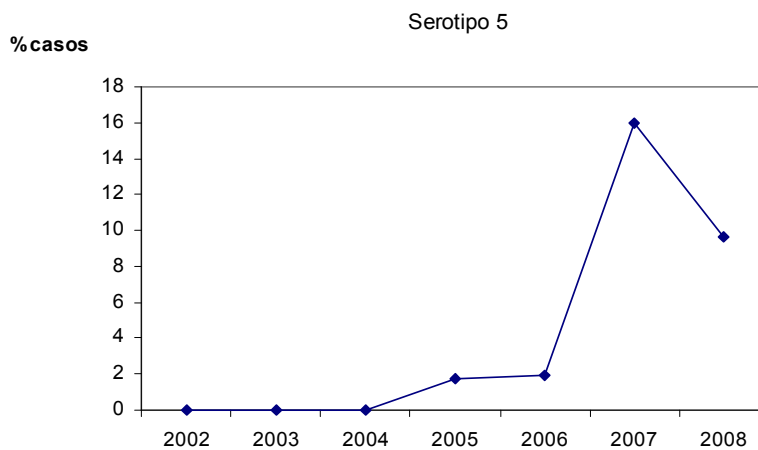


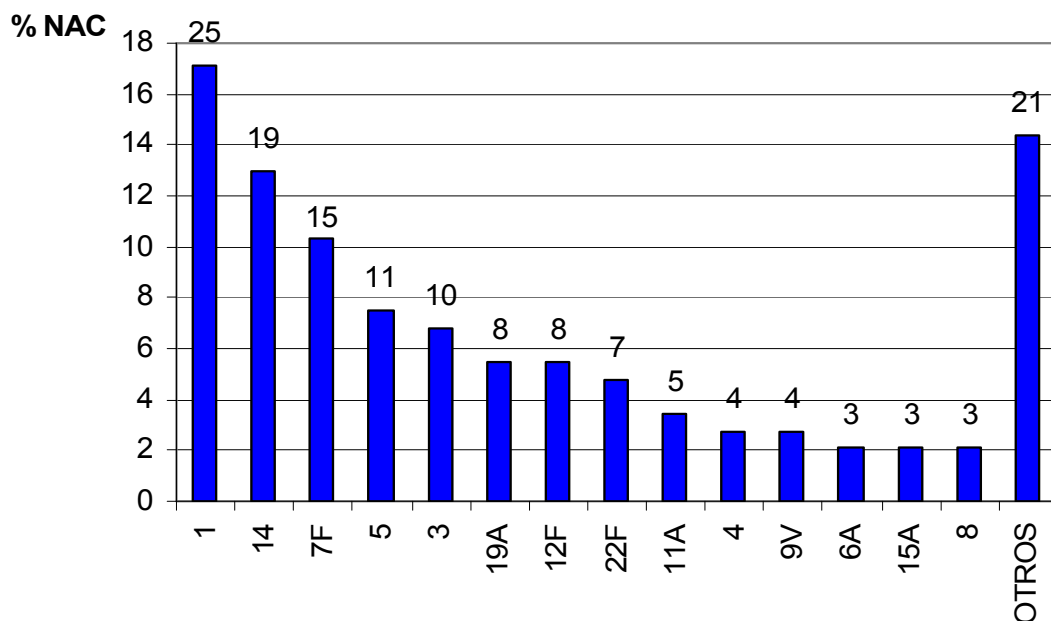
Figura 29: Distribución anual de las cepas del serotipo 19A (n=21)**Figura 30: Distribución anual de las cepas del serotipo 5 (n=16)**

Los serotipos 1, 7F, 6A, 3, 19A y 5 son los serotipos añadidos a la formulación de la vacuna PCV13. Durante los años de estudio, a diferencia de los serotipos de la vacuna PCV7, éstos no sólo no han disminuido, sino que algunos como el 7F muestran una tendencia al alza. El 19A también fue aumentando hasta el año 2007 y en el 2008 sufrió una caída. El serotipo 1, se mantiene en valores similares desde el año 2004 hasta el 2008. Otros como el 6A, el 3 o el 5 se muestran en máximos y mínimos, apareciendo o desapareciendo en función del año.

6.5.3. Serotipos obtenidos vs patologías

La correlación entre los cuadros clínicos y los serotipos aislados de los pacientes se recogen en las siguientes gráficas. En la figura 31, se muestran los serotipos más frecuentes hallados entre los casos de neumonía. El número que aparece encima de cada barra, es el número de casos de cada serotipo.

Figura 31: Distribución de los serotipos hallados entre los casos de NAC (n=146)



El serotipo más común en las neumonías fue el serotipo 1, con 25 casos (17,1% de las neumonías). Además, estos 25 casos supusieron 80% de los casos debidos al serotipo 1. Con un valor de $p=0,0012$, encontramos que estadísticamente era significativo.

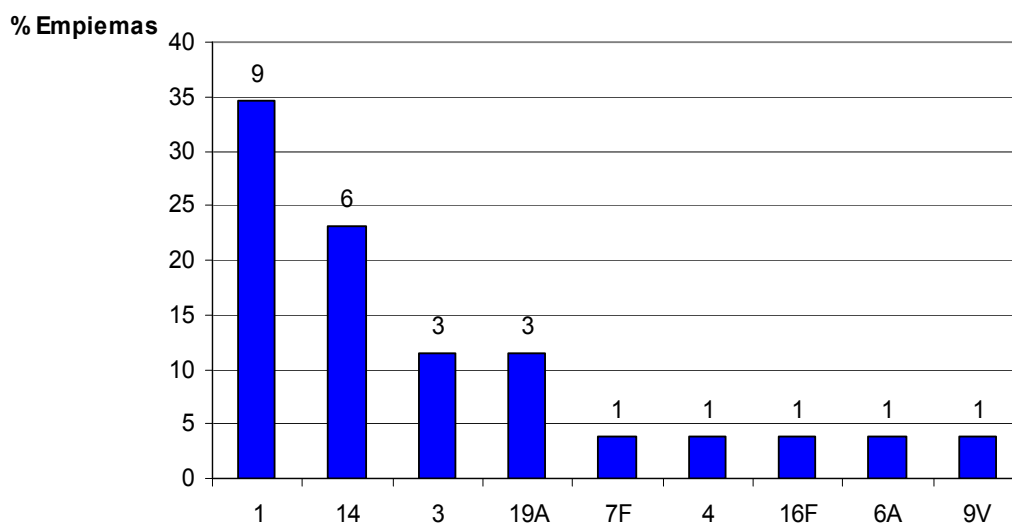
Aunque el valor de “p” del resto de los serotipos causantes de NAC no fue estadísticamente significativo, podemos decir que los serotipos 14, 7F, 5 y 3 aparecían en un número considerable. De los cinco serotipos más frecuentes hallados en pacientes con NAC, sólo el serotipo 14 forma parte de la vacuna heptavalente (figura 31).

La columna del gráfico que hace referencia a “otros” y que engloba 21 casos de NAC, está compuesta por 2 casos que no amplificaron, 5 casos en los que no se obtuvo

serotipo con nuestro esquema de serotipado (podrían ser serotipos que no se incluyen en el esquema) y 14 casos repartidos entre 12 serotipos diferentes.

Si observamos los serotipos hallados en los pacientes que desarrollaron un empiema, obtenemos la figura 32, donde encontramos que los serotipos más frecuentes fueron el 1, 14, 3 y 19A, de los cuales sólo el 14 se incluye en la vacuna heptavalente.

Figura 32: Distribución de los serotipos hallados entre los casos de empiema (n=26)



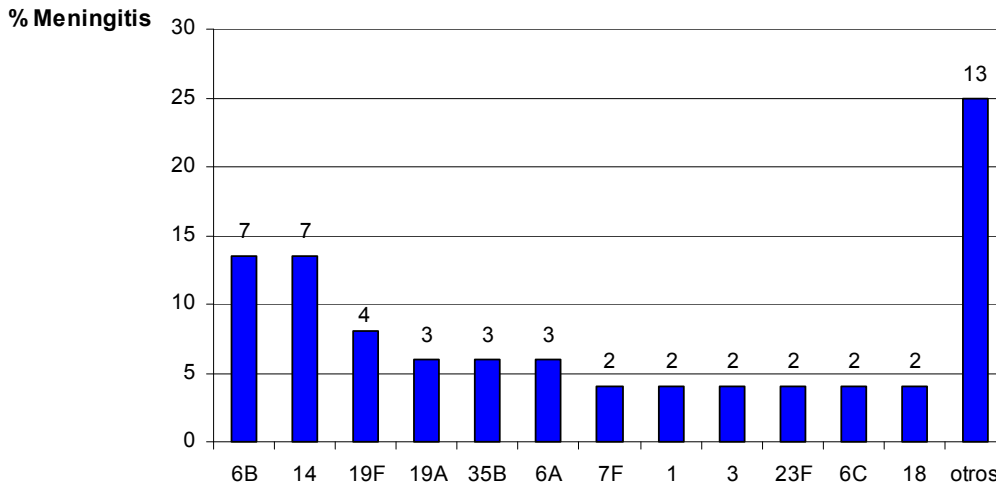
El serotipo más común en los empiemas también fue el serotipo 1, con 9 casos (34,6% de los empiemas). Estos 9 aislamientos supusieron el 29% del total del serotipo 1. Con un valor de $p=0,0001$, encontramos que estadísticamente era significativo.

En el caso de las meningitis, en cuanto a la relación entre serotipos, podemos ver que de los 12 aislamientos del serotipo 6B que se tiparon en total, 7 (58%) fueron casos de meningitis y 6 de estos, eran niños menores de un año (figura 33). Con un valor de $p=0,0001$, encontramos que estadísticamente era significativo. El serotipo 6B es uno de los serotipos incluidos en la vacuna heptavalente.

El otro serotipo más frecuente entre los casos de meningitis fue el serotipo 14, también con 7 casos (22% de los casos del serotipo 14). En el caso del serotipo 19F, 4 de los 8 aislamientos de este serotipo fueron causantes de meningitis. Del resto de los serotipos que aparecen en el gráfico siguiente, hubo 3 y 2 casos por serotipo. La

columna del gráfico que hace referencia a “otros” engloba 13 serotipos diferentes con un caso de meningitis cada uno.

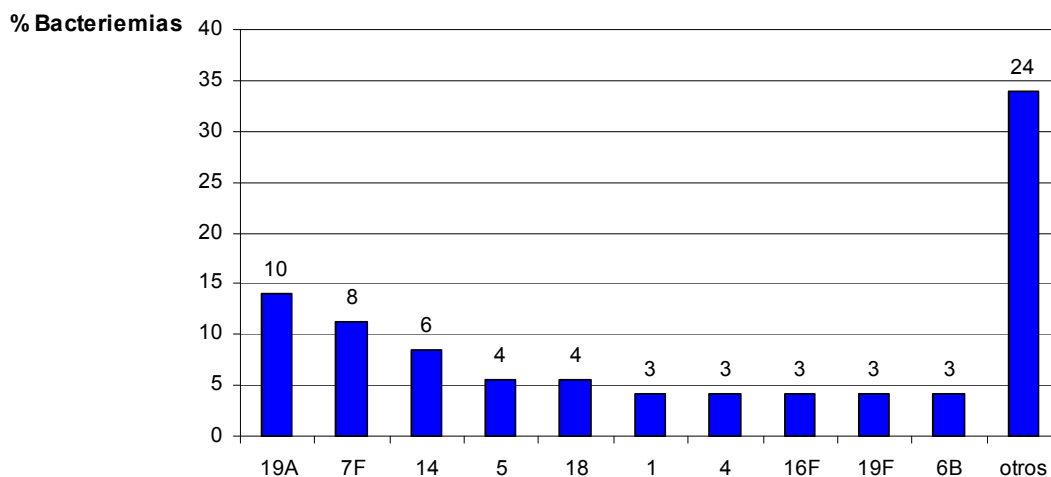
Figura 33: Distribución de los serotipos hallados entre los casos de meningitis.



El serotipo más frecuente entre los casos de bacteriemias fue el 19A, con 10 casos, que suponen el 48% de los casos totales de este serotipo. Con un valor de $p=0,0181$, encontramos que estadísticamente era significativo.

Hallamos 8 casos del serotipo 7F y 6 casos del serotipo 14. Del resto de los serotipos que aparecen en la figura 34, hubo 4 y 3 casos por serotipo. En la última columna del gráfico tenemos 13 serotipos diferentes que suman 24 de los casos de bacteriemias.

Figura 34: Distribución de los serotipos hallados entre los casos de bacteriemias.



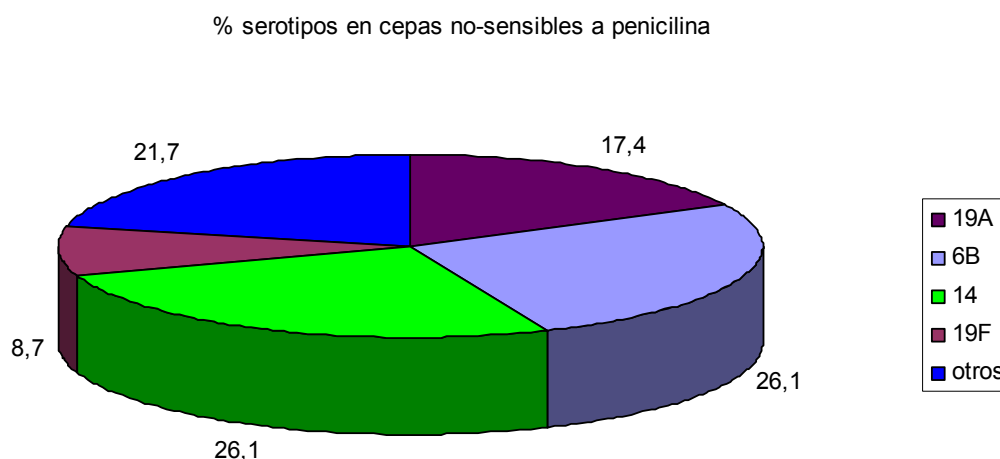
6.5.4. Serotipos obtenidos vs resistencias

La relación entre algunos serotipos y su resistencia a la penicilina se ha estudiado ampliamente, sobre todo tras el efecto de reemplazo de serotipos al introducirse la vacuna conjugada heptavalente, como es el caso del serotipo 19A.

La distribución de serotipos entre nuestras cepas no sensibles a penicilina se muestra en la figura 35. De un total de 23 casos (9%), 18 se repartían entre 4 serotipos predominantes y los 5 casos (21,7%) restantes pertenecían a 5 serotipos diferentes. Entre los serotipos más frecuentes encontramos a los serotipos 6B y 14, con 6 aislamientos cada uno (26,1% del total de no sensibles). De los 12 aislamientos del serotipo 6B que teníamos en total, estos 6 casos, representaban el 50%. La diferencia que encontramos era estadísticamente significativa ($p < 0,001$). Los 6 casos del serotipo 14, representaban el 18,8% del total de cepas del serotipo 14. Si aceptamos un nivel de significación del 0,05, la diferencia era significativa ($p = 0,0246$).

En el caso del serotipo 19A y el 19F, los valores de “p” no llegaban a ser estadísticamente significativos, $p = 0,06$ y $p = 0,08$ respectivamente.

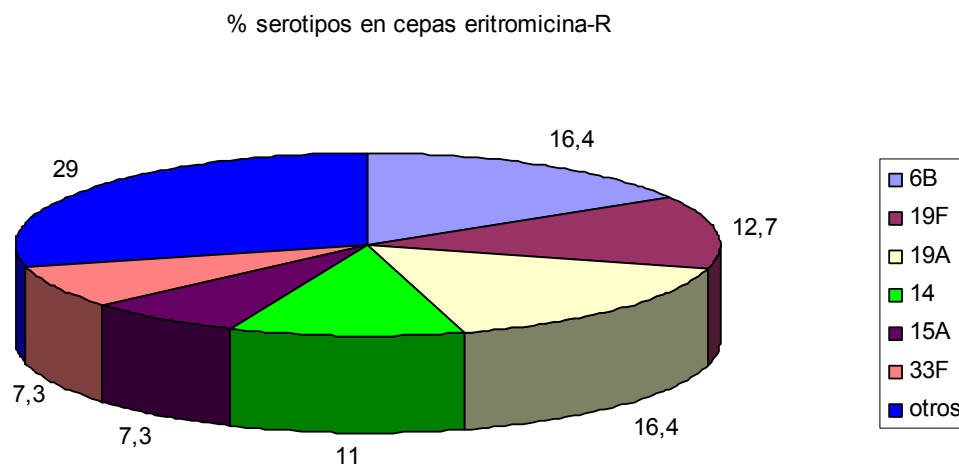
Figura 35: Distribución de los serotipos hallados en cepas no-sensibles a penicilina (n=23)



Los resultados del estudio de serotipos entre las cepas resistentes a eritromicina (22%) se muestran en la figura 36. El 29% de los aislamientos, denominados como “otros” en el gráfico, pertenecían a 9 serotipos diferentes. El 16,4% (9 cepas) pertenecían al serotipo 6B, que representaban el 75% de las cepas del serotipo 6B. Para

el serotipo 6B, encontramos que la diferencia era significativa ($p < 0,001$). El 19A (9 cepas) también representaba el 16,4% de las cepas resistentes a eritromicina. En menor proporción teníamos al serotipo 19F (7 cepas), al 14 (6 cepas), al 15A (4 cepas) y al 33F (4 cepas).

Figura 36: Distribución de los serotipos hallados en cepas eritromicina-resistentes (n=55)



En total hubo 15 cepas que fueron no-sensibles a penicilina y a eritromicina, 6 del serotipo 6B, 4 del serotipo 19A, 2 del serotipo 19F, 1 del serotipo 23F, 1 del serotipo 14 y 1 del serotipo 15A. Sólo hubo un aislado, el del serotipo 14, que fue resistente a eritromicina e intermedio a penicilina, cefotaxima y meropenem, pero sensible a LVX y vancomicina.

6.6. ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSANTE (ECP)

La tipificación molecular de los aislamientos clínicos estudiados se realizó mediante ECP, utilizando el enzima de restricción SmaI. Se estudiaron 263 cepas de *Streptococcus pneumoniae* mediante ECP, 150 de muestras de adultos y 113 pediátricas. En total obtuvimos 121 pulsotipos y 46 clones diferentes, agrupando al 70,4% de las cepas en alguno de estos clones.

El análisis de los patrones de ECP utilizando el programa informático BioNumerics, mostró que existía relación clonal entre algunos aislados de un mismo

serotipo (figura 38-47). Por otro lado, en 17 (4, 6B, 6C, 8, 11A, 15A, 15B/C, 16F, 17F, 18, 19F, 23F, 31, 34, 35B, 35F y 38) de los 28 serotipos/serogrupos obtenidos, obtuvimos muy pocas cepas como para valorar su relación clonal o se halló una variabilidad alta entre las cepas del mismo serotipo.

En la figura 37 presentamos un ejemplo de ECP. Las cepas de los pocillos 1, 2, 3, 10 y 11 comparten el mismo pulsotipo y son todas del serotipo 1.

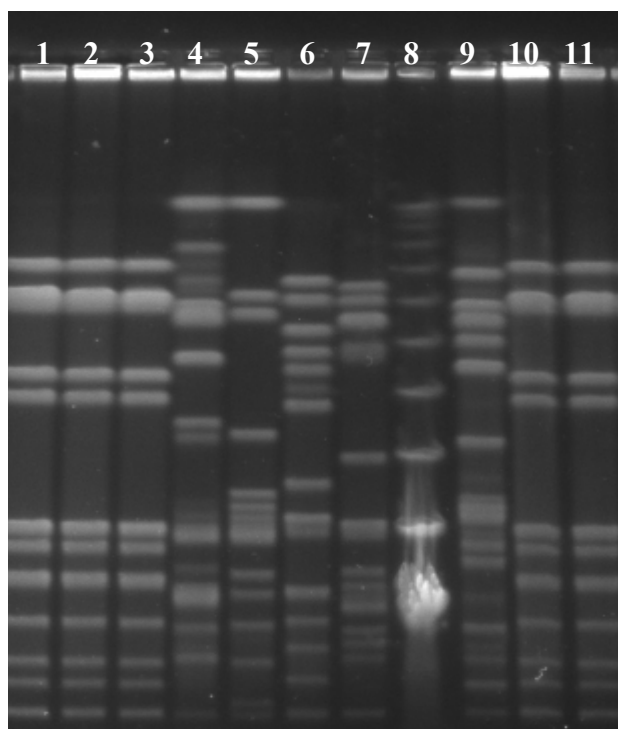


Figura 37: Imagen de una ECP de aislamientos de neumococo. De izquierda a derecha: **1.** Cepa 15, **2.** Cepa 20, **3.** Cepa 21, **4.** Cepa 22, **5.** Cepa 23, **6.** Cepa 24, **7.** Cepa 25, **8.** Marcador de peso molecular, **9.** Cepa 27, **10.** Cepa 28, **11.** Cepa 29.

a. Serotipo 1

Se estudiaron las 31 cepas del serotipo 1 mediante ECP, 25 pertenecían a pacientes diagnosticados de neumonía, de los cuales 9 desarrollaron un empiema, uno a un paciente con una artritis, 2 a pacientes con meningitis y el resto eran casos de bacteriemia.

