

UNIVERSIDAD DE MURCIA  
FACULTAD DE MEDICINA

“*Streptococcus pneumoniae*: Dos décadas de evolución de resistencia antibiótica y serotipos invasores en Murcia. Portadores actuales y su relación con las vacunas”

*Joaquín Ruiz Gómez*

2012

***A mi mujer, Asun y mis cuatro hijos, María, Joaquín,  
Jose y Kike por su paciencia, comprensión y ayuda en la  
realización de este trabajo.***

# ***Agradecimientos***

***Al profesor Joaquín Gómez, director de esta tesis, con el que me une una amistad entrañable desde nuestra infancia y que ha sido un permanente estímulo para que yo alcanzase esta meta. Después de tanto camino recorrido juntos necesitaba darle esta satisfacción.***

***A todos los Técnicos del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca que de una manera u otra también han sido partícipes de esta tarea.***

# ***ÍNDICE***

# Primera Parte

## **Evolución de serotipos invasores y resistencias**

# 1. Introducción

- 1.1. Historia pag.1-2
- 1.2. Descripción microbiológica pag.2-6
- 1.3. Epidemiología pag.7-8
- 1.4. Mecanismos patogénicos pag.9-10
- 1.5. Mecanismos de defensa pag.10-11
- 1.6. Factores predisponentes pag.11-12
- 1.7. Principales cuadros clínicos pag.12-22
  - 1.7.1.1. Neumonía e infección invasora
  - 1.7.1.2. Meningitis
  - 1.7.1.3. Otitis
  - 1.7.1.4. Sinusitis
  - 1.7.1.5. Endocarditis
  - 1.7.1.6. Síndrome de Austrian
  - 1.7.1.7. Artritis
  - 1.7.1.8. Endoftalmitis
  - 1.7.1.9. Peritonitis
  - 1.7.1.10. Síndrome Urémico-Hemolítico (SUH)

1.8.	Resistencia antibiótica	pag.22-29
1.8.1.1.	Penicilina	
1.8.1.2.	Cefotaxima	
1.8.1.3.	Eritomicina	
1.8.1.4.	Tetraciclina	
1.8.1.5.	Cloranfenicol	
1.9.	Vacunas	pag.29-33

## **2.Objetivos**

## **3.Material y Método**

3.1.	Muestras	pag.35
3.2.	Identificación bacteriana	pag.36
3.3.	Serotipia	pag.36
3.4.	Prueba de sensibilidad	pag.36-38
3.5.	Características del hospital	pag.38-39
3.6.	Método estadístico	pag.39

## 4.Resultados

- 4.1. Serotipos pag.40-55
  - 4.1.1. Tablas serotipos
- 4.2. Meningitis pag.56-61
  - 4.2.1. Tablas meningitis
- 4.3. Empiema pleural pag.62-66
  - 4.3.1. Tablas empiema pleural
- 4.4. Infección invasora pag.67
- 4.5. Resistencias serotipos invasores pag.67-90
  - 4.5.1.1. Penicilina
  - 4.5.1.2. Eritromicina
  - 4.5.1.3. Cefotaxima
  - 4.5.1.4. Resistencia combinada
  - 4.5.1.5. Tetraciclina
  - 4.5.1.6. Cloranfenicol
  - 4.5.1.7. Tablas resistencias



## **5. Discusión**

- 5.1. Serotipos pag.91-100
- 5.2. Meningitis pag.100-103
- 5.3. Empiema pleural pag.104-106
- 5.4. Infección invasora pag.107-110
- 5.5. Resistencia pag.110-117
  - 5.5.1. Penicilina
  - 5.5.2. Eritromicina
  - 5.5.3. Cefotaxima
  - 5.5.4. Tetraciclina y cloranfenicol
  - 5.5.5. Resistencia combinada

# Segunda Parte

**ESTUDIO DE PORTADORES  
NASOFARÍNGEOS DE  
*STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*  
EN LA REGIÓN DE MURCIA**

## **6.Introducción**

## **7.Objetivos**

## **8.Material y Método**

- |      |                           |             |
|------|---------------------------|-------------|
| 8.1. | Diseño                    | pag.121-122 |
| 8.2. | Recogida de datos         | pag.122-123 |
| 8.3. | Estudio de sensibilidad   | pag.124     |
| 8.4. | Serotipado preliminar     | pag.125     |
| 8.5. | Portadores previos a 2001 | pag.126     |
| 8.6. | Método estadístico        | pag.126-127 |

## **9.Resultados**

- |        |                                  |             |
|--------|----------------------------------|-------------|
| 9.1.   | Serotipado preliminar            | pag.127-128 |
| 9.2.   | Serotipos de portadores          | pag.128-130 |
| 9.3.   | Resistencia                      | pag.130-157 |
| 9.3.1. | Penicilina                       |             |
| 9.3.2. | Eritromicina                     |             |
| 9.3.3. | Cefotaxima                       |             |
| 9.3.4. | Resistencia combinada            |             |
| 9.3.5. | Resistencia a otros antibióticos |             |

9.3.6. Tablas portadores

## **10. Discusión**

10.1. Serotipos pag.158-164

10.2. Resistencia pag.164-169

# ***Conclusiones***

- Serotipos invasores
- Resistencia de serotipos invasores
- Serotipos de portadores
- Resistencia de serotipos de portadores
- Cobertura vacunal

# ***Primera Parte***

**Evolución de  
serotipos invasores  
y  
resistencias**

# INTRODUCCION

*S. pneumoniae* (neumococo), es una bacteria conocida desde hace más de cien años, responsable de numerosos tipos de infección en todo el mundo, principalmente de las vías respiratorias. Su hábitat natural es la nasofaringe humana, desde donde se extiende al tracto respiratorio inferior y a otros sitios anatómicos causando cuadros graves invasores como sepsis, meningitis, artritis, peritonitis etc. A pesar de los avances sanitarios experimentados desde su descubrimiento, especialmente vacunas y antibióticos, su influencia como patógeno no ha decaído, sino que se mantiene viva y sigue siendo motivo de seria preocupación como lo demuestra la abundante literatura científica a que da lugar en la actualidad.