El análisis de patrones de ECP utilizando el programa informático bioNumerics, diferenció 7 pulsotipos y 2 clones. El pulsotipo mayoritario (A), incluía 24 (77,4%)

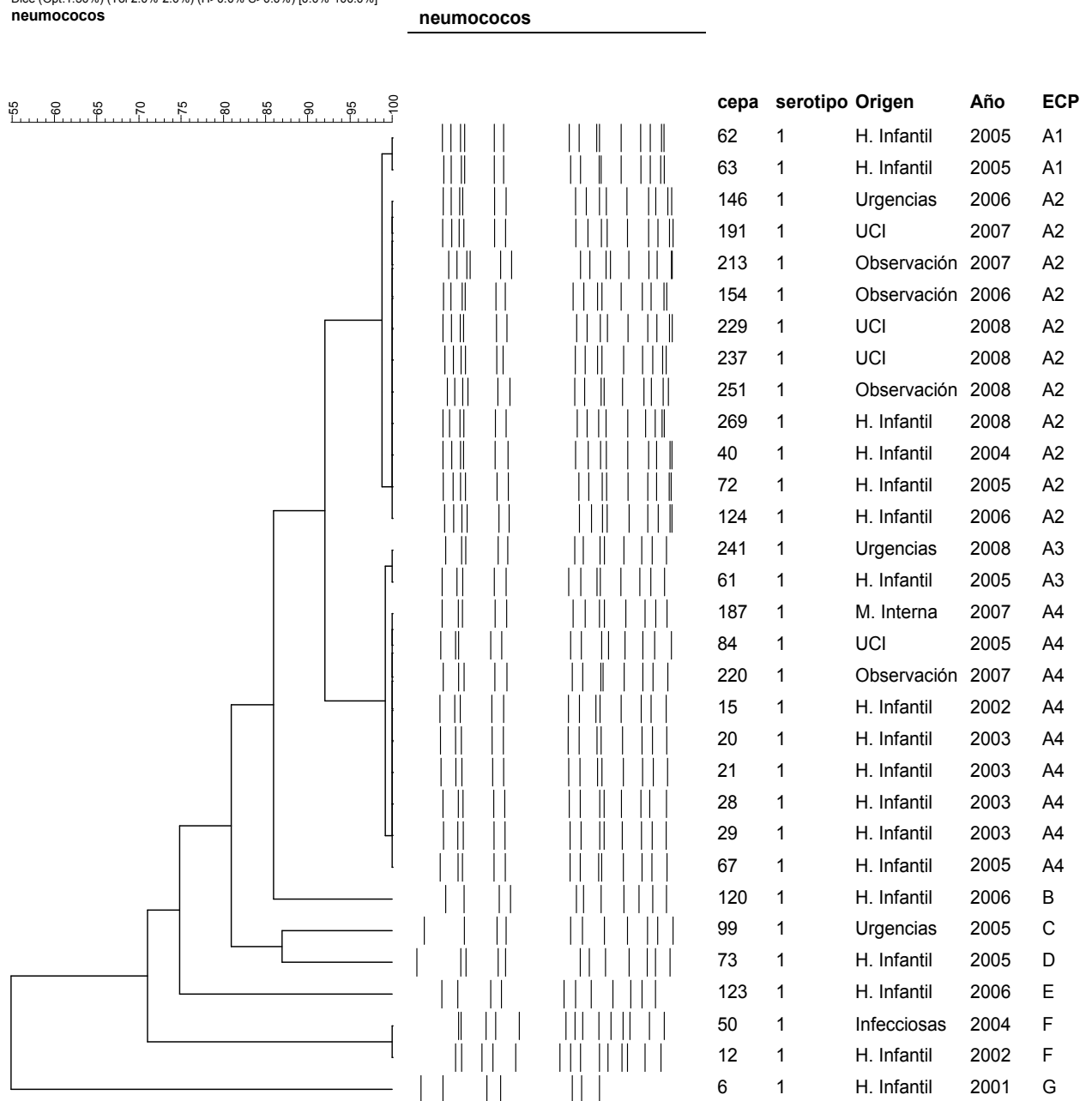
cepas (figura 38), sin clara relación epidemiológica, ya que se aislaron muy separados en el tiempo y en diferentes servicios.

Dentro de las 24 cepas del clon A, había 4 patrones (A1, A2, A3 y A4) de 2 cepas o más. El patrón que más cepas incluía era el A2 con 11 cepas, seguido del A4 con 9 cepas y por último el A1 y el A3 con 2 cepas en cada.

En total, el 84% de las cepas pertenecía a alguno de los dos clones.

Figura 38: Dendograma obtenido de las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 1

Dice (Opt:1.50%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
neumococos



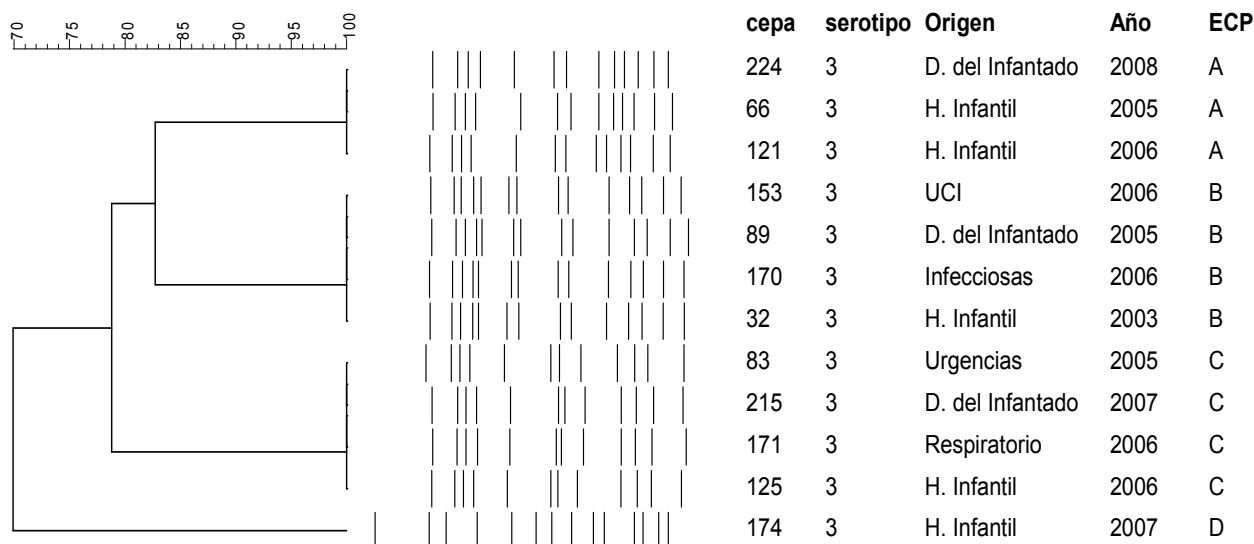
b. Serotipo 3

Figura 39: Dendograma obtenido de las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 3

Dice (Opt:1.50%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

neumococos

neumococos



En el caso del serotipo 3, hay dos cepas de las que no disponemos del patrón de ECP. En total se estudiaron 12 cepas del serotipo 3, que fueron responsables de 9 neumonías, de las cuales 3 fueron empiemas, 2 meningitis y 1 bacteriemias.

El análisis de patrones de ECP utilizando el programa informático BioNumerics, diferenció 4 pulsotipos y 3 clones diferentes. El 92% de las cepas se agrupaba en algún clon. El clon A tenía 3 cepas indistinguibles, aisladas en años diferentes, 2 pediátricas y una de adulto. Del clon B teníamos 4 cepas, una de 2003, otra de 2005 y 2 de 2006, con 5 meses de diferencia. El clon C, también formado por 4 cepas, 3 de adultos y una infantil, pertenecían a diferentes servicios y años (figura 39).

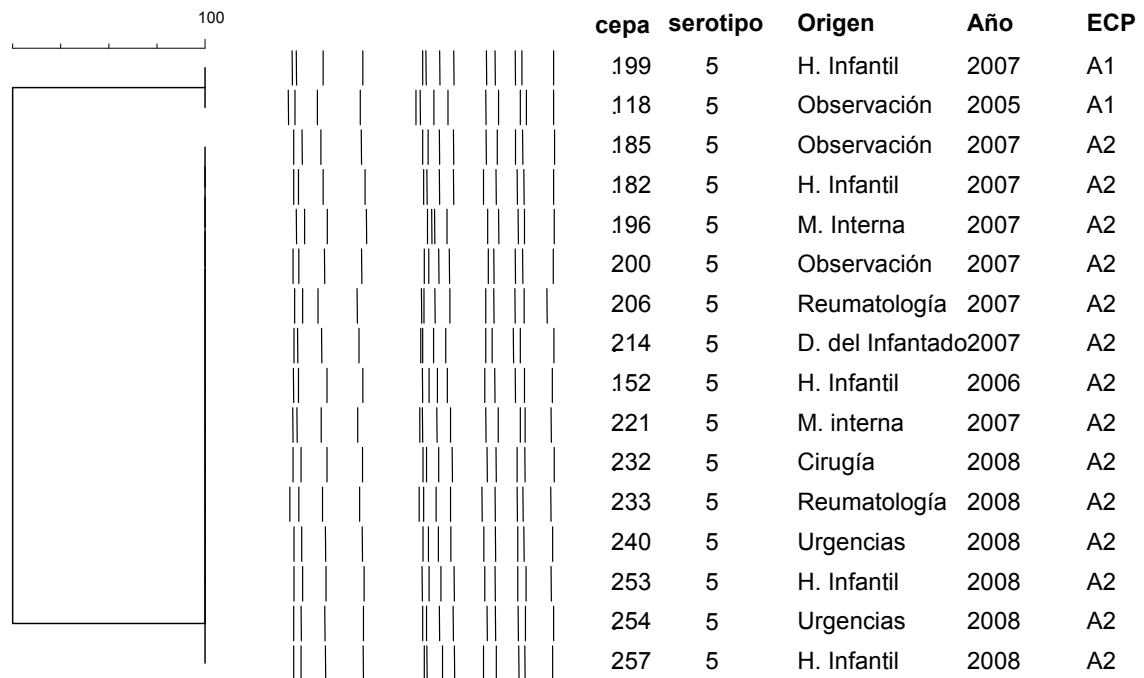
c. Serotipo 5

Se estudiaron las 16 cepas del serotipo 5 mediante ECP, siendo responsables de 11 neumonías y 5 bacteriemias. Todas pertenecían al mismo clon, en el que se distinguían dos patrones con una similitud del 99,20%. El patrón A1 incluía 2 cepas, una de adulto de 2005 y otra infantil de 2007. El patrón A2, el mayoritario, estaba

compuesto por 14 cepas. Menos una cepa de 2006, las otras cepas estaban repartidas entre 2007 y 2008 (figura 40).

Figura 40: Dendograma obtenido de las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 5. Los 16 aislamientos estudiados mostraron una similitud del 99,2%.

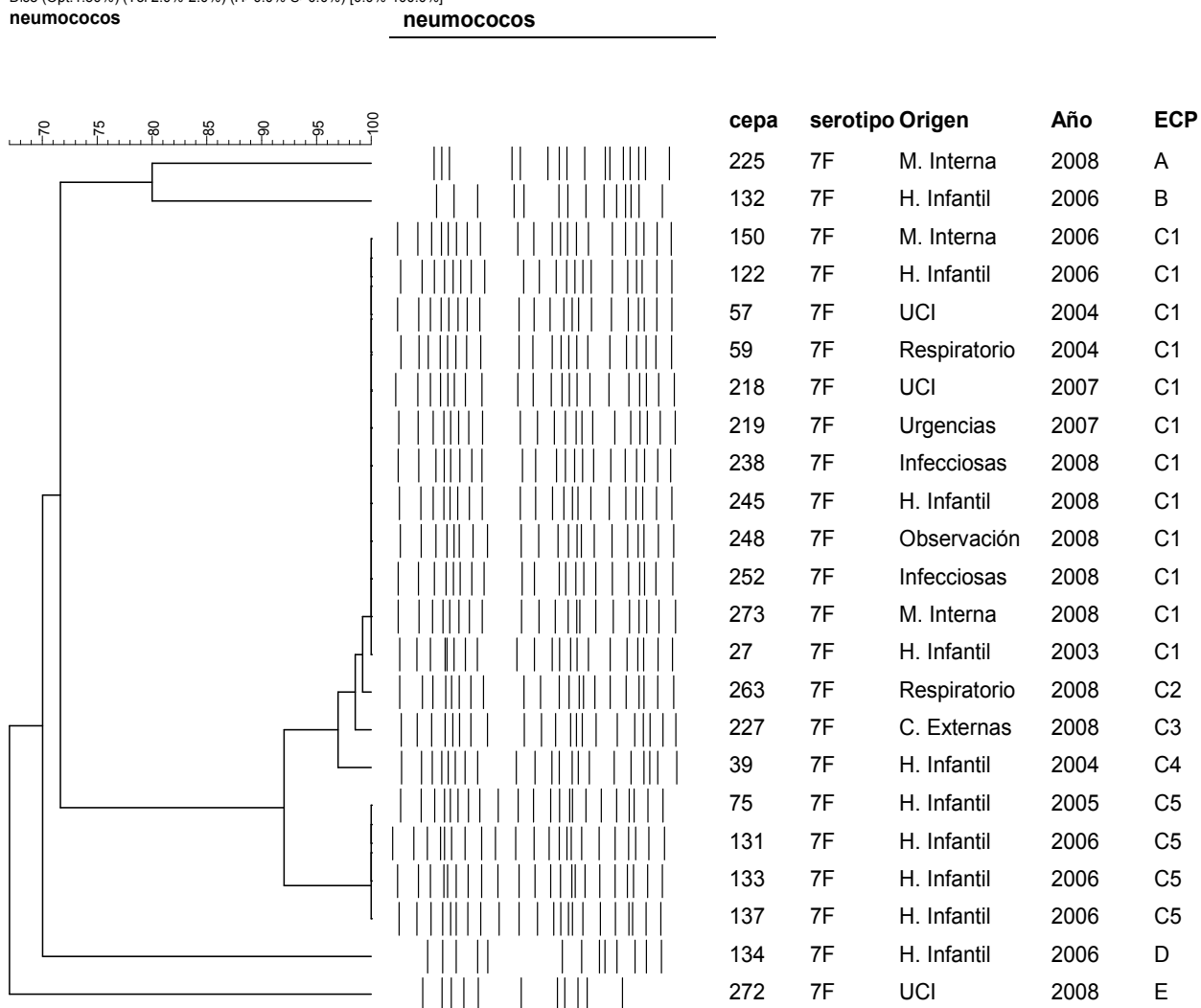
Dice (Opt:1.50%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
neumococos neumococos



d. Serotipo 7F

De las 25 cepas del serotipo 7F que teníamos, obtuvimos la ECP en 23, 14 neumonías, 1 empiema, 2 meningitis y 6 bacteriemias.

El análisis de patrones de ECP utilizando el programa informático BioNumerics, diferenció 5 pulsotipos, de los cuales uno fue el mayoritario (C), comprendiendo el 83% de las cepas (figura 41). El clon C incluía 19 cepas, divididas en 5 patrones. El C1, con 12 cepas, era el que tenía mayor número. El C2 incluía una cepa, el C3 otra, el C4 otra y el C5 estaba formado por 4 cepas, todas de niños, una de 2005 y tres de 2006.

Figura 41: Dendograma obtenido de las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 7FDice (Opt:1.50%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
neumococos

e. Serotipo 12F

En total se estudiaron las 10 cepas del serotipo 12F mediante ECP, 8 cepas pertenecientes a pacientes diagnosticados de neumonía, 1 de meningitis y otra de bacteriemia.

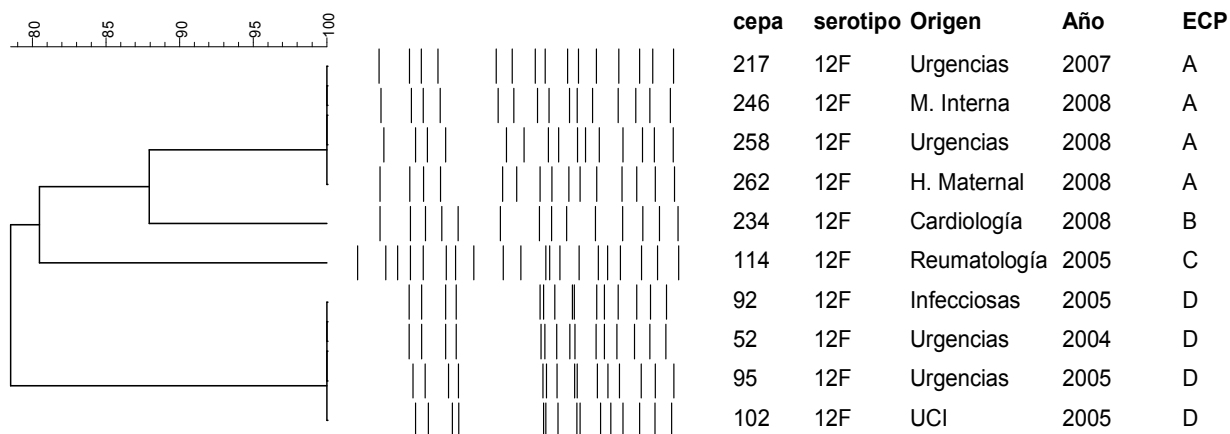
El análisis de patrones de ECP utilizando el programa informático BioNumerics, diferenció 4 pulsotipos y 2 clones, que engloban el 80% de las cepas. El clon A incluía 4 cepas indistinguibles, aisladas una en 2007 y 3 en 2008, todas de adultos. Del pulsotipo B y C había una cepa de cada. El clon D, también estaba formado por 4 cepas, aisladas entre 2004 y 2005 (figura 42).

Figura 42: Dendograma obtenido de las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 12F

Dice (Opt:1.50%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

neumococos

neumococos



f. Serotipo 14 y 9V

Se estudiaron 31 cepas de las 32 del serotipo 14 mediante ECP. El análisis de patrones de ECP utilizando el programa informático BioNumerics, incluyó las 7 cepas del serotipo 9V entre las cepas del serotipo 14. De este modo, algunas cepas del serotipo 9V estaban más relacionadas clonalmente con cepas del serotipo 14 que con las otras del 9V.

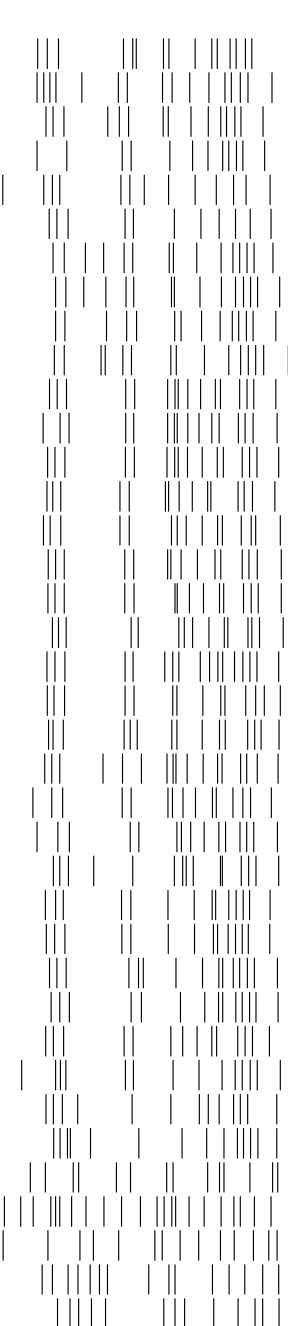
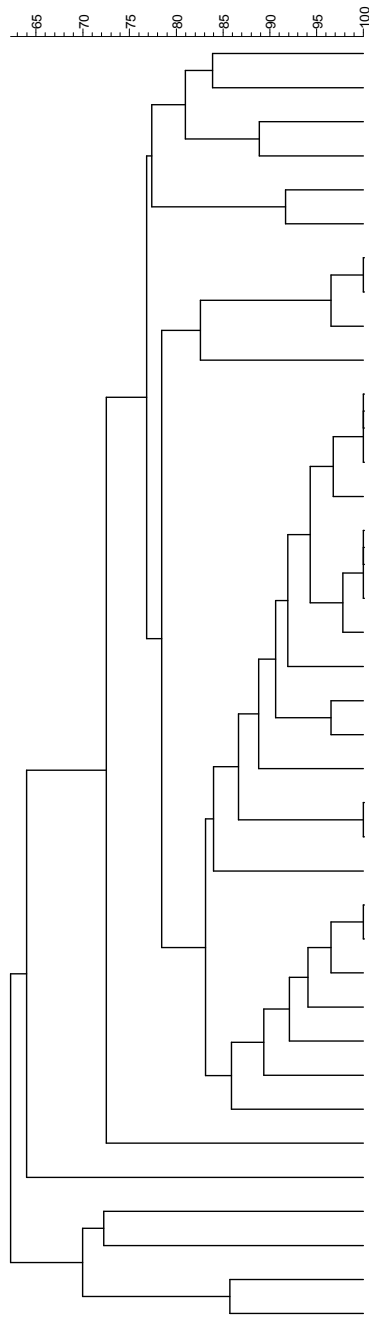
En la figura 43 se muestra el dendrograma del serotipo 14 y el 9V. Se pueden observar 20 pulsotipos y 5 clones, de los cuales el H es el mayoritario, con 11 cepas divididas en 7 patrones diferentes. El patrón H1, incluía 3 cepas, 2 del serotipo 9V y un del 14. Los dos del 9V se aislaron entre febrero y marzo del 2008. El paciente de la UCI tenía una meningitis y el paciente de Medicina Interna falleció con una sepsis. El patrón H2 incluía una cepa. Con el patrón H3, teníamos 3 cepas del serotipo 14, de adultos aisladas en 2005. Los patrones H4, H5, H6 y H7 incluían 1 cepa cada uno. En total el 60,5% (n=23) de las cepas formaba parte de algún clon.

Figura 43: Dendograma obtenido de las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 14 y 9V

Dice (Opt:1.50%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

neumococos

neumococos



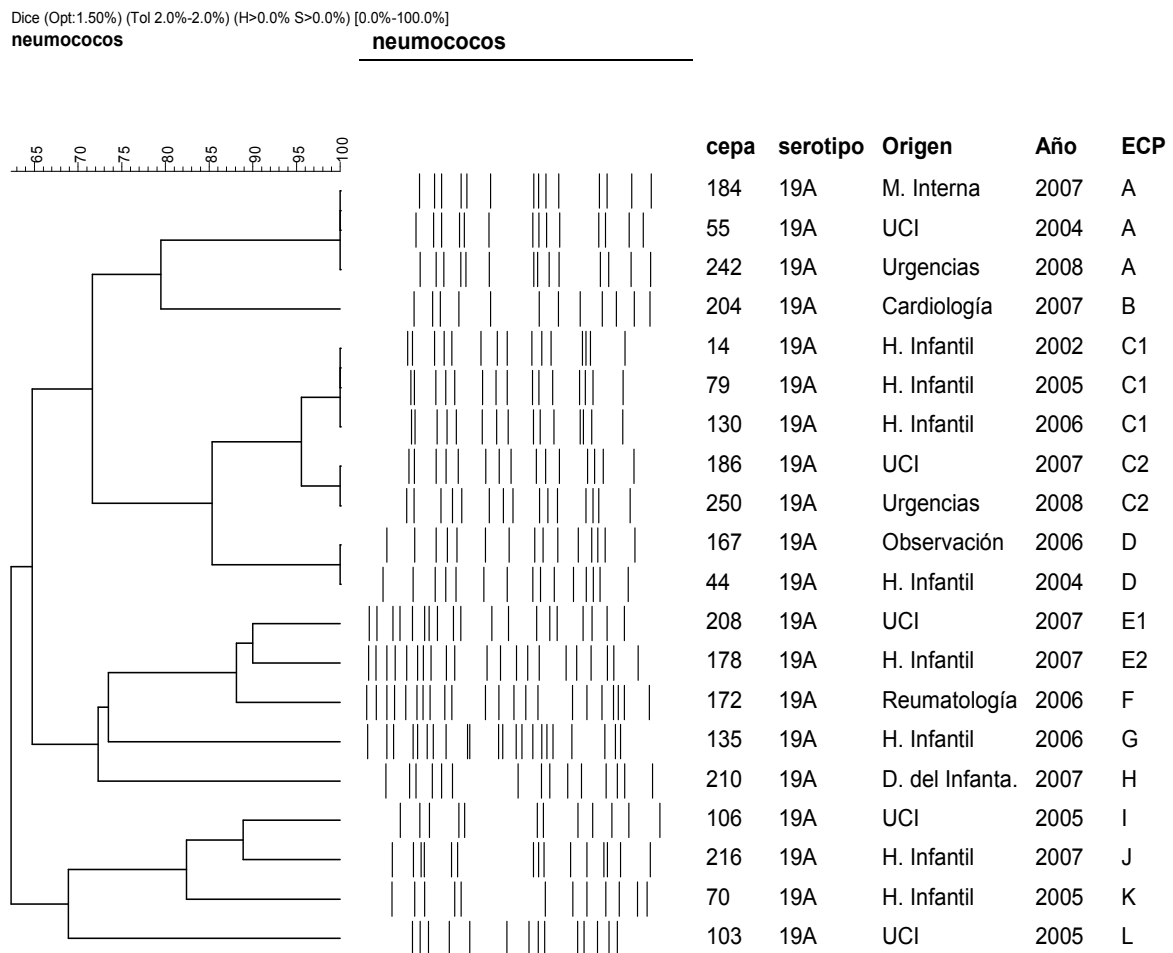
cepa	serotipo	Origen	Año	ECP
265	9V	Valme	2008	A
19	14	H. Infantil	2002	B
126	14	H. Infantil	2006	C
76	14	H. Infantil	2005	D
159	14	Urgencias	2006	E1
163	14	UCI	2006	E2
88	9V	Oncología	2005	F1
90	9V	Respiratorio	2005	F1
264	14	Valme	2008	F2
9	14	H. Infantil	2002	G
239	9V	M. Interna	2008	H1
243	9V	UCI	2008	H1
13	14	H. Infantil	2002	H1
136	14	H. Infantil	2006	H2
81	14	UCI	2005	H3
96	14	Hematología	2005	H3
117	14	Observación	2005	H3
169	14	Observación	2006	H4
26	14	H. Infantil	2003	H5
148	14	Hematología	2006	H6
43	14	H. Infantil	2004	H7
11	14	H. Infantil	2002	I
160	14	Observación	2006	J
260	14	M. Interna	2008	J
157	9V	UCI	2006	K
111	14	UCI	2005	L1
166	14	Hematología	2006	L1
261	9V	H. Infantil	2008	L2
259	14	Diálisis	2008	L3
109	14	Observación	2005	L4
51	14	M. Interna	2004	M
25	14	H. Infantil	2003	N
147	14	M. Interna	2006	Ñ
1	14	H. Infantil	2001	O
74	14	H. Infantil	2005	P
127	14	H. Infantil	2006	Q
24	14	H. Infantil	2003	R
71	14	H. Infantil	2005	S

g. Serotipo 19A

Se estudiaron mediante ECP, 20 de las 21 cepas del serotipo 19A, responsables de 8 neumonías, 3 meningitis y 9 bacteriemias.

El análisis de patrones de ECP utilizando el programa informático BioNumerics, diferenció 12 pulsotipos y 4 clones (60% de las cepas), de los cuales el C era el mayoritario con 5 cepas divididas en 2 patrones. Le seguía el clon A, con 3 cepas indistinguibles y los clones E y D con 2 cepas cada uno (figura 44). Las cepas se distribuyen entre diferentes servicios y años.

Figura 44: Dendograma obtenido de las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 19A



h. Serotipo 22F

En total se estudiaron 12 cepas del serotipo 22F, 7 neumonías, 1 meningitis, 1 peritonitis y 3 bacteriemias.

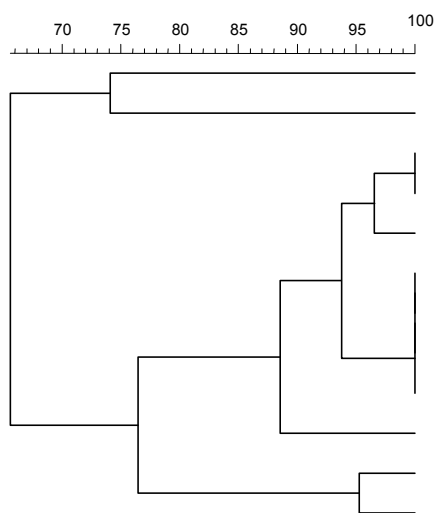
El análisis de patrones de ECP utilizando el programa informático BioNumerics, diferenció 5 pulsotipos, de los cuales uno era mayoritario con 7 cepas (clon C). Dentro del clon C encontramos 3 patrones (figura 45). El C1 contenía 2 cepas indistinguibles, el patrón C2 estaba formado por una cepa y el patrón C3 contenía 4 cepas indistinguibles, una infantil aislada en 2004 y 3 de adultos aisladas en febrero de 2005. Dos de éstos tres últimos eran pacientes ingresados en el Duque del Infantado y del tercero se desconoce este dato. Este último paciente y uno de los del Duque del Infantado fallecieron durante el episodio de la ENI. El 75% de las cepas formaba parte de uno de los dos clones.

Figura 45: Dendograma obtenido de las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 22F

Dice (Opt:1.50%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

neumococos

neumococos



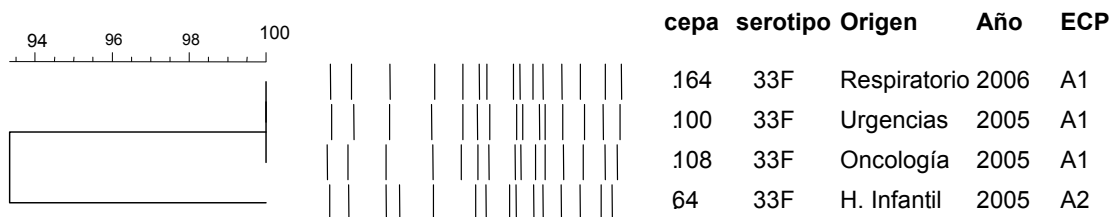
cepa	serotipo	Origen	Año	ECP
176	22F	H. Infantil	2007	A
226	22F	Urgencias	2008	B
54	22F	Reumatología	2004	C1
34	22F	H. Infantil	2003	C1
235	22F	M. interna	2008	C2
93	22F	Desconocido	2005	C3
94	22F	D. del Infantado	2005	C3
97	22F	D. del Infantado	2005	C3
45	22F	H. Infantil	2004	C3
266	22F	Reumatología	2008	D
104	22F	Infecciosas	2005	E1
270	22F	Respiratorio	2008	E2

i. Serotipo 33F

El análisis de los patrones de las 4 cepas del serotipo 33F, mostró que había una relación clonal entre ellas. Con una similitud de más del 90%, las 4 eran parte de un

clon con 2 patrones diferentes. El patrón A1 englobaba 3 cepas indistinguibles. Las tres pertenecen: Dendograma obtenido de las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 19A en adultos, pero fueron aisladas en años o meses diferentes. Con el patrón A2 había una cepa de un niño.

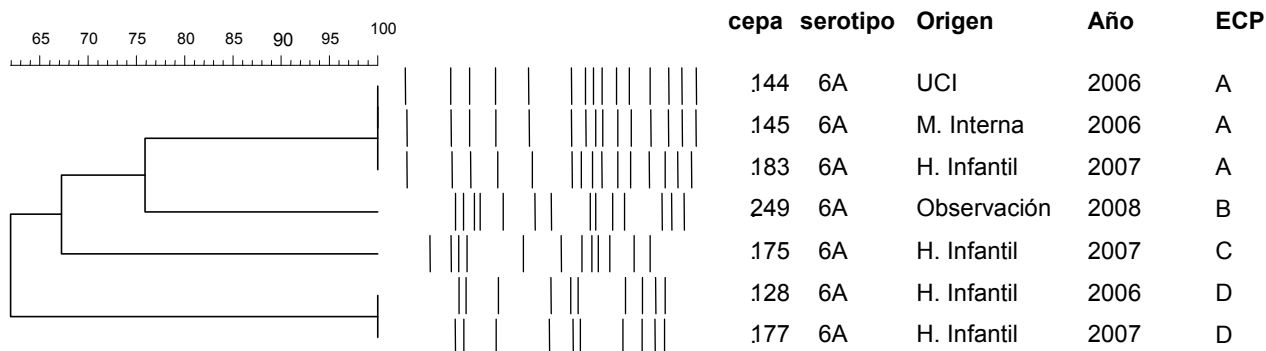
Figura 46: Dendograma obtenido de las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 33F



j. Serogrupo 6

Se estudiaron mediante ECP las 7 cepas del serotipo 6A. El análisis mostró 4 pulsotipos y dos clones (71% de las cepas). El clon A incluía 3 cepas indistinguibles, 2 de adultos de 2006 y una infantil de 2007. La cepa 144 fue aislada en febrero de 2006 del LCR de un paciente de la UCI con meningitis. La cepa 145 se aisló en mayo de 2006 en un hemocultivo de un paciente de Medicina Interna con neumonía. Los pulsotipos B y C sólo contenían una cepa y el clon D incluía 2 cepas indistinguibles de dos casos de meningitis del infantil, uno de 2006 y otro de 2007 (figura 47).

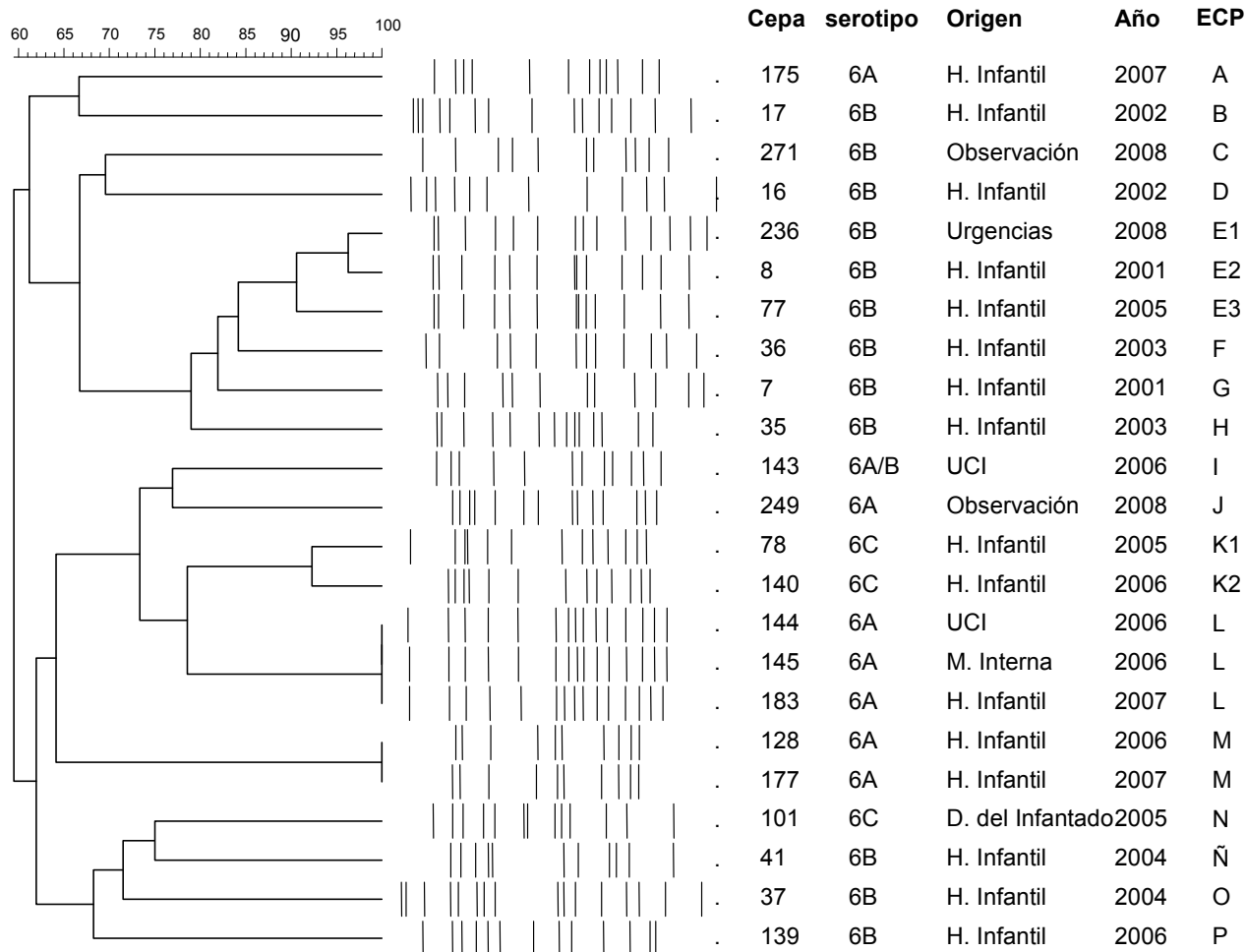
Figura 47: Dendograma obtenido de las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 6A



Si estudiamos el análisis clonal de las cepas de todos los tipos del serotipo 6, se observa que no existe una relación clonal entre ellas. Entre las cepas del serotipo 6B,

hubo un clon (E) con 3 cepas de patrón diferente que pertenecían a pacientes pediátricos y que se aislaron en 2001, 2005 y 2008.

Figura 48: Dendograma obtenido de las cepas de *S. pneumoniae* serogrupo 6.



6.7. ESTUDIO DE RESISTENCIAS A FLUORQUINOLONAS

6.7.1. Estudio fenotípico de la resistencia a fluorquinolonas

Con el objetivo de caracterizar y vigilar las resistencias a fluorquinolonas en nuestros aislamientos invasivos de *Streptococcus pneumoniae*, evaluamos la actividad de levofloxacin (LVX) y norfloxacin (NFX) mediante difusión en placa y posterior caracterización molecular de las cepas resistentes a NFX.

Tras realizar la prueba de “screening” propuesta por la Sociedad Francesa de Microbiología para detectar mutantes de primer paso y la consiguiente caracterización molecular, pudimos establecer una correlación entre el genotipo y fenotipo obtenido.

De las 274 cepas en las que se evaluó la actividad de LVX por E-test, todas fueron sensibles excepto 2 aislamientos (0,7%) que presentaron resistencia a LVX, con una CMI >32 µg/ml en los dos casos. En el resto (99,3%) la CMI a LVX fue ≤ 2 µg/ml. Utilizando el método de cribado con el disco de 5 µg de NFX, obtuvimos 23 (8,4%) aislamientos resistentes a NFX. Sin embargo, sólo 14 (5,1%) aislamientos de los 23 se confirmaron por el método E-test, con una CMI >16 µg/ml (tabla 26). De estos, 10 pertenecían a adultos y 4 a niños (tabla 27). De los 10 aislamientos de adultos, 8 eran sensibles a LVX y los otros dos fueron los aislamientos que tenían una CMI de LVX > 32 µg/ml. En los 8 aislamientos sensibles a LVX, pero resistentes a NFX, estaríamos ante posibles mutantes de primer paso. En los 2 aislamientos con CMI a LVX >32 µg/ml y a NFX >16 µg/ml estaríamos ante 2 posibles mutantes de alto nivel. Los 4 aislamientos pediátricos con CMI a NFX >16 µg/ml, fueron sensibles a LVX (CMI ≤ 2). Si observamos los resultados de adultos y niños por separado, nos encontramos que el porcentaje de resistencia a NFX y LVX es de 6,3% y 1,3% frente a 3,5% y 0% respectivamente.

Tabla 26: Resultados de las pruebas de sensibilidad a fluorquinolonas por los diferentes métodos probados.

Pacientes	Antimicrobianos						
	N	Levofloxacino (E-test)		Norfloxacino (Difusión disco)		Norfloxacino (E-test)	
		S	R	S	R	S	R
Adultos	159	157	2 (1,3)	143	16 (10,1)	149	10 (6,3)
Niños	115	115	0	108	7 (6,1)	111	4 (3,5)
Total	274	272 (99,3)	2 (0,7)	251 (91,6)	23 (8,4)	260 (94,9)	14 (5,1)

Tabla 27: CMI de NFX y LVX de los 14 aislamientos resistentes a NFX.

Cepa	Grupo de edad	CMI NFX (µg/ml)	CMI LVX (µg/ml)
14	Pediátrico	24	1
32	Pediátrico	24	1
42	Pediátrico	24	1
87	Adulto	>256	1,5
90	Adulto	>256	>32
127	Pediátrico	24	1
143	Adulto	>256	2
156	Adulto	>256	1,5
162	Adulto	>256	2
172	Adulto	>256	2
184	Adulto	>256	2
201	Adulto	128	2
203	Adulto	24	1
242	Adulto	>256	>32

6.7.2. Estudio molecular de la resistencia a fluorquinolonas

Las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a norfloxacin, se caracterizaron molecularmente mediante el estudio de las mutaciones en los genes QRDR, serotipado y patrones de electroforesis en campo pulsante. Posteriormente se realizó el estudio de la presencia de otro mecanismo de resistencia asociado a las bombas de reflujo mediante su inhibición con reserpina.

a. Hibridación Reversa con sondas

El estudio de las mutaciones en los genes QRDR, se realizó con un sistema comercial basado en una amplificación de los genes *gyrA* y *parC* seguida de una hibridación reversa con sondas específicas. A los 14 aislamientos resistentes a NFX por E-test se les realizó la prueba de amplificación e hibridación con sondas específicas de los genes *gyrA* y *parC* (tabla 28).

Tabla 28: Resultados de la hibridación reversa con sondas de las cepas resistentes a norfloxacina.

Cepa	CMI NFX ($\mu\text{g/ml}$)	CMI LVX ($\mu\text{g/ml}$)	Mutaciones <i>parC</i> por sonda	Mutaciones <i>gyrA</i> por sonda
14	24	1	N	N
32	24	1	N	N
42	24	1	N	N
87	>256	1,5	P	N
90	>256	>32	P	N
127	24	1	N	N
143	>256	2	P	N
156	>256	1,5	P	N
162	>256	2	P	N
172	>256	2	N	N
184	>256	2	P	N
201	128	2	P	N
203	24	1	N	N
242	>256	>32	P	P

N: negativo. P: positivo.

Sólo en uno de los 2 aislamientos con resistencia de alto nivel, se detectaron mutaciones en los dos genes. En el otro aislamiento la hibridación con el *gyrA* (secuencia salvaje) fue positiva y por tanto no encontramos mutación en este gen. De los 12 aislamientos con resistencia de primer paso, en 6 se detectó la mutación en *parC*, mientras que el *gyrA* hibridó con la secuencia salvaje. En los otros 6 aislamientos la hibridación fue positiva para los dos genes y por tanto no detectamos mutaciones en ninguna de las secuencias. En los 9 casos con la NFX resistente por disco y sensible por e-test, no encontramos mutaciones asociadas a resistencia.

b. Secuenciación de los genes QRDR

Todas las mutaciones detectadas por hibridación con sondas se confirmaron por secuenciación, siendo la sustitución S79F del *parC* la mutación más común observada entre las mutaciones asociadas a resistencia. Por secuenciación se detectó otra cepa más (la cepa 172) con mutación en *parC* que no había sido detectada por el sistema comercial. En este caso la sustitución detectada fue S79Y.

En total, 7 (58.3%) de los 12 aislamientos con resistencia de primer paso mostraron una mutación asociada a resistencia en *parC*. Sólo en una de las dos cepas con resistencia de alto nivel encontramos mutaciones asociadas a resistencia en los dos genes. La otra cepa resistente a LVX (cepa 90) sólo mostró una mutación en el gen *parC*. Todas las sustituciones detectadas por secuenciación se muestran en la tabla 29.

Tabla 29: Mutaciones detectadas por secuenciación en los genes *parC*, *parE* y *gyrA*.

Cepa	CMI NFX (µg/ml)	CMI LVX (µg/ml)	Mutaciones detectadas en QRDR			
			<i>parC</i>	<i>parE</i>	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>
14	24	1	ND	I-460-V	Y-75	ND
32	24	1	ND	ND	Y-75, H-104	ND
42	24	1	ND	ND	Y-75	ND
87	>256	1,5	S-79-F , G-77	I-460-V	Y-75	ND
90	>256	>32	S-79-Y , K-137-N	I-460-V	Y-75	ND
127	24	1	K-137-N	I-460-V	Y-75	ND
143	>256	2	S-79-F , G-77	ND	Y-75	ND
156	>256	1,5	S-79-Y	ND	ND	ND
162	>256	2	S-79-F , G-77	I-460-V	Y-75	ND
172	>256	2	S-79-Y	I-460-V	Y-75	ND
184	>256	2	S-79-F	ND	Y-75	ND
201	128	2	S-79-Y	ND	Y-75	ND
203	24	1	K-137-N	I-460-V	Y-75, Y-98	ND
242	>256	>32	S-79-F	ND	S-81-F , Y-75	ND

Aminoácidos: S, serina; F, fenilalanina; Y, tirosina; K, lisina; N, asparagina; I, isoleucina; V, valina; H: histidina y G: glicina. ND: No detectadas. QRDR, *Quinolone Resistance Determining Region*.

Las mutaciones K-137-N e I-460-V aparecen tanto en cepas sensibles como en resistentes y no se asocian a la resistencia. También se encontraron mutaciones silenciosas en la tirosina de la posición 75 del gen *gyrA*, la tirosina de la posición 98 del gen *gyrA*, la histidina de la posición 104 del gen *gyrA* y la glicina de la posición 77 del gen *parC*, en las que el cambio de nucleótido no supuso un cambio del aminoácido.

Entre los 14 aislamientos de *S. pneumoniae* resistentes a norfloxacin encontramos 9 serotipos diferentes, 19A (4 aislamientos), 8 (n=2), 6A (n=1), 14 (n=1),

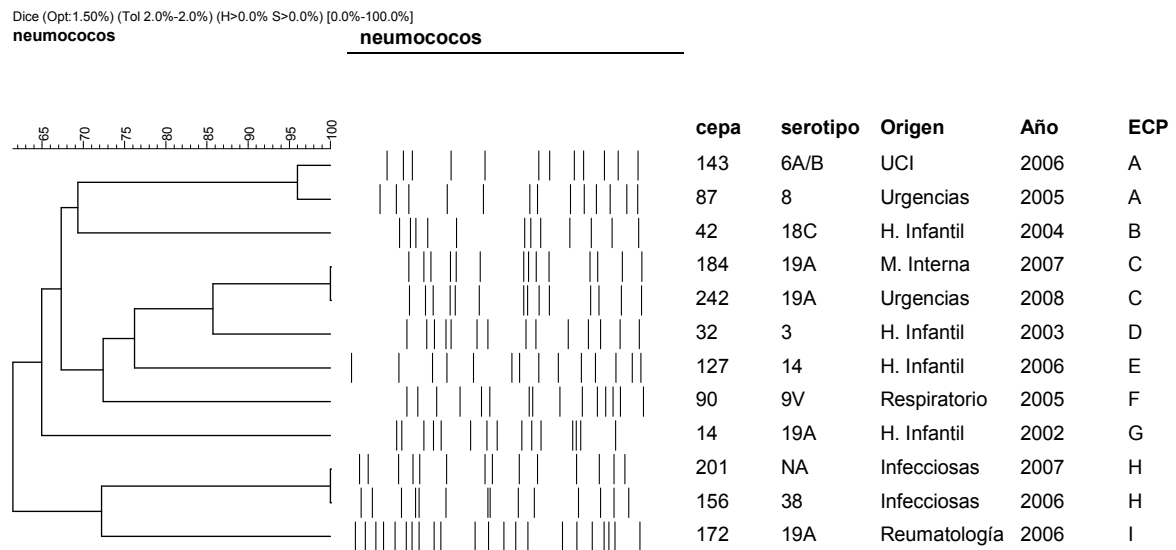
18 (n=1), 38 (n=1), 3 (n=1), 9V (n=1), 7F (n=1) y un aislamiento que no fue tipable por PCR.

c. Electroforesis en campo pulsante (ECP)

Los patrones obtenidos mediante ECP revelaron una considerable heterogeneidad entre las cepas resistentes a norfloxacin y como se muestra en la figura 49, la mayoría no estaban genéticamente relacionadas. En 2 de las 14 cepas (cepa 162 y 203) no se obtuvieron resultados de ECP.

Obtuvimos 9 perfiles diferentes, 3 de los cuales contenían 2 aislamientos cada uno. Dos de los aislamientos con el mismo perfil electroforético pertenecían al serotipo 19A (cepa 184 y 242) y resultaron ser del mismo paciente. Los aislamientos fueron obtenidos en diferentes episodios. Las hospitalizaciones de estos episodios estaban separadas entre sí por 4 meses.

El paciente es un varón de 28 años edad con Síndrome de Job, también conocido como síndrome de hiperinmunoglobulina E. Se caracteriza por abscesos cutáneos recurrentes, dermatitis atópica, neumonía y altos niveles séricos de IgE. En el primer episodio, el paciente ingresó con una NAC. Se le tomaron muestras de sangre y esputo y se le trató empíricamente con LVX. En ambas muestras creció un *S. pneumoniae* sensible a penicilina (CMI por E-test 0,016µg/ml) y LVX (CMI por E-test 2 µg/ml). El paciente fue hospitalizado dos meses más tarde con el mismo diagnóstico (NAC). No se obtuvo ningún aislamiento, pero volvió a ser tratado con LVX. Cuatro meses después del primer ingreso, volvió al hospital con una NAC. El *S. pneumoniae* aislado esta vez en los hemocultivos fue sensible a la penicilina (MIC 0.006 µg/ml), pero resistente a la LVX (MIC >32 µg/ml). Los estudios moleculares posteriores mostraron una mutación S79F en el *parC* del primer aislamiento y una mutación adicional en el *gyrA* (S81F) en el segundo aislamiento.

Figura 49: ECP de los aislamientos de *S. pneumoniae* resistentes a norfloxacina**d. Multilocus Sequence Typing (MLST)**

Los resultados obtenidos del análisis de ADN mediante secuenciación se muestran en la tabla 30. Las cepas con el mismo tipo de secuencia están sombreadas con el mismo color. En 3 aislamientos (nº 32, 42 y 127) no se pudo realizar la técnica.

Tabla 30: MLST de los neumococos resistentes a NFX.

CEPA	Serotipo	ECP	ST	Nº asignado por alelo						
				<i>aroE</i>	<i>gdh</i>	<i>gki</i>	<i>recP</i>	<i>spi</i>	<i>xpt</i>	<i>ddl</i>
14	19A	G	7466	2	19	2	17	6	22	271
87	8	A	7340	2	5	36	12	17	21	271
90	9V	F	7464	7	99	10	1	6	58	1
143	6A	A	7340	2	5	36	12	17	21	271
156	38	H	105	5	15	4	1	6	1	6
162	8	-	7340	2	5	36	12	17	21	271
172	19A	I	7465	7	5	1	1	6	31	271
184	19A	C	1201	1	5	1	12	17	3	8
201	NA	H	105	5	15	4	1	6	1	6
203	7F	-	7341	8	9	2	1	6	446	17
242	19A	C	1201	1	5	1	12	17	3	8

ECP: Electroforesis en campo pulsante. ST: Sequence Type.

Los resultados obtenidos mediante MLST mostraron concordancia con los obtenidos mediante ECP. Las tres parejas de clones obtenidas por ECP contenían el mismo perfil alélico por MLST. Con el MLST pudimos además obtener el tipo de secuencia de los dos aislamientos que no se pudieron genotipar por ECP. Uno de ellos (cepa 162) mostró el mismo perfil alélico que una de las anteriores parejas de clones (cepa 87 y 143). En este caso el serotipo de la cepa 162 coincidía con el de la cepa 87, el serotipo 8.

6.7.3. Estudio del efecto de las bombas de expulsión

En cuanto a los resultados del estudio del efecto de las bombas de expulsión, utilizamos reserpina como inhibidor de bombas. En total, 10 (71,4%) aislamientos fueron susceptibles al efecto inhibidor de la reserpina. Los 5 aislamientos en los que no se detectó ninguna mutación en los genes QRDR, pero fenotípicamente eran resistentes a la norfloxacin, mostraron un efecto positivo para la reserpina. El aislamiento con alto nivel de resistencia que sólo mostró mutación en el *parC*, también fue susceptible al efecto de la reserpina.

Las CMI de NFX que obtuvimos por microdilución en el ensayo de la reserpina, variaron en una o dos diluciones respecto a las obtenidas por E-test, pero se mantenía la misma categoría, excepto en dos cepas. Las dos cepas tenían una CMI de 24µg/ml por E-test y 16µg/ml por microdilución. En ninguna se detectaron mutaciones y el estudio de las bombas con reserpina fue positivo.

Tabla 31: Características fenotípicas y moleculares de las cepas resistentes a norfloxacina.

Cepa	Serotipo	CMI NFX (µg/ml)	CMI LVX (µg/ml)	Mutaciones <i>parC</i> por sonda	Mutaciones <i>gyrA</i> por sonda	Mutaciones <i>parC</i> por secuenciación	Mutaciones <i>parC</i> por secuenciación	Efecto reserpina
14	19A	24	1	N	N	WT	WT	P
32	3	24	1	N	N	WT	WT	P
42	Sg18	24	1	N	N	WT	WT	P
87	8	>256	1,5	P	N	S79F	WT	N
90	9V	>256	>32	P	N	S79Y	WT	P
127	14	24	1	N	N	WT	WT	P
143	6A	>256	2	P	N	S79F	WT	N
156	38	>256	1,5	P	N	S79Y	WT	N
162	8	>256	2	P	N	S79F	WT	P
172	19A	>256	2	N	N	S79Y	WT	P
184	19A	>256	2	P	N	S79F	WT	P
201	NA	128	2	P	N	S79Y	WT	N
203	7F	24	1	N	N	WT	WT	P
242	19A	>256	>32	P	P	S79F	S81F	P

N.A.: No amplificación. N: negativo. P: positivo. WT: wild type.

7. DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

Las neumonías y otitis neumocócicas han tenido y tienen una importancia vital en la sociedad, sin embargo, en este trabajo nos hemos querido centrar en el estudio de la enfermedad neumocócica invasiva (ENI) en nuestro entorno, tanto en niños como en adultos, así como en los serotipos y genotipos que la producen.

S. pneumoniae es uno de los principales agentes de bacteriemia y sepsis en adultos y niños. Aproximadamente, el 25% de los casos de bacteriemia en niños sanos se asocia con una otitis media, el 30-40% con una neumonía y en el resto el foco es indetectable (11,115-117). Sin embargo, el origen del 90% de las bacteriemias en los adultos es una neumonía (118).

A pesar de la terapia antimicrobiana, la enfermedad neumocócica invasiva (ENI) en niños persiste como la mayor causa de morbi-mortalidad en el mundo (119). La incidencia de ENI en niños a nivel mundial varía, según un estudio realizado por Greenwood *et al.* (120) antes de la introducción de la vacuna conjugada, desde 100 casos/100,000 niños en Finlandia, hasta más de 1,000/100,000 en niños aborígenes australianos. En este mismo trabajo, se compara la edad de aparición de la ENI entre los niños de Gambia y los niños de poblaciones de alto y bajo riesgo en Estados Unidos, comprobándose que se dan a una edad más temprana en Gambia.

La variabilidad que encontramos en los distintos países respecto a la epidemiología de la ENI se debe tanto a la diferencia en la susceptibilidad de la población a la enfermedad como a las diferencias en el diagnóstico y el tratamiento. Esta variabilidad podemos verla comparando algunos de los trabajos publicados.

En Canadá, se hizo en 1998 un estudio de 292 casos de ENI en niños (121), donde el 70,5% fueron bacteriemias sin foco, 8% meningitis y 10% neumonía. La mortalidad fue de 0,7%. En 2001, Laurichesse *et al.* (122) publicaron un estudio de ENI en una región francesa entre 1994-1998 donde observaron la incidencia más alta en niños menores de 2 años. El 62% del total de pacientes fue diagnosticado de neumonía,

el 10% de meningitis y el 20% de bacteriemia sin foco con una tasa global de mortalidad del 21,5%. En 2004, Ispahani *et al.* (123) publican un análisis prospectivo en el Reino Unido, de 266 episodios de ENI en niños, de los cuales el 39% pertenecen a niños menores de 1 año y 60% a niños de 2 años. Las principales patologías fueron la meningitis, en un 32%, la neumonía en un 31% y la bacteriemia sin foco en un 30%. En septiembre de 2011 se ha publicado un trabajo retrospectivo sobre la ENI pediátrica en Arabia Saudí, donde incluyeron 41 pacientes entre 2 y 12 años. El 27% fueron meningitis, 32% bacteriemias sin foco y 34% neumonías bacteriémicas (124).

De los 274 pacientes que incluimos en nuestro estudio, 146 (53%) fueron diagnosticados de neumonía bacteriémica, de los cuales 26 desarrollaron un empiema, 71 (26%) fueron diagnosticados de bacteriemia sin foco y 52 (19%) de meningitis. Si sólo tenemos en cuenta los 115 niños, 52 (45%) tuvieron una neumonía bacteriémica, 29 (25%) una bacteriemia sin foco y 32 (28%) una meningitis.

El número de casos de ENI más alto en nuestro trabajo, también (122,126) lo encontramos entre los niños menores de 2 años, seguido de adultos mayores de 60 años, aunque hay que tener en cuenta que desconocemos los casos de enfermedad neumocócica no invasiva de cada grupo etario.

La tasa de neumonía bacteriémica, de meningitis y de bacteriemia sin foco en la población pediátrica varía de un país a otro e incluso de un trabajo a otro. Así, podemos encontrar un 69% de bacteriemias sin foco en Finlandia (127), frente a un 18% en Reino Unido (128) y hasta un 1% en Gambia (129). Sin embargo, en este último, las neumonías bacteriémicas suponen un 77% de la ENI, 4-5 veces mayor que en los estudios anteriores.

El porcentaje de bacteriemias sin foco hallado en niños en nuestro estudio (25%) se sitúa por debajo de los valores del estudio Finandés, pero es mayor que el de Reino Unido. El número de neumonías bacteriémicas (45%) también se encuentra dentro de los rangos hallados en otros estudios (127,129). En general, la distribución de los cuadros clínicos en este trabajo se asemeja a la publicada por otros autores (123-125).

El grado de severidad y la mortalidad hallada difiere de unos trabajos a otros. Mientras en Estados Unidos o Canadá la mortalidad es más baja, hemos visto una mortalidad de 21% en el trabajo de Laurichesse (122). En nuestro estudio la mortalidad hallada en el total de los casos de ENI fue del 12%, siendo en adultos y niños del 16% y 6% respectivamente. En los adultos, el 81% de los fallecidos fueron pacientes diagnosticados de neumonía. Aunque no dispongamos del número total de NAC ni de la enfermedad de base, los resultados hallados concuerdan con el hecho de que en la NAC en adultos la mortalidad aumenta con la edad (130). Otro factor predisponente es el sexo, siendo el riesgo mayor en hombres (130). En nuestro caso, aunque hubo más fallecimientos entre los hombres, la diferencia no fue significativa debido a que también hubo un mayor número de infecciones neumocócicas invasivas entre esta población.

Entre las formas clínicas más comunes de la ENI, la meningitis suele ser la menos frecuente, aunque con una gravedad y secuelas importantes. Los principales agentes de la meningitis bacteriana en niños son similares en países industrializados y en vías de desarrollo, sin embargo la incidencia y la mortalidad son mayores en estos últimos (120).

Aunque en nuestro estudio no disponemos de datos sobre el número casos de neumonías totales, ni de aislamientos en muestras no invasivas, sabemos que de los 274 aislamientos invasivos del estudio, hubo 222 que sólo se hallaron en sangre y que de éstos, 135 pertenecían a pacientes diagnosticados de neumonía, 71 a bacteriemias sin foco, 14 a meningitis y 2 a otras patologías. De los 52 casos de meningitis que registramos, hubo 19 en los que el neumococo sólo se aisló en LCR, 14 en los que sólo se aisló en el hemocultivo y 19 casos en los que se aisló el neumococo tanto en sangre como en LCR. Por lo tanto, en 38 de los 52 casos se halló en neumococo en LCR y en 33 de los 52 casos en sangre, alcanzando así una rentabilidad diagnóstica del 73% y 63,5% respectivamente.

El método de referencia en el diagnóstico de la meningitis bacteriana sigue siendo la observación de anomalías en el LCR extraído por punción lumbar. Además, el examen microscópico y el cultivo proporcionan el diagnóstico etiológico en la mayoría de los casos de meningitis bacteriana (119). La microscopía y el cultivo del LCR han demostrado mayor sensibilidad (70-80%) que los hemocultivos en el diagnóstico de la

neumonía neumocócica (120). Por tanto, parece haber resultados más eficaces en el diagnóstico de las meningitis que en las neumonías bacteriémicas.

La sensibilidad de las actuales herramientas diagnósticas para definir la etiología de las infecciones del tracto respiratorio inferior es aún limitada, dificultando la valoración del papel específico que juega la neumonía neumocócica en la salud pública, tanto en niños como en adultos (119). El hemocultivo, el método más utilizado, tiene una sensibilidad de 3-30% (131). Existen también ciertos factores que contribuyen a reducir aún más la sensibilidad, como el volumen de sangre recogido y el tratamiento antibiótico previo a la extracción. En la guía realizada por la “British Thoracic Society” sobre la NAC en adultos en 2009, recomiendan utilizar las pruebas microbiológicas en función de la severidad de la neumonía (132). Según la guía de 2011 para la NAC pediátrica, se realizarán hemocultivos en función de la gravedad del paciente (133).

En adultos, uno de los avances que permitió mejorar el diagnóstico de la neumonía neumocócica y orientar su tratamiento ha sido la detección de antígenos neumocócicos en orina mediante un ensayo inmunocromatográfico rápido (134). En niños esta técnica no resulta útil, debido al número de falsos positivos en portadores nasofaríngeos.

Aunque en la práctica clínica, la tasa de detección de este microorganismo en neumonías bacteriémicas suele ser baja, los cultivos microbiológicos siguen siendo importantes para la vigilancia epidemiológica y el estudio de las resistencias.

En cuanto al empiema, hay que decir que es una de las complicaciones más comunes de la neumonía y en la mayoría de los casos el neumococo suele ser el agente responsable. Varios trabajos publicados muestran un aumento de casos a partir de la mitad de los 90 (135-137). En Chile, el estudio de Levine *et al.* muestra un 25% de casos de empiema en niños hospitalizados con neumonía (138).

En el presente estudio, de los 26 casos con un empiema (10 adultos y 16 niños), hubo 16 en los que el neumococo se aisló en sangre y 10 en líquido pleural. De estos 10 casos, 9 eran niños. Este hecho podría tener que ver en gran parte con las prácticas o protocolos que se siguen tanto en adultos y como en niños. En adultos, sólo en uno de

los 10 casos de empiema que teníamos se aisló el neumococo en el líquido pleural, aunque en 4 de estos de 10 casos no se realizó el cultivo de líquido pleural. Por lo tanto, obtuvimos una rentabilidad diagnóstica del 45% en el líquido pleural y de 61% en el hemocultivo.

Para una mejor estimación de los casos de empiema en la ENI se están utilizando técnicas moleculares sobre muestra directa. En un estudio realizado por Obando *et al.* (139), de 100 empiemas diagnosticados, recuperan 25 neumococos por cultivo. El 89% de los líquidos pleurales con cultivo negativo mostraron un resultado positivo para neumococo por PCR.

En los niños con empiema de nuestro estudio, la edad media no se ajustó a la que suele hallarse en otros estudios. En nuestro caso la media de edad de los 16 niños fue de 2 años, ya que hubo 9 niños menores de 1 año. Sin embargo, la media de edad de los niños con empiema está alrededor de los 6 años (135,136).

Se ha visto que en muchos casos el empiema se da en niños con coinfecciones con VRS, influenza o varicela. Talbot *et al.* (140) muestran una correlación directa entre los episodios de ENI y los aislamientos de VRS e influenza. La incidencia de la ENI aumenta cuando están circulando estos virus. Observamos que los casos ENI en nuestro medio son más frecuentes en los meses de invierno y menos frecuentes en verano. Sin embargo, los empiemas no se ajustaron a este patrón temporal.

La cápsula de neumococo es probablemente uno de los principales determinantes de su poder patógeno. Esta cápsula es muy variable antigénicamente, habiéndose descrito 92 tipos de polisacáridos capsulares serológicamente diferenciables. El sistema más utilizado para el nombramiento de estos serotipos ha sido la nomenclatura danesa. El método para identificar el serotipo de cada aislamiento consiste en antisueros capaces de reconocer las diferencias químicas entre aislamientos (Quellung). Como ya se ha comentado en la introducción, también existen diferentes reactivos comerciales para test rápidos de identificación, basados en la detección visible del complejo antígeno-anticuerpo por aglutinación.

El serotipado convencional tiene ciertos inconvenientes como son el coste de antisueros, la subjetividad en la interpretación del resultado y la necesidad de personal altamente entrenado en esta técnica. Por ello, con el objetivo de facilitar el serotipado y los estudios de monitorización y epidemiología de los serotipos, se han desarrollado nuevos métodos basados en la PCR. En 2003, Brito *et al.* (141) describen una PCR múltiple, rápida, simple y económica para serotipar. El 94% de los aislamientos tipados coincide con el serotipado convencional. En 2006, el CDC propone un sistema de serotipado fácil y fiable que consiste en un esquema de 7 PCRs múltiples secuenciales en el que el orden de las reacciones se basa en los resultados obtenidos en el programa de vigilancia realizado entre 2002-2003 (25). Los cebadores corresponden a la parte específica de cada serotipo del locus *cps*. Además, en todas las reacciones se añade el cebador *cpsA* como control interno, ya que es común a todos los serotipos. No hay evidencias que sugieran que la variabilidad genética entre diferentes cepas del mismo serotipo pueda afectar al serotipado por PCR (25,142). No obstante, algunos cebadores utilizados no son del todo específicos, como en el caso del serogrupo 6 y 18. Además existen reacciones cruzadas entre algunos serotipos del esquema (7F, 7C, 9V, 38, 11A, 12F, 22F, 33F y 35F) y otros serotipos minoritarios, que no podemos distinguir mediante esta PCR, por lo tanto habría que utilizar los antisueros. La frecuencia con la que estas cepas responsables de la reacción cruzada causan ENI grave en Estados Unidos es baja (25). Entre nuestros aislamientos tipados convencionalmente no se halló ninguna.

Por lo tanto estaríamos ante una técnica simple y económica que podría suponer una buena alternativa al serotipado convencional. Una de las ventajas de este esquema es su flexibilidad para adaptarla a la prevalencia de cada región. Otros autores lo han hecho modificando el orden y la combinación de serotipos de las reacciones (26,27). Dias *et al.* (27) reformulan el esquema basándose en estudios de vigilancia previos e identificar así los serotipos más frecuentes en Latino América. El esquema que proponen para su población consta de 6 reacciones de PCR, con 5 serotipos en cada una de ellas, incluyendo en total 30 serotipos/serogrupos. Al igual que nosotros, adelantan el serotipo 1 y el 7F a las primeras reacciones e incluyen el serotipo 5 en las segunda. Con este esquema tipan el 90,1% de las cepas con las tres primeras reacciones. Morais *et al.* (26) realizan el estudio con aislamientos clínicos de África Subsahariana. Su esquema se compone de 7 reacciones múltiples secuenciales, con 4 pares de cebadores cada uno,

excepto la sexta reacción, que contiene 5 pares de cebadores. En este nuevo esquema también fueron adelantados el serotipo 1, 7F y el 5 alcanzando a tipar con las dos primeras reacciones el 82% de las cepas.

Del mismo modo, nosotros modificamos el esquema adaptándolo a los serotipos más prevalentes en Sevilla, siendo la primera vez que se adaptaba para aislamientos clínicos en Europa (143). En 2008, Azzari *et al.* (144) publicaron un estudio realizado en Florencia, en el cual aplicaron el esquema de serotipado sobre muestras invasivas que previamente fueron positivas por RT-PCR. En este caso, se utilizaron 31 pares de cebadores en 9 reacciones múltiples. En 2011 se ha publicado un trabajo realizado en Bélgica, en el que adaptan el esquema a 30 serogrupos/serotipos habituales en portadores (145).

Nuestras modificaciones nos permitieron tipar, respecto al esquema original de los CDC, un 9% más en adultos y un 15% más en niños con las 3 primeras reacciones y un 17% más en adultos y un 18% más en niños con las 5 primeras reacciones. El serotipo 20 y el 7C fueron incluidos en la séptima reacción del esquema, aunque no obtuvimos ninguna cepa de estos serotipos. Del mismo modo, no tuvimos ninguna cepa del serotipo 10 y lo sacamos del esquema debido a la incompatibilidad del tamaño del fragmento amplificado.

La PCR múltiple secuencial se adaptó satisfactoriamente tanto a los aislamientos invasivos pediátricos como a los adultos y pudimos tipar el 95% de los aislamientos. Así, este sistema resultó muy útil a la hora de optimizar la detección de los serotipos predominantes utilizando el mínimo número de reacciones, teniendo en cuenta la importancia actual de la vigilancia y del serotipado para la introducción y formulación de nuevas vacunas conjugadas. Además, su flexibilidad nos permitiría realizar nuevas modificaciones en función de los cambios epidemiológicos de los serotipos, como por ejemplo, el fenómeno de reemplazo que ha habido tras la introducción de la vacuna heptavalente.

El esquema de PCRs utilizado en este trabajo lo hemos aplicado a cepas de neumococo aisladas en el laboratorio, pero actualmente existen técnicas de PCR a tiempo real que se pueden utilizar en muestra directa (146) y de esta forma, obtenemos un diagnóstico y datos epidemiológicos cuando el cultivo es negativo.

Por otro lado, obtuvimos 23 cepas del serogrupo 6. Para poder diferenciar los serotipos 6A y 6B, realizamos primero una secuenciación con la cual obtuvimos 10 aislamientos del serotipo 6A y 12 del 6B. Recientemente se han descrito 2 nuevos serotipos dentro del serogrupo 6, el 6C y el 6D. Ambos son consecuencia de recombinaciones homólogas en el locus capsular de los serotipo 6A y 6B, respectivamente (13,147). Tras la introducción de la vacuna heptavalente, que contiene el serotipo 6B, se pensó que indirectamente ejercería una protección cruzada frente al serotipo 6A. Sin embargo, se detectó un aumento de este serotipo. Actualmente se cree que este aumento fue realmente debido al serotipo 6C, que previamente se identificaba como 6A y que estructuralmente difiere más del serotipo 6B. Por ello, la protección cruzada de la vacuna heptavalente frente al serotipo 6C pudo ser inadecuada (13). Tras la secuenciación, realizamos una PCR propuesta por Jin *et al.* en 2009 (112) para identificar las cepas del serotipo 6A, 6B y 6C. Tres de los 10 aislamientos que previamente identificamos como del serotipo 6A, eran del serotipo 6C.

Recientemente han publicado un estudio en el que caracterizan los aislamientos invasivos del serogrupo 6 en adultos, en Barcelona (148). Entre 1994 y 2008 detectan 1480 episodios de ENI. De éstos, 91 son debidos a cepas del serogrupo 6. Los serotipan mediante la reacción de Quellung y una PCR múltiple para distinguir entre el serotipo 6C y el 6D. Del total de los episodios invasivos, el 3,2% fue debido al serotipo 6B; el 1,9%, al 6A y el 1,1%, al 6C. No obtuvieron ningún aislamiento del serotipo 6D. En nuestro estudio la distribución total fue la siguiente: 6B (4,8%), 6A (2,5%) y 6C (1,1%). Si tenemos en cuenta sólo las cepas de los adultos, el 1,2% (2/159) fue debido al 6B, el 1,8% (3/159) al 6A y el 0,6% (1/159) al 6C. No obstante, el porcentaje de episodios debidos al serotipo 6B y 6C que obtuvieron durante el periodo 2004-2008 fue del 1,3% y del 1,6%, respectivamente. El del 6A se mantuvo. Los resultados de este último periodo son más parecidos a nuestros resultados. En su estudio observan una clara disminución del serotipo 6B entre el periodo 1994-1998 (prevacunal) y el periodo de 2004-2008 (postvacunal). Aunque nosotros no dispongamos de los datos del periodo prevacunal, si nos fijamos en el gráfico de la distribución interanual del serotipo 6B (figura 21), podemos observar una tendencia a la baja entre 2002 y 2008. De los 12 aislamientos del serotipo 6B, 10 pertenecían a niños, de los cuales 7 eran menores de un año. Podemos decir que observamos una relación del serotipo 6B con casos de

meningitis, población pediátrica y resistencia a penicilina y eritromicina. En el estudio de Rolo *et al.* en Barcelona (148) observaron entre las cepas del serotipo 6B un 97,9% y un 100% de cepas no sensibles a penicilina y eritromicina, respectivamente. Sin embargo, para el serotipo 6A, la resistencia a penicilina y a eritromicina fue del 14,3% y del 50%, respectivamente. El serotipo 6A en nuestro caso también (148) fue menos resistente que el 6B.

Al igual que en otros estudios (148,149), la prevalencia del serotipo 6C es baja. En nuestro estudio obtuvimos 3 aislamientos, de cuales 2, que pertenecían al mismo clon, fueron aislados en el LCR de dos niños con meningitis. En otros trabajos también se ha relacionado con episodios de meningitis (149,150). Los 3 aislamientos fueron sensibles a penicilina, tal y como se publicó en Sudáfrica, pero al contrario que en Brasil (149) o en Barcelona (148).

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la vacuna neumocócica conjugada consiste en polisacáridos capsulares del neumococo, pero técnica y económicamente no sería factible desarrollar una vacuna con los 92 polisacáridos descritos hasta ahora. Por ello, ha sido muy importante decidir qué serotipos son los más adecuados para incluirlos en la vacuna. Para decidir esto, hay que tener en cuenta la complejidad epidemiológica de la bacteria, la capacidad colonizadora, la transmisión, la invasividad... Los serotipos difieren en función de la persona a la que afectan (neonatos, niños, adultos, ancianos, inmunodeprimidos), del cuadro clínico, las resistencias antimicrobianas, de la distribución geográfica y el modo de actuar (en epidemias o endémicamente) (151).

Encontramos serotipos que siendo muy infrecuentes en portadores, son causantes de un gran número de infecciones invasivas. Esto sugiere que algunos serotipos poseen un gran potencial de invasividad, pero no está claro cómo se mantienen en la comunidad si son muy raros en portadores. Una posibilidad sería la transmisión directa entre individuos, mediante la tos de la persona con neumonía. No obstante, las infecciones por serotipos altamente invasivos se dan esporádicamente y no suele ser fácil localizar al foco primario de infección (152). Sobre la capacidad invasiva de los diferentes serotipos y genotipos existen diversos estudios.

Si analizamos los serotipos hallados entre nuestros pacientes observamos que en función del cuadro clínico existen serotipos predominantes. Tanto en las neumonías como en concreto en los empiemas, los serotipos 1 y el 14 son los más frecuentes.

Algunos serotipos se asocian frecuentemente con ciertas presentaciones clínicas. Así, los serogrupos 6, 10 y 23 suelen aislarse más frecuentemente de LCR que de sangre, y viceversa para los serotipos 1, 4 y 14 (151). El serotipo más común detectado en los casos de empiema suele ser el serotipo 1, tanto antes como después de la introducción de la vacuna conjugada heptavalente (135,136). Además suelen ser sensibles a penicilina y demás antibióticos (136,151). Nuestras cepas del serotipo 1 causantes de empiema también fueron sensibles a penicilina.

El serotipo 6B fue el predominante en nuestros casos de meningitis, coincidiendo con lo publicado previamente (153). En el caso de las bacteriemias sin foco, el serotipo más frecuente fue el 19A, uno de los serotipos cuya incidencia más ha aumentado tras la introducción de la vacuna heptavalente y responsable principal del efecto de reemplazo (154).

La vacuna que estaba disponible antes de la PCV7, estaba compuesta por 23 polisacáridos capsulares de los serotipos más comunes en adultos en Estados Unidos y Europa. Esta vacuna había mostrado ser clínicamente efectiva frente a la enfermedad neumocócica bacteriémica en adultos, pero con un alto coste-beneficio si se hacía una inmunización general a toda la población mayor. Además, no era lo suficientemente inmunogénica en bebés y niños pequeños, ni había certeza de su eficacia frente a la OMA en niños o la neumonía no-bacteriémica en adultos (155). Por ello, se desarrolló la vacuna conjugada, que por su complejidad, engloba menos serotipos y requiere estudios más profundos para la selección específica de éstos.

Para determinar la formulación más efectiva de una vacuna multivalente hacen falta datos sobre los serotipos responsables de la enfermedad en diferentes localizaciones geográficas y poblaciones.

La vacuna PCV7, autorizada por la FDA en febrero de 2000 en Estados Unidos, se demostró en estudios previos a su autorización que era segura y eficaz frente a la ENI, moderadamente eficaz frente a la neumonía y algo efectiva en reducir la OMA

(156). La vacuna incluye 7 serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) conjugados con una variante no toxigénica de la toxina diftérica, CRM₁₉₇ (cross-reactive material). Esta vacuna produce además una protección cruzada frente al serotipo 6A (152).

El porcentaje de estos 7 serotipos en niños, varía mucho de una región o de un país a otro. En la mayoría de los lugares donde existen datos, los serotipos vacunales suponen el 50% de los aislamientos. En Europa occidental, al menos dos tercios de los aislamientos están cubiertos por la vacuna heptavalente. En Estados Unidos, Canadá, Australia, Nueva Zelanda, Japón y Corea de Sur, la PCV7 cubre el 80% de los aislamientos (152).

Si observamos la cobertura de la vacuna heptavalente en el total de los aislamientos recogidos para nuestro estudio, tanto en adultos como en niños, vemos que ésta sería del 25%. Si tenemos en cuenta los niños menores de 15, la cobertura alcanza el 33% y en niños menores de 6 años asciende al 35%. El número de nuestras cepas vacunales es algo más bajo de lo que se estimaba en Europa Occidental, pero esto se debe a que los datos anteriores procedían de estudios previos a la vacuna. Sería lógico pensar que en nuestro periodo de estudio los serotipos vacunales hubieran descendido tras la introducción de la vacuna.

En la vacuna conjugada decavalente, cada serotipo está conjugado con la proteína D, una proteína de la membrana externa de *H. influenzae*. Ésta vacuna incluye los serotipos 1, 5, y 7F además de los 7 serotipos de la vacuna anterior. La cobertura de aislamientos invasivos en niños menores de 5 años de esta vacuna es de al menos dos tercios en la mayoría de países estudiados y de más del 80% Europa Occidental y parte de América del Sur (152).

Los datos obtenidos en nuestro trabajo nos muestran que la cobertura de la vacuna decavalente en nuestros aislamientos es de un 51% para el total de los pacientes, de un 62% tanto para niños menores de 15 años, como para menores de 6 años.

En febrero de 2010, la FDA aprueba la vacuna conjugada 13-valente, tras una serie de estudios (156) que demuestran que su seguridad y su eficacia en la estimulación de producción de anticuerpos protectores frente a la ENI, son comparables a la PCV7.

La PCV13 se aprueba para niños de entre 6 semanas y 71 meses. Además de los 7 serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) de la vacuna heptavalente, incluye los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F y 19A conjugados con CRM₁₉₇. Esta vacuna está también indicada para la prevención de la OMA causada por los serotipos de la PCV7 (156).

Según la revisión realizada por Hausdorff *et al.* (152), la cobertura de la PCV13 en niños menores de 5 años es de más de 80% en la mayoría de las regiones, exceptuando los Países del Este y Asia del Sur.

Los serotipos incluidos en la vacuna suponen el 67% de los aislamientos totales en nuestro estudio. En el caso de los aislamientos pediátricos la cobertura alcanzó el 77% de los aislamientos de niños menores de 15 años y el 80% de los menores de 6 años.

En comparación con los estudios realizados en niños, existen pocos trabajos acerca de los serotipos responsables de ENI en adultos o la epidemiología de los serotipos en adultos.

Un trabajo realizado en Cataluña en 2009 (126), muestra la distribución de serotipos en ENI en adultos y niños. Estudian el serotipo de 609 casos de ENI, de los cuales 12,2% estaban incluidos en la vacuna heptavalente, 51% en la decavalente y 71,7% en la tridecavalente. El porcentaje que obtienen de los serotipos de la vacuna heptavalente es la mitad que el nuestro, para la PCV10 es igual y para la PCV13 es similar. Además, los serotipos incluidos en la PCV7 que obtienen son más frecuentes en adultos (>17 años) que en niños (14,3% vs 7,4%). Los serotipos de las otras dos formulaciones, al igual que en nuestro caso, son más frecuentes en niños que en adultos. El bajo número de los 7 serotipos vacunales que obtienen, especialmente entre los niños, lo atribuyen a la efectividad de la vacuna. De hecho, tienen unas tasas de vacunación del 60% y del 77,7% entre niños menores de 2 años y de 2-4 años, respectivamente. Según los estudios realizados por distintas Comunidades Autónomas, en 2006, el Grupo de Registro de Vacunas del Ministerio de Sanidad estimó que la cobertura de vacunación infantil a nivel nacional debía de ser inferior al 50% en menores de 2 años (157).

En caso de los niños mayores y adultos, un análisis realizado antes de introducir la PCV7 por Hausdorff *et al.* (155), muestra que no hay serogrupos concretos que estén muy extendidos o que sean extremadamente comunes en todas las regiones. Por ejemplo, el serotipo 14, que se situaba entre los 3 primeros fuera de Asia, era el séptimo más común en Asia. La vacuna heptavalente contenía 6 de los serogrupos más comunes en Estados Unidos y Canadá y 5 de los 7 más comunes en Oceanía y Europa, pero sólo 3 de los 7 serogrupos más comunes en África y Asia. La cobertura de la PCV7 se estimó en 30-60% de la ENI (155). No obstante, entre los adultos, los serotipos responsables de ENI también varían con la edad, siendo mayor la cobertura de la PCV7 entre los mayores de 50-60 años. Esto puede ser debido a que el sistema inmune se debilita a partir de esa edad, que adquieran los serotipos pediátricos por un estrecho contacto con los niños o por la presión selectiva del excesivo uso de antibióticos (158).

Otro factor a tener en cuenta en la formulación de vacunas, es la resistencia a antibióticos de los diferentes serotipos y su epidemiología. La mayoría de los serotipos de los considerados más resistentes (6B, 6A, 9V, 15A, 14, 19A, 19F y 23F) (151,159) están cubiertos por las tres vacunas, excepto el 19A, que solamente lo cubre la PCV13.

Los serotipos más frecuentes entre los aislamientos resistentes a penicilina y eritromicina de nuestro estudio fueron, coincidiendo con lo publicado anteriormente, el 6B, el 14, el 19F y el 19A. Los serotipos más comunes hallados entre los aislamientos no-sensibles a penicilina en portadores del estudio de Sandgren *et al.* (30) fueron el 19F, 35B, 14 y 6B. Muñoz-Almagro *et al.* (126) obtienen en 2009 un 18,7% de aislamientos no-sensibles a penicilina y un 18,3% a eritromicina. En nuestro periodo de estudio los aislamientos no-sensibles a penicilina y eritromicina alcanzaron un 9% y un 22%, respectivamente. En 2010, Liñares *et al.* (159) publican una revisión de las resistencias antimicrobianas de *Streptococcus pneumoniae* durante un periodo de 30 años. Los estudios de vigilancia globales mostraron un aumento de neumococos no-sensibles a β -lactámicos durante los 90 y 2000. La tasa más alta de cepas no-sensibles a penicilina en el sur de Europa entre 2001-2004, la tenían Francia, Grecia y España (éste último, 29% intermedios y 13% resistentes). Sin embargo, en 2008, el sistema de vigilancia Europeo resalta un descenso significativo de aislamientos no-sensibles a penicilina en España. Según el Laboratorio de Referencia Español entre 2000-2008 hubo un descenso significativo (34% vs 22%), especialmente entre 2005-2008, coincidiendo con la

introducción de la vacuna (158). La resistencia a macrólidos en España también aumentó durante los 90 y disminuyó tras la introducción de la PCV7 (42% en 2003 vs 21% en 2006) (159). El porcentaje de cepas resistentes a eritromicina obtenido en nuestro estudio se ajusta a lo publicado previamente, sin embargo, nuestra tasa de resistencia a penicilina es considerablemente menor.

El efecto que ha tenido la vacuna conjugada en la epidemiología de los serotipos y el efecto que seguirá ejerciendo ha sido un tema muy debatido y estudiado. Por un lado ha habido una disminución en la incidencia de la ENI debida a los 7 serotipos vacunales tras la introducción de la PCV7, tanto en niños vacunados como en el resto de grupos de edades. Esto se debe al llamado “efecto rebaño” que se basa en la interrupción de la transmisión de la bacteria como resultado de la disminución de niños portadores. Por otro lado, tenemos el efecto de reemplazo, en el que tras la implementación de la vacuna han aumentado los casos de ENI por serotipos no vacunales. Entre los serotipos no vacunales responsables del efecto de reemplazo, el más relevante ha sido el 19A. Respecto a si ha sido la vacuna o el uso excesivo de antibióticos el responsable del aumento de casos por cepas 19A resistentes, ha habido cierta controversia. En España la incidencia del serotipo 19A ha aumentado considerablemente tras introducción de la vacuna (154). Según el estudio de Fenoll *et al.* (154), no se puede asegurar que este hecho sea debido a la presión vacunal, ya que en países como Corea o Israel, donde no se introdujo la vacuna, también observaron un aumento del serotipo 19A.

Si el número total de casos ha aumentado o disminuido, depende también de la región y el estudio, y lo mismo ocurre con los neumococos resistentes. Según el programa de vigilancia realizado en 2003 por el CDC, el número de casos se redujo considerablemente en todos los grupos de edad tras la introducción de la vacuna (160).

Calbo *et al.* (137) observaron una clara sustitución de serotipos vacunales por serotipos no vacunales entre los casos de ENI estudiados entre un periodo prevacunal y postvacunal. Sin embargo, la tasa de ENI en Barcelona no sufrió una disminución importante tras la introducción de la vacuna. Esto podría deberse al bajo índice de vacunación que tenían (4,8% en 2002 y 34% en 2004).

Ardanuy *et al.* analizan entre 1997-2007, la ENI en adultos en el sur de Barcelona, estudiando la diferencia entre 3 subperiodos dentro de éste (161). Dependiendo de la edad, observan diferentes tendencias en la ENI. Por un lado, en el último periodo (2005-2007) obtienen un aumento en la incidencia de la ENI, debido a la expansión clonal de serotipos no-vacunales. Por otro lado, la disminución de la ENI debida a los 7 serotipos vacunales en personas mayores de 65 años, muestra el efecto rebaño de la vacuna.

En 2007 Obando *et al.* (139) publican un trabajo sobre la ENI pediátrica en el sur de España tras la introducción de la vacuna conjugada. Aquí volvemos a encontrarnos con un bajo índice de vacunación (se había vacunado el 29% de los 515 niños menores de 5 años incluidos en el estudio en el año 2005), un aumento en la proporción de ENI causada por serotipos no vacunales, pero sin cambios en el número total de casos. Concluyen que puede que sea pronto para esperar un cambio en la incidencia de la ENI en niños.

Respecto a la evolución o la tendencia que ha tenido cada serotipo durante los últimos años teniendo en cuenta los factores y medidas externas como la vacuna o terapia antibiótica, hay que decir que ni el número de aislamientos ni el periodo de estudio de nuestro trabajo es lo suficientemente amplio como para poder sacar conclusiones contundentes. Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos por el estudio de Fenoll *et al.* (154) sobre los patrones temporales de cada serotipo entre 1997 y 2007, observamos cierta coincidencia en algunos serotipos. De este modo, vemos que los serotipos vacunales 14, Sg18, 6B, 19F y 23F disminuyen a partir de 2001, coincidiendo con los resultados del trabajo de Fenoll *et al.* Sin embargo, con el serotipo 4 y el 9V, que en su caso siguen la misma tendencia que el resto de los serotipos vacunales, en nuestro trabajo se aprecia un aumento de ambos serotipos en los últimos años del periodo de estudio. Por otro lado, en los serotipos que se introdujeron en las nuevas formulaciones vacunales y que en la mayoría de los trabajos muestran un aumento, observamos diferentes comportamientos. En el caso del serotipo 7F, se aprecia un aumento entre los años 2002-2008. En los serotipos 3, 6A y 19A se observa un aumento hasta 2007 y una disminución en 2008. El aumento de los serotipos 19A y

6A se ha relacionado con la falta de inmunidad cruzada con los serotipos incluidos en la vacuna (157).

Los serotipos 1, 2, 3 y 5, se han relacionado con epidemias (24). Durante la epidemia, la transmisión se ve facilitada por el hacinamiento y factores socio-económicos, pero disminuye en cuanto desaparecen estos factores predisponentes (152). Los serotipos 1 y 5 pueden aparecer como ondas periódicas. Actualmente, las epidemias neumocócicas son raras, principalmente por la mejora de las condiciones socio-económicas y la disponibilidad de antimicrobianos. Los brotes que se dan en adultos suelen estar causados mayoritariamente por el serotipo 1 y se dan en prisiones, refugios para indigentes o agrupaciones militares (151).

La evolución del serotipo 1 en el periodo de estudio de nuestro trabajo durante el periodo de estudio muestra un pico en el año 2003 y luego se mantiene más o menos constante durante 2004-2008. Los 4 casos del año 2003 pertenecían al mismo clon y tenían el mismo patrón electroforético (A4). No obstante, hubo otros 20 aislamientos del mismo clon repartidos entre 2004-2008. El serotipo 5, prácticamente está ausente durante 2002-2006 y alcanza un pico del 16% de los casos de ENI en 2007. En este caso todos los aislamientos del serotipo 5 pertenecían al mismo clon.

En cuanto a si es el serotipo o el genotipo el que define la invasividad, no está del todo claro. Brueggemann *et al.* (31) utilizan el MLST para comparar aislamientos invasivos en niños, con aislamientos nasofaríngeos en niños portadores de la misma comunidad y mismo periodo. No existen muchos trabajos sobre los serotipos o clones que causan ENI y los serotipos o clones que en ese mismo periodo se encuentren en portadores. En este trabajo miden el potencial de ENI de los serotipos y clones, calculando una “odds ratio” (OR) para cada uno en función del número de cepas que hallen de cada serotipo o clon entre muestras invasivas y portadores. Tanto en éste como en otro estudio (30) se estimó que los serogrupos 1, 2, 7, 9, 14 y 16 eran los más invasivos y el 3, 6, 15, 19 y 23 los menos. Los serotipos 4, 18C y el 19A también se relacionaron con ENI. Hallaron dos clones del serotipo 14 causantes de ENI más frecuentemente de lo que se esperaba por su prevalencia como portadores. Por otro lado el mayor clon del serotipo 3, que se encontraba comúnmente como portador, raramente aparecía en infecciones invasivas. No encontraron ningún clon mayoritario que nunca

apareciera en los aislamientos invasivos. Aunque los serotipos más comunes entre los invasivos fueran los de la vacuna heptavalente, también hubo diferencias en las OR entre ellos ($14 > 6B$). Observaron que el serotipo y el genotipo estaban bastante relacionados, es decir, que los clones más invasivos correspondían a los serotipos más invasivos. Sin embargo concluyen que el serotipo es más importante que el genotipo en la invasividad, ya que obtienen casos de genotipos diferentes del mismo serotipo que poseen altas OR y casos de un mismo genotipo con diferentes serotipos en los cuales uno de los serotipos se halla en aislamientos invasivos y el otro en portadores.

En el presente trabajo no se han estudiado los aislamientos y serotipos en portadores y por tanto no podemos calcular la invasividad de nuestros serotipos y clones. Sin embargo, podemos comparar los serotipos y la clonalidad hallada en nuestros aislamientos invasivos con los hallados en otros estudios (30,31). Así, podemos ver que la mayoría de los aislamientos que en nuestro estudio tenían alguna relación clonal, también coincidían en el serotipo, es decir, que el serotipo y el genotipo estaban relacionados. Entre nuestros serotipos invasivos, hallamos tanto los serogrupos que según el trabajo de Brueggemann *et al.* tenían mayor invasividad, como los considerados menos invasivos (3 y 6), aunque los más prevalentes entre nuestras cepas coinciden con los más invasivos de su estudio (1, 14, 7F y 19A).

En otro trabajo realizado por Sandgren *et al.* (30) en Estocolmo, comparan la epidemiología molecular del neumococo en ENI y en portadores mediante serotipado y genotipado (ECP y MLST). En este caso concluyen que tanto el tipo clonal como el serotipo son importantes en la invasividad. Hallaron diferentes clones del mismo serotipo con diferente invasividad y aislamientos que pertenecían al mismo clon pero tenían diferente serotipo debido al “switching capsular”, con la misma invasividad.

Si realmente la invasividad dependiera únicamente de la expresión capsular, el hecho de repoblar los nichos nasofaríngeos con serotipos de baja invasividad utilizando vacunas multivalentes supondría una reducción de la tasa de ENI.

En cuanto a los efectos de la vacuna, otro fenómeno que está siendo objeto de estudio, es el “switching capsular” (CS), que se da por recombinación en el locus *cps*. Los genes de biosíntesis capsular (*cps*) se encuentran agrupados en el cromosoma del

neumococo. En todos los serotipos, los genes *cps* se encuentran en la misma posición en el cromosoma, entre *dexB* y *aliA*. El locus *cps* tiene una estructura tipo cassette, con genes que no son homólogos entre distintos serotipos y que son responsables de las diferencias químicas. Éstos, están flanqueados por genes comunes a todos (162). La estructura de cassette, permitiría cambiar de serotipo mediante recombinación de los genes no-homólogos (serotipo-específicos) mediada por los genes homólogos. Debido a la recombinación de genes capsulares, neumococos de un mismo tipo clonal pueden tener serotipos diferentes, es decir, pueden adquirir mediante transformación los genes que codifican una cápsula diferente de la suya. Actualmente se ha demostrado en diferentes partes del mundo el intercambio de cápsulas entre el serotipo 23F y el 19F, así como entre el serotipo 9V y 14.

Para predecir el impacto de los programas vacunales, es importante conocer los tipos clonales y la extensión del CS, ya que estos programas podrían ejercer una presión selectiva sobre genotipos virulentos o invasivos hacia un “switching” y escapar de la cobertura vacunal (163,164). Incluso cepas resistentes pueden modificar su serotipo por serotipos no incluidos en la vacuna y aumentar potencialmente su virulencia (171). Adquirir una cápsula no-vacunal por una cepa con capacidad invasiva, supone un problema en cuanto al uso de vacunas específicas de serotipo. Según Brueggemann *et al.* (172), al principio, la PCV7 redujo la ENI debida a serotipos resistentes, pero luego, la resistencia antimicrobiana aumentó con el aumento del 19A. El programa de vigilancia ABC del CDC, estudió en 2005 los serotipos 19A mediante MLST, revelando que la evasión de la vacuna empezó en 2003. Estas cepas tenían el genotipo MLST ST695, que siempre había estado asociado al serotipo 4 y ahora se encontraba también asociado al 19A. Estas cepas se detectaron 3 años después de la introducción de la vacuna heptavalente, pero aumentaron su prevalencia rápidamente (en 2003, 1 cepa; en 2004, 2 cepas; en 2005, 32 cepas) (166). En 2005 emergieron otros dos tipos de cepas 19A de evasión vacunal, con nuevos procesos de recombinación y procedentes de cepas del serotipo 4. La evasión vacunal mediante recombinación del locus capsular podría reducir la efectividad de cualquier vacuna basada en serotipos, por ello es importante mantener la vigilancia y conocer los procesos genéticos de evasión.

El estudio de clonalidad de nuestros aislamientos mediante ECP, mostró, como se ha podido ver en los resultados, que en algunos serotipos había muy poca

variabilidad, con la mayoría de las cepas perteneciendo a un clon o clones muy relacionados. En total 10 serotipos mostraron relación clonal, el serotipo 1, 3, 5, 7F, 12F, 19A, 22F, 33F, 6A, 14 y 9V. En el trabajo de Sandgren *et al.* nombrado anteriormente (30), donde estudian la influencia de los serotipos y la clonalidad en la invasividad, observaron que los aislamientos invasivos formaban dos grupos principales: uno hallado entre los casos de ENI (serotipos 1, 4, 7F y 9V) y que estaban relacionados clonalmente y otro grupo que era común tanto en casos de ENI como en portadores y que eran más variables genéticamente (serotipos 6A, 6B, 14 y 19F). Entre nuestras cepas, observamos que los serotipos 1 y 7F estaban muy relacionados clonalmente, que los serotipos 9V, 6A y 14 mostraban mayor variabilidad y que los serotipos 4, 6B y 19F apenas tenían relación clonal.

El serotipo que menos variabilidad mostró fue el serotipo 5, con los 16 aislamientos del mismo clon. Como ya se ha comentado anteriormente, el serotipo 5 suele aparecer en ondas periódicas y en nuestro caso la mayoría de los aislamientos se dieron entre 2007 y 2008.

Para los serotipos 1, 3 y 7F, la diversidad también fue muy pequeña, estando englobados en clones el 84%, 92% y el 83% de los aislamientos respectivamente. En el caso del serotipo 33F, el 100% de las cepas pertenecían a un mismo clon, aunque sólo obtuvimos 4 aislamientos con este serotipo. Estos resultados concuerdan con los resultados de Sandgren *et al.* (30).

Otro ejemplo de recombinación capsular es el que estudiaron Coffey *et al.* (162) entre el 23F y los serotipos 19A y 19F. Se habían descrito en España cepas del serotipo 19A y 19F genotípicamente muy relacionadas y con el mismo patrón de resistencia que cepas multirresistentes del serotipo 23F, comunes en España durante 20 años. Se cree que la dirección del intercambio fue de 23F al 19F, porque el primero fue común en España antes que el segundo, aunque no se puede excluir la otra opción, que el intercambio fuera del 19F al 23F. En un principio, pensaban que la variante 19F del clon 23F, sufrió una recombinación y luego se expandió clonalmente en España, pero parece que hay diferentes variantes del 19F, con diferencias en la secuencia de los genes *cps* importados, que demuestran recombinaciones independientes. Coffey *et al.* también describieron en otro trabajo (167) la relación entre un clon resistente a penicilina del

serotipo 14 y el clon MPSp9V. En el caso de los aislamientos del serotipo 9V de nuestro estudio, observamos que había relación clonal con otro serotipo diferente. De los 7 aislamientos del serotipo 9V obtenidos, 5 compartían clonalidad con aislamientos del serotipo 14. Esto podría deberse al “switching capsular” previamente descrito entre estos dos serotipos, aunque las cepas del serotipo 14 y 9V relacionadas de nuestro estudio eran sensibles a penicilina. Además, ambos serotipos están incluidos en las vacunas. Entre los serotipos 23F y 19F no observamos ninguna relación clonal, es más, los 8 aislamientos del serotipo 19F pertenecían a diferentes pulsotipos.

Estudio de resistencias a fluorquinolonas

Aunque la resistencia antimicrobiana en *Streptococcus pneumoniae* continúe siendo un problema, la resistencia a FQ permanece baja (1-7%) (168-170). La resistencia a FQ se puede adquirir por mutaciones, recombinación intraespecífica o recombinación interespecífica de estreptococos del grupo mitis (171). Un programa de vigilancia realizado por los CDCs en 1998, reveló una tasa de resistencia a LVX de 0,2% en 3475 cepas procedentes de muestras invasivas (64). En nuestro estudio hallamos una tasa de resistencia a LVX de 0,7% entre el total de los aislamientos invasivos, pero un 1,3% en adultos. Según un estudio de vigilancia realizado en Estados Unidos entre 1998 y 2000 la prevalencia de la resistencia a LVX es mayor entre los aislamientos de las muestras respiratorias que en los de hemocultivos (172). Según la revisión de las resistencias de los últimos 30 años realizada por Liñares *et al.* (159), en España, la tasa de resistencia a ciprofloxacino se mantienen estable, con un 2,6% en 2002 y 2,3% en 2006. Los factores que podrían haber contribuido a estabilizar las resistencias en FQ son el uso moderado de FQ, el cambio de los clones circulantes tras la vacuna, la no recomendación de FQ en niños y el alto coste fisiológico que confiere la resistencia (174). En Canada, sin embargo, la resistencia a ciprofloxacino aumentó de 0,6% en 1998 a 7,3% en 2006 debido al gran consumo de FQ (174).

Como hemos podido observar en los resultados, tuvimos 10 (6,3%) aislamientos en adultos y 4 (3,5%) en niños que mostraron una CMI >16 µg/ml a NFX por Etest. Sin embargo, ninguno de los aislamientos de niños y sólo 2 (1,3%) de las cepas de adultos fueron resistentes a LVX. Los 4 aislamientos pediátricos presentaron una CMI a NFX baja dentro del rango no-sensible (24 µg/ml) y el único mecanismo de resistencia que se

halló en ellos fue la posible acción de las bombas de reflujo. Esto sugiere que probablemente los niños no han estado expuestos a FQ.

Entre las mutaciones relacionadas con resistencias que encontramos en los 14 aislamientos estudiados mediante secuenciación, están la sustitución de la serina en la posición 79 del gen *parC* y la sustitución de la serina de la posición 81 del gen *gyrA*. Las sustituciones del *parC* fueron por los aminoácidos fenilalanina (Phe) y tirosina (Tyr), aunque la primera fue más frecuente. Detectamos mutaciones solamente en el gen *parC* en 8 aislamientos (57%) y 7 de ellos fueron sensibles a LVX (resistencia de primer paso). El aislamiento con mutaciones en *parC* y *gyrA* (Ser-81) fue resistente a NFX y a LVX. Hubo un aislamiento que siendo resistente a LVX, sólo mostró una mutación relevante en *parC*. En este aislamiento encontramos polimorfismos no relacionados con la resistencia a FQ y un efecto positivo a la reserpina y por tanto a las bombas de reflujo. Este patrón tan inusual, en el cual tenemos una resistencia de alto nivel con una mutación de primer paso, requiere un estudio más profundo. En la actualidad se acepta la posibilidad de que la resistencia a FQ también pueda ser debida a mutaciones fuera de la región QRDR (174). Heather *et al.* secuencian los genes completos *gyrA*, *parC* y *parE* de 51 aislamientos resistentes a ciprofloxacino (176). Obtienen una gran variedad de mutaciones no-QRDR, pero ninguna la asocian con la resistencia a FQ. En este trabajo realizan una caracterización molecular de 205 cepas resistentes a ciprofloxacino mediante el estudio de mutaciones en la región QRDR, estudio de bombas de reflujo mediante reserpina, serotipado y patrones de ECP. Las mutaciones más comunes en su estudio también fueron la Ser79Phe (*parC*) y la Ser81Phe (*gyrA*).

Los 5 aislamientos con bajo nivel de resistencia en los que no se detectó ninguna mutación importante en las secuencias de los genes QRDR, fueron positivos en el estudio de las bombas de reflujo, es decir, en presencia de reserpina mostraron una disminución de cuatro o más diluciones en su CMI a norfloxacino.

Aunque las cepas resistentes a penicilina y macrólidos se propagan clonalmente, la relación clonal entre los aislamientos resistentes a FQ no está clara (177). En nuestro estudio no hallamos relación entre clones ni serotipos, aunque el número de aislamientos que se estudiaron fue pequeño. Sin embargo, existen estudios de vigilancia

publicados previamente donde también se observa diversidad clonal entre aislamientos resistentes a FQ (176,178).

Entre las tres parejas de aislamientos que tenían el mismo perfil de ECP, en una el serotipo fue diferente, en otra pareja uno de los aislamientos fue no-tipable y la tercera pareja eran dos cepas que pertenecían a distintos episodios de un mismo paciente en el que se desarrolló la resistencia de alto nivel. En el estudio de resistencias a FQ realizamos el genotipado mediante ECP y MLST. Con ambas técnicas obtuvimos el mismo grado de variabilidad y se identificaron 3 clones diferentes. Algunos de los ST obtenidos por MLST no habían sido publicados previamente.

Entre las cepas resistentes a LVX también se han descrito fenómenos de recombinación capsular (179,180). Las cepas resistentes a FQ halladas en Hong Kong fueron muy similares genéticamente, pero con diferente serotipo (180). Esto indujo a los autores a pensar que provenían del clon Spanish 23F, dominante en Hong Kong, del cual adquirieron la resistencia a FQ.

Cuando realizamos la prueba de las bombas de reflujo, las CMI de NFX obtenidas por microdilución sin reserpina variaron en una o dos diluciones, pero excepto en dos aislamientos pediátricos, mantuvieron la misma categoría. Estos dos aislamientos tuvieron una CMI de 24µg/ml por Etest y de 16µg/ml por microdilución. En ninguno de ellos se detectaron mutaciones relacionadas con resistencias. Según las recomendaciones de la Sociedad Francesa, por Etest, estos dos neumococos serían resistentes de bajo nivel.

La utilidad de la reserpina para el estudio de las bombas de reflujo ha sido cuestionada debido a que cepas con reflujo positivo no han mostrado acumulación en presencia de reserpina (97). Por ello los resultados de las pruebas con reserpina hay que interpretarlos con precaución.

En 10 de los 14 aislamientos resistentes a NFX el estudio de las bombas de expulsión con reserpina fue positivo. En 5 de ellos este mecanismo se dio junto con mutaciones en los genes QRDR. Los otros 5 que sólo presentaron el mecanismo de reflujo mostraron unas CMI a NFX más bajas (24 µg/ml). Los aislamientos con

mutaciones en *parC* tuvieron mayores CMI_s a NFX, independientemente de si presentaban el mecanismo de reflujo o no. En el estudio de Heaher *et al.* (176) un 21% de los aislamientos fueron susceptibles al efecto de la reserpina y la mayoría de estos eran aislamientos que no mostraron ninguna mutación en la región QRDR, aunque hay que tener en cuenta que la FQ que estudiaron para las bombas de reflujo fue la ciprofloxacino. Tal y como se ha mencionado anteriormente, la resistencia a FQ también puede ser debida a recombinaciones interespecíficas, aunque se considere bastante rara. En este trabajo Canadiense identificaron 14 aislamientos con una posible recombinación con cepas de estreptococos del grupo viridans. Estos aislamientos tenían sustituciones (Asn91Asp en *parC* y Ser114Gly en *gyrA*) previamente descritas en aislamientos que habían experimentado recombinaciones con *S. mitis* y *S. oralis* (176). Obtuvieron 5 aislamientos en los que no se detectaron sustituciones en los genes QRDR ni presuntas bombas de reflujo. En nuestro estudio no se detectaron estas mutaciones sugerentes de recombinaciones con otras especies ni tuvimos ningún aislamiento en el que no detectáramos ni mutaciones ni posibles bombas de reflujo.

Según Varon *et al.*, el método de cribado que hemos utilizado, probando sólo NFX y LVX, es la alternativa más simple para detectar resistencias de bajo nivel. Esta opción no discrimina entre el aumento del reflujo y las mutaciones en la topoisomerasa IV, pero detecta los mutantes con resistencia de bajo nivel más frecuentes (87).

Aunque el nivel de resistencia para FQ sea bajo, es importante mantener una vigilancia continua, sobre todo para prevenir casos de desarrollo de resistencia *in vivo*. En este trabajo hemos querido probar y valorar el cribado con NFX propuesto por la Sociedad Francesa de Microbiología para detectar aislamientos de bajo nivel de resistencia que podrían evolucionar a resistencias de alto nivel y suponer un fracaso terapéutico (80,181,182). En España se describió un fracaso terapéutico con consecuencias fatales en un paciente con neumonía neumocócica que desarrolló una resistencia *in vivo* a FQ (82). Nosotros detectamos un nuevo caso de desarrollo de resistencia *in vivo*, en un paciente joven con una enfermedad de base y con varios ingresos durante los 4 meses previos en los que había sido tratado con LVX. En una revisión realizada en 2005 acerca de los fracasos terapéuticos asociados a la resistencia a FQ (183), detectan 20 casos entre 1995 y 2004. Los factores de riesgo a tener en cuenta a la hora de tratar a un paciente con FQ son: el uso previo de FQ, sobre todo en

los últimos 3 meses; el estar hospitalizado y el vivir en alguna residencia de ancianos (183). Es importante saber que el fracaso terapéutico es más probable si el paciente ha estado previamente infectado con una cepa sensible *in vitro*, pero con una mutación de primer paso. Por ello, consideramos importante el implantar en los laboratorios de microbiología un método de cribado eficaz para poder detectar a tiempo estas cepas. Según algunos autores (159,173), una CMI de 4 mg/L en ciprofloxacino es el mejor marcador de cepas con mutaciones de primer paso. Con el método de cribado que hemos probado, se han detectado 12 cepas (4,4%) con resistencia de bajo nivel, de las cuales 7 tenían ya una mutación de primer paso en el gen *parC*. Éstas, bajo la presión antibiótica ejercida por tratamientos continuados con FQ podrían llegar a resistencias de alto nivel, como ocurrió con uno de los aislamientos. Por tanto, consideramos un buen método para la rutina diaria del laboratorio de Microbiología.

8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. La enfermedad neumocócica invasiva secundaria a una neumonía es más frecuente en adultos que en niños. Sin embargo, en éstos el porcentaje de empiemas y meningitis es mayor.
2. Es imprescindible para establecer el diagnóstico etiológico de la enfermedad neumocócica invasiva la realización de hemocultivos además del cultivo de una muestra del foco. El diagnóstico microbiológico en el 61,5% de los empiemas y en el 27% de las meningitis en las que no se llegó al diagnóstico mediante la muestra del foco se logró mediante el hemocultivo.
3. Las variaciones realizadas en la PCR múltiple secuencial consiguió la identificación del serotipo capsular en el 95% de los aislados tanto pediátricos como de adultos. Esta adaptación, nos permite disponer de una técnica simple, económica y que supone una buena alternativa al serotipado convencional. Adicionalmente, su flexibilidad permite adaptarla a la prevalencia de los distintos serotipos capsulares de cada región o país.
4. Los serotipos 1, 7F, 14, 19A son los más frecuentemente aislados en la ENI en los pacientes estudiados en el período de estudio. En la población adulta, los serotipos 14, 7F, 1 y 19A fueron los más frecuentes mientras que en la población pediátrica lo fueron los serotipos/serogrupo 1, 6 y 14.
5. Entre los serotipos más frecuentes obtenidos en nuestro medio se encuentran los 13 serotipos incluidos en la vacuna tridecavalente. Es más, 5 de los serotipos no incluidos en la PCV7 pero sí en la PCV13, se encuentran entre los 6 serotipos más prevalentes en nuestra área. Por lo tanto, la PCV7 y la PCV10 dejarían sin cubrir en todos los grupos etarios a serotipos muy frecuentes, entre los que se encuentra el serotipo 19A, que ha mostrado un alto índice de resistencia a penicilina y eritromicina en diferentes estudios y se considera el principal responsable del efecto de reemplazo.

6. En las neumonías bacteriémicas y en los empiemas de nuestro estudio los serotipos 1 y el 14 son los más frecuentes, mientras que en los casos de meningitis, el serotipo 6B fue el predominante y en el caso de las bacteriemias sin foco lo fue el 19A.
7. La tasa de resistencia a penicilina (9%) es considerablemente menor a lo publicado previamente aunque el porcentaje de cepas resistentes a eritromicina (22%) es similar. Los serotipos 6B y el 14 fueron los más frecuentes entre los aislamientos no-sensibles a penicilina, mientras que los serotipos 6B y el 19A se asociaron con la resistencia a eritromicina. Finalmente, hemos encontrado una asociación del serotipo 6B con casos de meningitis, población pediátrica y resistencia a penicilina y eritromicina.
8. Un total de 10 serotipos: 1, 3, 5, 7F, 12F, 19A, 22F, 33F, 6A, 14 y 9V, mostraron relación clonal. El serotipo que menos variabilidad mostró fue el serotipo 5, con el 100% de los aislamientos del mismo clon, seguido de los serotipos 1, 3 y 7F. Además, hemos observado un posible fenómeno de recombinación capsular en 6 cepas del serotipo 14 [19; 264; (13,136); (111,166)] relacionadas clonalmente con cepas del serotipo 9V [265; (88,90); (239,243); 261].
9. La tasa de resistencias a fluorquinolonas encontrada en nuestras cepas es baja (0,7%) mientras que la tasa de cepas con sensibilidad disminuida fue más alta (5,1%). Por tanto, creemos necesario mantener una constante vigilancia de los aislamientos con sensibilidad disminuida a fluorquinolonas, mediante el cribado rutinario para la detección de mutantes de primer paso por el método evaluado en este estudio.
10. Sólo se detectaron cepas con mutaciones que confieran resistencias a fluorquinolonas en las aisladas de muestras de adultos. En estas cepas se diferencian dos grupos, aquellas que presentan resistencia de bajo nivel debida a la presencia de mutaciones en el gen *parC* en la mayoría de ellas, y la de alto nivel debida a mutaciones en los genes *parC* y *gyrA*.

- 11.** Existe una excelente correlación entre el método comercial de detección de mutaciones mediante hibridación y la secuenciación de los genes QRDR. Todas las mutaciones detectadas por el primer método fueron confirmadas por secuenciación, aunque esta última técnica fue más sensible al detectar una cepa adicional con mutación en el gen *parC*, así mismo permitió detectar otras mutaciones silenciosas en estos genes aunque no codificaran resistencia.
- 12.** Entre los aislamientos pediátricos no encontramos resistencia a levofloxacino y en ninguna de las cuatro cepas con sensibilidad disminuida a norfloxacino se detectaron mutaciones en los genes *parC* y *gyrA*, posiblemente debido a la no utilización de fluorquinolonas en estos pacientes.
- 13.** Las bombas de expulsión se encuentran presentes en la mayoría de las cepas resistentes a norfloxacino, y podrían jugar un papel secundario como mecanismo de resistencia, especialmente en aquellas cepas en las que no se han detectado mutaciones asociadas a la resistencia.

9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Watson D. A., Musher D. M., Jacobson J.W., Verhoef J. A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery. *Clin Infect Dis.* 1993 Nov;17(5):913-24.
2. Gray B.M. and Musher D. M. The History of Pneumococcal Disease. In: Siber G. R., Klugman K. P. and Mäkelä P. H. eds. *Pneumococcal Vaccines: the Impact of Conjugate Vaccine.* ASM Press, Washington, D. C. 2008; 3-17.
3. Klugman KP. Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Microbiol Rev.* 1990 Apr;3(2):171-96.
4. Williams B, Gouws E, Boschi-Pinto C, Bryce J, Dye C. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *Lancet Infect Dis.* 2002 Jan;2(1):25-32.
5. Kilpi T, Herva E, Kaijalainen T, Syrjänen R, Takala AK. Bacteriology of acute otitis media in a cohort of Finnish children followed for the first two years of life. *Pediatr Infect Dis J.* 2001 Jul;20(7):654-62.
6. Douglas RM, Paton JC, Duncan SJ, Hansman DJ. Antibody response to pneumococcal vaccination in children younger than five years of age. *J Infect Dis.* 1983 Jul;148(1):131-7.
7. Sell SH, Wright PF, Vaughn WK, Thompson J, Schiffman G. Clinical studies of pneumococcal vaccines in infants. I. Reactogenicity and immunogenicity of two polyvalent polysaccharide vaccines. *Rev Infect Dis.* 1981 Mar-Apr;3 Suppl:S97-107.
8. Gudiol Munté F y Liñares Louzao J. Infecciones por *Streptococcus pneumoniae*. En: *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* Ausina Ruiz V. y Moreno Guillén S. Ed. Médica panamericana. p. 286-296.
9. Murray PR, Rosenthal KJ, FKaller. *Microbiología Médica* 6ª ed. Barcelona: Elsevier Mosby; 2009. p. 237-42.
10. Arbique JC, Poyart C, Trieu-Cuot P *et al.* Accuracy of Phenotypic and Genotypic Testing for Identification of *Streptococcus pneumoniae* and Description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. *J Clin Microbiol.* Oct. 2004;42:4686–4696.
11. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P and Woods G. Koneman, *Diagnóstico microbiológico: texto y atlas color.* Buenos Aires; Editorial Médica Panamericana; 2008, p. 656-60.
12. Skov Sørensen UB, Blom J, Birch-Andersen A, Henrichsen J. Ultrastructural localization of capsules, cell wall polysaccharide, cell wall proteins, and F antigen in pneumococci. *Infect Immun.* 1988 Aug;56(8):1890-6.

13. Park IH, Pritchard DG, Cartee R, Brandao A, Brandileone MC, and Nahm MH. Discovery of a New Capsular Serotype (6C) within Serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol. Apr. 2007;45:1225–1233.
14. Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell GL; Bennet JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. New York: Churchill Livingstone, 2005; 2392-2410.
15. Ekdahl K, Ahlinder I, Hansson HB, Melander E, Mölstad S, Söderström M, Persson K. Duration of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: experiences from the South Swedish Pneumococcal Intervention Project. Clin Infect Dis. 1997 Nov;25(5):1113-7.
16. Bogaert D, De Groot R, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. Lancet Infect Dis. 2004 Mar;4(3):144-54.
17. Gray BM, Converse GM 3rd, Dillon HC Jr. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. J Infect Dis. 1980 Dec;142(6):923-33.
18. Gray BM, Dillon HC Jr. Epidemiological studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: antibody to types 3, 6, 14, and 23 in the first two years of life. J Infect Dis. 1988 Nov;158(5):948-55.
19. Burman LA, Norrby R, Trollfors B. Invasive pneumococcal infections: incidence, predisposing factors, and prognosis. Rev Infect Dis. 1985 Mar-Apr;7(2):133-42.
20. Styrt B. Infection associated with asplenia: risks, mechanisms, and prevention. Am J Med. 1990 May;88(5N):33N-42N.
21. Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, Miller SI, Southwick FS, Caviness VS Jr, Swartz MN. Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. N Engl J Med. 1993 Jan 7;328(1):21-8.
22. Bluestone CD, Stephenson JS, Martin LM. Ten-year review of otitis media pathogens. Pediatr Infect Dis J. 1992 Aug;11(8 Suppl):S7-11.
23. Klein JO. Otitis media. Clin Infect Dis. 1994 Nov;19(5):823-33.
24. Feikin DR and Klugman KP. Historical Changes in Pneumococcal Serogroup Distribution: Implications for the Era of Pneumococcal Conjugate Vaccines. Clin Infect Dis 2002;35:547–55.
25. Pai R, Gertz RE, and Beall B. Sequential Multiplex PCR Approach for Determining Capsular Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* Isolates. J Clin Microbiol 2006;44:124–131.
26. Morais L, Carvalho MG, Roca A, Flannery B, Mandomando I, Soriano-Gabarró M, Sigauque B, Alonso P and Beall B. Sequential multiplex PCR for identifying

- pneumococcal capsular serotypes from south-Saharan African clinical isolates. *J Med Microbiol.* 2007;56:1181–1184.
27. Dias CA, Martins Teixeira L, Carvalho MG and Beall B. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. *J Med Microbiol.* 2007;56:1185–1188.
28. Fenoll A, Jado I, Vicioso D, Pérez A, Casal J. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* Serotypes and Antibiotic Resistance in Spain: Update (1990 to 1996). *J Clin Microbiol.* 1998;47:3447–3454.
29. Fenoll A, Jado I, Vicioso D, Berrón S, Yuste JE, Casal J. *Streptococcus pneumoniae* in children in Spain: 1990-1999. *Acta Paediatr.* 2000; 89 (Suppl 435): 44-50.
30. Sandgren A, Sjöström K, Olsson-Liljequist B, Christensson B, Samuelsson A, Kronvall G, and Henriques Normark B. Effect of Clonal and Serotype-Specific Properties on the Invasive Capacity of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.* 2004;189:785–96.
31. Brueggeman AB, Griffiths DT, Meats E, Peto T, Crook DW, Spratt B. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. *J Infect Dis.* 2003;187:1424–32.
32. Kar UK, Satpathy G, Das BK & Panda SK. Characterization of *Streptococcus pneumoniae* ophthalmic, systemic & commensal isolates by pulsed-field gel electrophoresis & ribotyping. *Indian J Med Res.* February 2008;127:171-177.
33. Yano H, Suetake M, Kuga A, Irinoda K, Okamoto R, Kobayashi T, *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis analysis of nasopharyngeal flora in children attending a day care center. *J Clin Microbiol* 2000;38:625-9.
34. Harrell LJ, Sharps SK, Bean RA, Raller LB. Genetic relatedness of *Streptococcus pneumoniae* isolates from paired blood and respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2007;45:2017-9.
35. Lefevre JC, Gasc AM, Lemozy J, Sicard AM, Faucon G. Pulsed field gel electrophoresis for molecular epidemiology of penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. *Pathol Biol (Paris)* 1994;42:547-52.
36. Skoczynska A, Kadlubowski M, Wasko J, Fiett J, Hryniewicz W. Resistance patterns of selected respiratory tract pathogens in Poland. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:377-80.
37. Maiden MC, Bygraves JA, *et al.* Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(6):3140–3145.

38. Obert CA, Gao G, Sublett J, Tuomanen EI, and Orihuela CJ. Assessment of molecular typing methods to determine invasiveness and to differentiate clones of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Genet Evol.* 2007 December ;7(6):708–716.
39. Ryan KJ and Ray CG. In: Sherris. *Medical Microbiology*. Fifth Edition. McGraw-Hill Companies, 2010. p. 460-467.
40. Gillespie SH, Balakrishnan I. Pathogenesis of pneumococcal infection, *J.Med.Microbiol.* 2000; 49:1057- 1067.
41. Van Dam JEG, Fleer A, Snippe H. Immunogenicity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1990;58:1-47.
42. Boulnois GJ. Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol* 1992;138:249-259.
43. Walker JA, Allen RL, Falmagne P, Johnson MK, and Boulnois GJ. Molecular cloning, characterization, and complete nucleotide sequence of the gene for pneumolysin, the sulfhydryl-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect immune.* 1987;55:11884-1189.
44. Díaz E, and García JL. Characterization of the transcription unit encoding the major pneumococcal autolysin. *Gene* 1990;90:157-162.
45. Boulnois GJ, Paton JC, Michell TJ, Andrew PW. Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 1991;5:2611-2616.
46. Paton JC and Boslego JW. Protein Vaccines. In: Siber G. R., Klugman K. P. and Mäkelä P. H. eds. *Pneumococcal Vaccines: the Impact of Conjugate Vaccine*. ASM Press, Washington, D. C., 2008; 421-35.
47. Cockeran R, Anderson R, Feldman C. The role of pneumolysin in the pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae* infection. *Curr Opin Infect Dis.* 2002 Jun;15(3):235-9.
48. Cockeran R, Durandt C, Feldman C, Mitchell TJ, Anderson R. Pneumolysin activates the synthesis and release of interleukin-8 by human neutrophils in vitro. *J Infect Dis.* 2002 Aug 15;186(4):562-5.
49. Rubins JB, Charboneau D, Fasching C, Berry AM, Paton JC, Alexander JE, Andrew PW, Mitchell TJ, Janoff EN. Distinct roles for pneumolysin's cytotoxic and complement activities in the pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996 Apr;153(4 Pt 1):1339-46.
50. Berry AM, Lock RA, Hansman D, Paton JC. Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1989 Aug;57(8):2324-30.

51. Camara M, Mitchell TJ, Andrew PW, Boulnois GJ. *Streptococcus pneumoniae* produces at least two distinct enzymes with neuraminidase activity: cloning and expression of a second neuraminidase gene in *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1991 Aug;59(8):2856-8.
52. Jedrzejewski MJ. Pneumococcal virulence factors: structure and function, *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001;65:187-207.
53. Swiatlo E, McDaniel LS, and Briles DE. In Tuomanen E eds. *The Pneumococcus: Choline-binding proteins*. ASM Press, Washington, DC. 2004; p. 49-60.
54. Crain MJ, Waltman WD 2nd, Turner JS, Yother J, Talkington DF, McDaniel LS, Gray BM, Briles DE. Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 1990 Oct;58(10):3293-9.
55. McDaniel LS, Yother J, Vijayakumar M, McGarry L, Guild WR, Briles DE. Use of insertional inactivation to facilitate studies of biological properties of pneumococcal surface protein A (PspA). *J Exp Med*. 1987 Feb 1;165(2):381-94.
56. Tu AH, Fulgham RL, McCrory MA, Briles DE, Szalai AJ. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 1999 Sep;67(9):4720-4.
57. Håkansson A, Roche H, Mirza S, McDaniel LS, Brooks-Walter A, Briles DE. Characterization of binding of human lactoferrin to pneumococcal surface protein A. *Infect Immun*. 2001 May;69(5):3372-81.
58. Hammerschmidt S, Bethe G, Remane PH, Chhatwal GS. Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 1999 Apr;67(4):1683-7.
59. Shaper M, Hollingshead SK, Benjamin WH Jr, Briles DE. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin. *Infect Immun*. 2004 Sep;72(9):5031-40.
60. Hansman D, and M Bullen. A resistant pneumococcus. *Lancet*. 1967. 2:264-265.
61. Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. *Clin Infect Dis*. 1992 Jul;15(1):77-83.
62. Caputo GM, Appelbaum PC, Liu HH. Infections due to penicillin-resistant pneumococci. Clinical, epidemiologic, and microbiologic features. *Arch Intern Med*. 1993 Jun 14;153(11):1301-10.
63. Jacobs MR, Felmingham D, Appelbaum PC, Grüneberg RN; Alexander Project Group. The Alexander Project 1998-2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Aug;52(2):229-46.

64. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Lexau C, Reingold A, Lefkowitz L, Cieslak PR, Cetron M, Zell ER, Jorgensen JH, Schuchat A. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med*. 2000;343:1917-24.
65. Klugman KP. The successful clone: the vector of dissemination of resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2002;50(Suppl. S2):1-5.
66. Hakenbeck R, Kaminski K, König A, van der Linden M, Paik J, Reichmann P, Zähner D. Penicillin-binding proteins in beta-lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist*. 1999 Summer;5(2):91-9.
67. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Mar;39(3):577-85.
68. Syrogiannopoulos GA, Grivea IN, Tait-Kamradt A, Katopodis GD, Beratis NG, Sutcliffe J, Appelbaum PC, Davies TA. Identification of an erm(A) erythromycin resistance methylase gene in *Streptococcus pneumoniae* isolated in Greece. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Jan;45(1):342-4.
69. Stephens DS, Zughaier SM, Whitney CG, Baughman WS, Barker L, Gay K, Jackson D, Orenstein WA, Arnold K, Schuchat A, Farley MM; Georgia Emerging Infections Program. Incidence of macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* after introduction of the pneumococcal conjugate vaccine: population-based assessment. *Lancet*. 2005 Mar 5-11;365(9462):855-63.
70. Del Grosso M, Iannelli F, Messina C, Santagati M, Petrosillo N, Stefani S, Pozzi G, Pantosti A. Macrolide efflux genes *mef(A)* and *mef(E)* are carried by different genetic elements in *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2002 Mar;40(3):774-8.
71. Davies TA, Bush K, Sahm D, Evangelista A. Predominance of 23S rRNA mutants among non-erm, non-mef macrolide-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* collected in the United States in 1999-2000. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jul;49(7):3031-3.
72. Adrian PV, Klugman KP. Mutations in the dihydrofolate reductase gene of trimethoprim-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 Nov;41(11):2406-13.
73. (67vac) Lopez P, Espinosa M, Greenberg B, Lacks SA. Sulfonamide resistance in *Streptococcus pneumoniae*: DNA sequence of the gene encoding dihydropteroate synthase and characterization of the enzyme. *J Bacteriol*. 1987 Sep;169(9):4320-6.
74. Widdowson CA, Klugman KP, Hanslo D. Identification of the tetracycline resistance gene, *tet(O)*, in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Dec;40(12):2891-3.
75. Widdowson CA, Adrian PV, Klugman KP. Acquisition of chloramphenicol resistance by the linearization and integration of the entire staphylococcal plasmid

pC194 into the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Feb;44(2):393-5.

76. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, Dowell SF, File TM Jr, Musher DM, Niederman MS, Torres A, Whitney CG; Infectious Diseases Society of America; American Thoracic Society. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. Clin Infect Dis. 2007 Mar 1;44 Suppl 2:S27-72.

77. Low DE. Quinolone resistance among pneumococci: therapeutic and diagnostic implications. Clin Infect Dis. 2004 May 15;38 Suppl 4:S357-62.

78. Ho PL, Tse WS, Tsang KW, Kwok TK, Ng TK, Cheng VC, Chan RM. Risk factors for acquisition of levofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: a case-control study. Clin Infect Dis. 2001 Mar 1;32(5):701-7.

79. Pletz MW, Shergill AP, McGee L, Beall B, Whitney CG, Klugman KP; Active Bacterial Core Surveillance Team. Prevalence of first-step mutants among levofloxacin-susceptible invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Apr;50(4):1561-3.

80. 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;9:1159-62.

81. Smith HJ, Walters M, Hisanaga T, Zhanel GG, Hoban DJ. Mutant prevention concentrations for single-step fluoroquinolone-resistant mutants of wild-type, efflux-positive, or ParC or GyrA mutation-containing *Streptococcus pneumoniae* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Oct;48(10):3954-8.

82. de Cueto M, Rodríguez JM, Soriano MJ, López-Cerero L, Venero J, Pascual A. Fatal levofloxacin failure in treatment of a bacteremic patient infected with *Streptococcus pneumoniae* with a preexisting parC mutation. J Clin Microbiol. 2008;46:1558-60.

83. Pérez-Trallero E., Martín-Herrero J.E, Mazón A., García-Delafuente C., Robles P., Iriarte V., Dal-Ré R., García-de-Lomas J., and the Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Antimicrobial Resistance among Respiratory Pathogens in Spain: Latest Data and Changes over 11 Years (1996-1997 to 2006-2007). Antimicrob. Agents Chemother. 2010;54(7):2953–2959.

84. Hooper D. C. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and antitopoisomerase resistance. Clin. Infect. Dis. 1998;27:S54–S63.

85. Janoir C., Zeller V., Kitzis M.-D., Moreau N. J. and Gutmann L. High-level fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires mutations in *parC* and *gyrA*. Antimicrob. Agents Chemother. 1996;40:2760–2764.

86. Davies T. A., Evangelista A., Pflieger S., Bush K., Sahm D. F. and Goldschmidt R. Prevalence of single mutations in topoisomerase type II genes among levofloxacin-susceptible clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated in the United States in 1992 to 1996 and 1999 to 2000. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002;46:119–124.
87. Varon E, Houssaye S., Grondin S., Gutmann L. and the Groupe des Observatoires de la Résistance du Pneumocoque. Nonmolecular Test for Detection of Low-Level Resistance to Fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:572–579.
88. Lim, S., Bast D., McGeer A., de Azavedo J. and Low D. E. Antimicrobial susceptibility breakpoints and first-step *parC* mutations in *Streptococcus pneumoniae*: redefining fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis.* 2003 Jul;9:833–837.
89. Pan XS, Fisher LM. Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones, *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:471-474.
90. 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;40:2252- 2257.
91. Pestova E, Millichap JJ, Noskin GA, Peterson LR. Intracellular targets of moxifloxacin: a comparison with other fluoroquinolones, *J Antimicrob Chemother.* 2000;45:583-590.
92. The Comité de l'Antibiogramme of the Société Française de Microbiologie (CA-SFM). *Recommandations 2010.*
93. Zeller V, Janoir C, Kitzis MD, Gutmann L, Moreau NJ. Active efflux as a mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:1973-1978.
94. Brenwald NP, Gill MJ, and Wise R. Prevalence of a putative efflux mechanism among fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:2032–2035.
95. Gill MJ, Brenwald NP, Wise R. Identification of an efflux pump gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:187-189.
96. Pestova E, Millichap JJ, Siddiqui F, Noskin GA, Peterson LR. Non-PmrA-mediated multidrug resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49:553- 556.
97. Marrer E, Schad K, Satoh AT, Page MGP, Johnson MM, and Piddock LJV. Involvement of the putative ATP-dependent efflux proteins PatA and PatB in fluoroquinolone resistance of a multidrug-resistant mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:685–693.

98. Musher DM, Groover JE, Rowland JM, Watson DA, Struewing JB, Baughn RE, Mufson MA. Antibody to capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*: prevalence, persistence, and response to revaccination. Clin Infect Dis. 1993 Jul;17(1):66-73.
99. Peters TR, Edwards KM. The pneumococcal protein conjugate vaccines. J Pediatr. 2000 Sep;137(3):416-20.
100. CDC. Preventing pneumococcal disease among infants and young children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep. 2000 Oct 6;49(RR-9):1-35.
101. Long SS. Capsules, clones, and curious events: pneumococcus under fire from polysaccharide conjugate vaccine. Clin Infect Dis. 2005 Jul 1;41(1):30-4.
102. 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. Pediatr Infect Dis J. 2007 Feb;26(2):123-8.
103. Singleton RJ, Hennessy TW, Bulkow LR, Hammitt LL, Zulz T, Hurlburt DA, Butler JC, Rudolph K, Parkinson A. Invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes among Alaska native children with high levels of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine coverage. JAMA. 2007 Apr 25;297(16):1784-92.
104. Byington CL, Korgenski K, Daly J, Ampofo K, Pavia A, Mason EO. Impact of the pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal parapneumonic empyema. Pediatr Infect Dis J. 2006 Mar;25(3):250-4.
105. Aguiar SI, Serrano I, Pinto FR, Melo-Cristino J, Ramirez M; Portuguese Surveillance Group for the Study of Respiratory Pathogens. Changes in *Streptococcus pneumoniae* serotypes causing invasive disease with non-universal vaccination coverage of the seven-valent conjugate vaccine. CMI 2008;14:835-843.
106. Moraga-Lop FA. Enfermedad neumococica en la era vacunal y emergencia de serotipos. ¿Tendencias temporales y reemplazo de serotipos? Enferm Infecc Microbiol Clin 2009;27:1-4.
107. Raia A, Plummer N, Shultz S. New types of pneumococci in the pneumonias of children. Arch Pediatr Adolesc Med. 1931;42:57-68 .
108. Tomasz A. New faces of an old pathogen: emergence and spread of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Am J Med. 1999 Jul 26;107(1A):55S-62S.
109. Paton JC, Berry AM, Lock RA. Molecular analysis of putative pneumococcal virulence proteins, Microb.Drug Resist. 1997;3:1-10.
110. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth Informational Supplement. CLSI

document M100-S20. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010, p. 88-91.

111. Pai R, Limor J, and Beall B. Use of Pyrosequencing To Differentiate *Streptococcus pneumoniae* Serotypes 6A and 6B. J Clin Microbiol. Sept. 2005;43:4820–4822.

112. Jin P, Xiao M, Kong F, Oftadeh S, Zhou F, Liu C, and Gilbert GL. Simple, Accurate, Serotype-Specific PCR Assay To Differentiate *Streptococcus pneumoniae* Serotypes 6A, 6B, and 6C. J Clin Microbiol. 2009 Aug;47:2470–2474.

113. Morrissey I and George J. Activities of Fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* Type II Topoisomerases Purified as Recombinant Proteins. Antimicrob Agents Chemother. Nov. 1999;43:2579–2585.

114. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Eighth Edition. CLSI document M07-A8. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.

115. Dagan R, Engelhard D, Piccard E, Englehard D [corrected to Engelhard D. Epidemiology of invasive childhood pneumococcal infections in Israel. The Israeli Pediatric Bacteremia and Meningitis Group. JAMA. 1992 Dec 16;268(23):3328-32.

116. Gray BM, Dillon HC Jr. Clinical and epidemiologic studies of pneumococcal infection in children. Pediatr Infect Dis. 1986 Mar-Apr;5(2):201-7.

117. Orange M, Gray BM. Pneumococcal serotypes causing disease in children in Alabama. Pediatr Infect Dis J. 1993 Mar;12(3):244-6.

118. Afessa B, Greaves WL, Frederick WR. Pneumococcal bacteremia in adults: a 14-year experience in an inner-city university hospital. Clin Infect Dis. 1995 Aug;21(2):345-51.

119. Madhi S. A. and Pelton S. I. Epidemiology, Diagnosis and Treatment of Serious Pneumococcal Infections in Children. In: Siber G. R., Klugman K. P. and Mäkelä P. H. eds. Pneumococcal Vaccines: the Impact of Conjugate Vaccine. ASM Press, Washington, D. C., 2008; 95-116.

120. Greenwood B. The epidemiology of pneumococcal infection in children in the developing world. Philos. Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1999 Apr 29;354 (1384):777-785.

121. Laupland KB, Davies HD, Kellner JD, Luzod NL, Karan T, Ma D, Taub D, Nijssen-Jordan C, Katzko G, Jadavji T, Church D. Predictors and outcome of admission for invasive *Streptococcus pneumoniae* infections at a Canadian children's hospital. Clin Infect Dis. 1998 Sep;27(3):597-602.

122. Laurichesse H., Romaszco J. P., Nguyen L. T., Souweine B., Poirier V., Guolon D., Andre M., Ruivard M., De Champs C., Caillaud D., Labbe A. and Beytout J.

Clinical characteristics and outcome of patients with invasive pneumococcal disease, Puy-de-Dome, France, 1994-1998. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001;20:299-308.

123. Ispahani P, Slack RCB, Donald FE, Weston VC, Rutter N. Twenty year surveillance of invasive pneumococcal disease in Nottingham: serogroups responsible and implications for immunisation. *Arch Dis Child* 2004;89:757-762.

124. AlAayed MS and Hawan A.A. Retrospective review of invasive pediatric pneumococcal diseases in a military hospital in the southern region of Saudi Arabia. *Ann Saudi Med* 2011;31(5):469-472.

125. Bernaola Iturbe E, Aristegui Fernández J, Herranz Aguirre M, García Calvo C, Fernández Pérez C; Grupo de Estudio de Enfermedad Invasora Neumocócica en el País Vasco-Navarra. Study of the incidence of invasive pneumococcal disease in neonates and children aged less than 5 years in the Basque country and Navarre (Spain). *An Esp Pediatr.* 2002 Oct;57(4):301-9.

126. Muñoz-Almagro C, Ciruela P, Esteva C, Marco F, Navarro M, Bartolome R, Sauca G, Gallés C, Morta M, Ballester F, Raga X, Selva L, Catalan study group of invasive pneumococcal disease. Serotypes and clones causing invasive pneumococcal disease before the use of new conjugate vaccines in Catalonia, Spain. *J Infect.* 2011 Aug;63(2):151-62. Epub 2011 Jun 12.

127. Eskola J, Takala AK, Kela E, Pekkanen E, Kalliokoski R, Leinonen M. Epidemiology of invasive pneumococcal infections in children in Finland. *JAMA.* 1992 Dec 16;268(23):3323-7.

128. Shackley F, Knox K, Morris JB, Crook D, Griffiths D, Mayon-White R, George R, Willocks L, Moxon E. Outcome of invasive pneumococcal disease: a UK based study. *Arch Dis Child.* 2000 Sep;83(3):231-3.

129. O'Dempsey TJ, McArdle TF, Lloyd-Evans N, Baldeh I, Lawrence BE, Secka O, Greenwood B. Pneumococcal disease among children in a rural area of west Africa. *Pediatr Infect Dis J.* 1996 May;15(5):431-7.

130. Eric M. Mortensen, Wishwa N. Kapoor, Chung-Chou H. Chang, and Michael J. Fine. Assessment of Mortality after Long-Term Follow-Up of Patients with Community-Acquired Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases* 2003;37:1617-24.

131. Shann F. Bacterial pneumonia: commoner than perceived. *Lancet.* 2001 Jun 30;357(9274):2070-2.

132. British Thoracic Society Guideline Group. Guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults: update 2009. *Thorax, an international journal of respiratory medicine.* October 2009, vol.64. Supplement III.

133. Bradley JS, Byington CL, Shah SS *et al.* The Management of Community-Acquired Pneumonia in Infants and Children Older Than 3 Months of Age: Clinical Practice Guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2011 Oct;53(7):e25-76.

134. Sordé R, Falcó V, Lowak M, Domingo E, Ferrer A, Burgos J, Puig M, Cabral E, Len O, Pahissa A. Current and potential usefulness of pneumococcal urinary antigen detection in hospitalized patients with community-acquired pneumonia to guide antimicrobial therapy. *Arch Intern Med*. 2011 Jan 24;171(2):166-72.
135. Obando I, Muñoz-Almagro C, Arroyo LA *et al*. Pediatric Parapneumonic Empyema, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2008 Sep;14(9):1390-7.
136. Eastham KM, Freeman R, Kearns AM, Eltringham G, Clark J, Leeming J, Spencer DA. Clinical features, aetiology and outcome of empyema in children in the north east of England. *Thorax*. 2004 Jun;59(6):522-5.
137. Calbo E, Díaz Á, Cañadell E, Fábrega J, Uriz S, Xercavins M, Morera MA, Cuchi E, Rodríguez-Carballeira M and Garau J on behalf of the Spanish Pneumococcal Infection Study Network. Invasive pneumococcal disease among children in a health district of Barcelona: early impact of pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:867–872.
138. Levine MM, Lagos R, Levine OS, Heitmann I, Enriquez N, Pinto ME, Alvarez AM, Wu E, Mayorga C, Reyes A. Epidemiology of invasive pneumococcal infections in infants and young children in Metropolitan Santiago, Chile, a newly industrializing country. *Pediatr Infect Dis J*. 1998 Apr;17(4):287-93.
139. Obando I, Arroyo LA, Sánchez-Tatay D, Tarragó D, Moreno D, Hausdorff WP and Brueggemann AB. Molecular epidemiology of paediatric invasive pneumococcal disease in southern Spain after the introduction of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Microbiol Infect*. 2007 Mar;13(3):347-8.
140. Talbot TR, Poehling KA, Hartert TV, Arbogast PG, Halasa NB, Edwards KM, Schaffner W, Craig AS, Griffin MR. Seasonality of invasive pneumococcal disease: temporal relation to documented influenza and respiratory syncytial viral circulation. *Am J Med*. 2005 Mar;118(3):285-91.
141. Brito DA, Ramírez M, and de Lencastre H. Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by Multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2003 Jun;41(6):2378-84.
142. Yu J, Lin J, Benjamin WH Jr., Waites KB, Lee CH, and Nahm MH. Rapid multiplex assay for serotyping pneumococci with monoclonal and polyclonal antibodies. *J Clin Microbiol*. 2005 Jan;43(1):156-62.
143. Iraurgi P, Torres MJ, Gandia A, Vazquez I, Cabrera EG, Obando I, Garnacho J, Aznar J. Modified sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of invasive pneumococci recovered from Seville. *Clin Microbiol Infect*. 2010; 16: 1504–1507.
144. Azzari C, Moriondo M, Indolfi G, Massai C, Becciolini L, de Martino M, Resti M. Molecular detection methods and serotyping performed directly on clinical samples improve diagnostic sensitivity and reveal increased incidence of invasive disease by

- Streptococcus pneumoniae* in Italian children. J Med Microbiol 2008, 57(Pt 10):1205-1212.
145. Jourdain S, Drèze PA, Vandeven J, Verhaegen J, Van Melderen L and Smeesters PR. Sequential multiplex PCR assay for determining capsular serotypes of colonizing *S. pneumoniae*. BMC Infect Dis. 2011 Apr 20;11:100.
146. Tarragó D, Fenoll A, Sánchez-Tatay D, Arroyo LA, Muñoz-Almagro C, Esteva C, Hausdorff WP, Casal J, Obando I. Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR. Clin Microbiol Infect. 2008 Sep;14(9):828-34.
147. Jin P, Kong F, Xiao M, Oftadeh S, Zhou F, Liu C, Russell F, and Gilbert GL. First Report of Putative *Streptococcus pneumoniae* Serotype 6D among Nasopharyngeal Isolates from Fijian Children. J Infect Dis. 2009 Nov 1;200(9):1375-80.
148. Rolo D, Ardanuy C, Calatayud L, Pallares R, Grau I, García E, Fenoll A, Martín R, and Liñares J. Characterization of Invasive Pneumococci of Serogroup 6 from Adults in Barcelona, Spain, in 1994 to 2008. J Clin Microbiol. 2011 Jun;49(6):2328-30.
149. Campos LC *et al.* Prevalence of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6C among invasive and carriage isolates in metropolitan Salvador, Brazil, from 1996 to 2007. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2009;65:112–115.
150. du Plessis M *et al.* Serotype 6C is associated with penicillin-susceptible meningial infections in human immunodeficiency virus (HIV)-infected adults among invasive pneumococcal isolates previously identified as serotype 6A in South Africa. Int J Antimicrob Agents. 2008;32(Suppl. 1):S66–S70.
151. Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. Lancet Infect Dis. 2005 Feb;5(2):83-93.
152. Hausdorff WP, Brueggemann AB, Hackell JG and Scott AG. Pneumococcal Serotype Epidemiology. In: Siber G. R., Klugman K. P. and Mäkelä P. H. eds. Pneumococcal Vaccines: the Impact of Conjugate Vaccine. ASM Press, Washington, D. C. 2008; 139-160.
153. Jette LP, Delage G, Ringuette L, *et al.* Surveillance of invasive *Streptococcus pneumoniae* infection in the province of Quebec, Canada, from 1996 to 1998: serotype distribution, antimicrobial susceptibility, and clinical characteristics. J Clin Microbiol 2001; 39:733–7.
154. Fenoll A, Granizo JJ, Aguilar L, Giménez MJ, Aragoneses-Fenoll L, Hanquet G, Casal J, and Tarragó D. Temporal Trends of Invasive *Streptococcus pneumoniae* Serotypes and Antimicrobial Resistance Patterns in Spain from 1979 to 2007. J Clin Microbiol. 2009 Apr;47(4):1012-20.
155. Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, and Siber GR. Which Pneumococcal Serogroups Cause the Most Invasive Disease: Implications for Conjugate Vaccine Formulation and Use, Part I. Clin Infect Dis. 2000;30:100–21.

156. CDC. Prevention of Pneumococcal Disease Among Infants and Children — Use of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine and 23-Valent Pneumococcal Polysaccharide Vaccine Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Morbidity and Mortality Weekly Report www.cdc.gov/mmwr.
157. Grupo de Trabajo de la Ponencia de Registro y Programa de Vacunas. 2006. Enfermedad invasora por *Streptococcus pneumoniae*. Implicación de la vacunación con la vacuna conjugada heptavalente. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain.
158. Feikin DR, Klugman KP, Facklam RR, Zell ER, Schuchat A and Whitney CG; Active Bacterial Core surveillance/Emerging Infections Program Network. Increased Prevalence of Pediatric Pneumococcal Serotypes in Elderly Adults. *Clin Infect Dis* 2005 Aug 15;41(4):481-7.
159. Liñares J, Ardanuy C, Pallares R and Fenol A. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:402–410.
160. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Direct and indirect effects of routine vaccination of children with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on incidence of invasive pneumococcal disease--United States, 1998-2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2005 Sep 16;54(36):893-7.
161. Ardanuy C, Tubau F, Pallares R, Calatayud L, Domínguez MA, Rolo D, Grau I, Martín R, and Liñares J. Epidemiology of Invasive Pneumococcal Disease among Adult Patients in Barcelona Before and After Pediatric 7-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Introduction, 1997–2007. *Clin Infect Dis*. 2009 Jan 1;48(1):57-64.
162. Coffey TJ, Enright MC, Daniels M, Morona JK, Morona R, Hryniewicz W, Paton JC and Spratt BG. Recombinational exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*. 1998 Jan;27(1):73-83.
163. Spratt BG, and BM Greenwood. Prevention of pneumococcal disease by vaccination: does serotype replacement matter? *Lancet*. 2000;356:1210–1211.
164. Jefferies JMC, Smith A, Clarke SC, Dowson C, and Mitchell TJ. Genetic Analysis of Diverse Disease-Causing Pneumococci Indicates High Levels of Diversity within Serotypes and Capsule Switching *J Clin Microbiol*. 2004 Dec;42(12):5681-8.
165. Gherardi G , Inostrozo JM, O’ryan M, Prado V, Prieto S, Arellano C, Facklam RR, and Beall B. Genotypic Survey of Recent b-Lactam-Resistant Pneumococcal Nasopharyngeal Isolates from Asymptomatic Children in Chile. *J Clin Microbiol*. Nov. 1999 Nov;37(11):3725-30.
166. Brueggemann AB, Pai R, Crook DW, Beall B. Vaccine Escape Recombinants Emerge after Pneumococcal Vaccination in the United States. *PLoS Pathogens*. 2007 Nov;3(11):e168.

167. Coffey TJ, Daniels M, Enright MC and Spratt BG. Serotype 14 variants of the Spanish penicillin-resistant serotype 9V clone of *Streptococcus pneumoniae* arose by large recombinational replacements of the *cpsA-pbpla* region. *Microbiology*. 1999 Aug;145 (Pt 8):2023-31.
168. Brueggemann AB, Coffman SL, Rhomberg P, Huynh H, Almer L, Nilius A, Flamm R and Doern GV. Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* in United States since 1994–1995. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:680–688.
169. Perez-Trallero E, Garcia-Rey C, Martin-Sanchez AM, Aguilar L, Garcia-de-Lomas J, Ruiz J and the Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens (SAUCE Program). Activities of six different quinolones against clinical respiratory isolates of *Streptococcus pneumoniae* with reduced susceptibility to ciprofloxacin in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:2665–2667.
170. Pletz MWR, McGee L, Jorgensen J, Beall B, Facklam RR, Whitney CG, Klugman KP and the Active Bacterial Core Surveillance Team. Levofloxacin-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in the United States: evidence for clonal spread and the impact of conjugate pneumococcal vaccine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:3491–3497.
171. Balsalobre L and de la Campa AD. Fitness of *Streptococcus pneumoniae* Fluoroquinolone-Resistant Strains with Topoisomerase IV Recombinant Genes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:822–830.
172. Karlowsky JA, Thornsberry C, Jones ME, Evangelista AT, Critchley IA, Sahn DF. Factors associated with relative rates of antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae* in the United States: results from the TRUST surveillance program (1998–2002). *Clin Infect Dis*. 2003; 36: 963–70.
173. 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;15:905–911.
174. Adam HJ, Hoban DJ, Gin AS, Zhanel GG. Association between fluoroquinolone usage and a dramatic rise in ciprofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Canada, 1997–2006. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34: 82–85.
175. Canton R, Morosini M, Enright MC, and Morrissey I. Worldwide incidence, molecular epidemiology and mutations implicated in fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae*: data from the global PROTEKT surveillance programme. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52:944–952.
176. Adam HJ, Schurek KN, Nichol KA, Hoban CJ, Baudry TJ, Laing NM, Hoban DJ, and Zhanel GG. Molecular Characterization of Increasing Fluoroquinolone Resistance in *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Canada, 1997 to 2005. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jan;51(1):198-207.

177. Osawa M, Ito Y, Ishida T, Imai S, Ichiyama S, Mishima M, Kansai Community Acquired Pneumococcal Pneumonia Study Group. Molecular characterization of quinolone resistance-determining regions and their correlation with serotypes and genotypes among *Streptococcus pneumoniae* isolates in Japan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29:245–248.
178. Richter S, Heilmann KP, Beekmann SE, Miller NJ, Rice CL, and Doern GV. The Molecular Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* with Quinolone Resistance Mutations. *Clin Infect Dis* 2005;40:225–35.
179. Ho PL, Yam WC, Cheung TKM, Ng WW, Que TL, Tsang DNC, Ng TK, and Seto WH. Fluoroquinolone Resistance among *Streptococcus pneumoniae* in Hong Kong Linked to the Spanish 23F Clone. *Emerg Infect Dis*. 2001 Sep-Oct;7(5):906-8.
180. Wolter N, du Plessis M, Von Gottberg A, de Gouveia L, and Klugman KP. Molecular Characterization of Emerging Non-Levofloxacin-Susceptible Pneumococci Isolated from Children in South Africa. *J Clin Microbiol*. 2009 May;47(5):1319-24.
181. Carlavilla AB, Lopez-Medrano F, Chaves F, Villena V, Echave-Sustaeta J and Aguado JM. Failure of levofloxacin therapy in two cases of community-acquired pneumonia caused by fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* and complicated with emphysema. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005 May;23(5):270-3.
182. Endimiani A, Brigante G, Bettaccini AA, Luzzaro F, Grossi P and Toniolo AQ. Failure of levofloxacin treatment in community-acquired pneumococcal pneumonia. *BMC Infect Dis*. 2005 Nov 24;5:106.
183. Fuller JD, Low DE. A review of *Streptococcus pneumoniae* infection treatment failures associated with fluoroquinolone resistance. *Clin Infect Dis* 2005;41:118–121.