## HISTORIA

*S. pneumoniae* fue aislado por primera vez simultáneamente en Francia y EEUU (1,2). En 1880 lo consiguió Pasteur en Francia tras inocular a un conejo la saliva de un niño enfermo de rabia, denominándolo "Microbio septicémico de la saliva". Stemberg lo hizo en USA inoculando un conejo con su propia saliva, designándolo como "*Micrococcus Pasteuri*", En 1884 realizó una descripción más completa y lo llamó "*Micrococcus pneumoniae*" (3). Friedlander en 1882 encontró neumococos en 8 pulmones de autopsias, hallazgo corroborado por autores alemanes al mismo tiempo (4, 5, 6). También en 1882 Gram con su técnica de tinción

reconoció en 19 de 20 pacientes, un microorganismo que no se decoloraba con alcohol que no era otro que el neumococo. En 1890 ya se le identificaba como agente de otitis, meningitis, endocarditis, artritis y empiema pleural (7, 8, 9, 10, 11). La acción protectora de suero inmune antineumococo fue descrita por Klemperer en 1891, al observar que la descendencia de conejos inmunizados era resistente a la infección por la misma cepa de neumococo (12). En 1910 Neufeld describió la diversidad de tipos capsulares dando así un impulso a la sueroterapia (13). En relación con su identificación, también Neufeld descubrió la acción lítica de las sales biliares en 1900 y dos años después el fenómeno de hinchazón de la cápsula o Qellung (14). Wright estudió una vacuna de neumococos completos en 1911 (15) y McLeod en 1945 durante la segunda guerra mundial utilizó otra con antígenos capsulares (16). Estos y otros muchos experimentos desembocaron en la aprobación de la primera vacuna polisacárida para uso comercial con 14 serotipos en 1978 (17) y otra con 23 en 1983, ambas precursoras de las actuales vacuna conjugadas.

La clasificación definitiva como *S. pneumoniae* se adoptó a partir de 1974 en la 8ª edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (18).

## DESCRIPCIÓN MICROBIOLÓGICA

Los neumococos son diplococos gram positivos con los extremos lanceolados, en forma de llama de vela, que forman cadenas cortas en los medios líquidos. En condiciones desfavorables de cultivo tiene tendencia a alargar las cadenas y con el envejecimiento puede



decolorarse apareciendo como gram negativo. La bacteria es capsulada y puede visualizarse con tinción negativa, como la tinta china o positiva por el método de Antoly. No forma esporas y es inmóvil. Entre las características bioquímicas más significativas hay que citar la ausencia de catalasa y de citocromo oxidasa, la solubilidad en sales biliares y la sensibilidad a la optoquina (clorhidrato de etilhidrocupreina), sirviendo estas dos últimas para distinguirlo del resto de estreptococos (19).

La solubilidad en bilis se debe a una amilasa autolítica que actúa sobre la unión alanina- ácido murámico de la pared y que se activa en presencia de sales biliares al 10% (20).

La prueba de la optoquina también sirve para distinguir los neumococos de otros estreptococos, aunque se dan casos de falsos positivos y falsos negativos, como recientemente se ha publicado, 32 cepas de Portugal diseminadas por el país, resistentes a optoquina repartidas entre serotipos muy frecuentes (21). A veces se observa crecimiento de colonias dentro del halo de inhibición del disco que dificultan la interpretación (22). Por ello, además de esta prueba, se recomienda confirmar los aislados con otra como bilis o aglutinación. Para realizar el test de la optoquina se coloca un disco de 5 microgramos en una placa de agar sangre después de sembrar el neumococo y tras incubar 24 horas se lee el halo de inhibición que debe ser mayor de 13 mm (23).

*S. pneumoniae* es capaz de fermentar azúcares que sirven como estimulador de crecimiento, pero la producción consiguiente de ácido conduce a la autólisis por una autolisina que posee (mureina hidrolasa) y que también es responsable del fenómeno en cultivos viejos o presencia de antibióticos que inhiben la pared celular (24, 25,26).

Una débil cantidad de glucosa (1,5%) es un buen estimulador de crecimiento pero una proporción mayor (15%) favorece la rápida autólisis. Este fenómeno es importante tenerlo en cuenta en la práctica diaria, cuando los neumococos crecen en hemocultivos u otros medios líquidos para evitar su lisis por prolongación de la incubación, procediendo a su pase a medios sólidos de forma precoz para conservar su viabilidad y efectuar posteriores pruebas. (20).

El neumococo se comporta como anaerobio facultativo, favoreciendo su crecimiento una concentración de CO<sub>2</sub> entre 5 y 10%. La temperatura óptima de crecimiento es de 36° C, por encima pierde virulencia, con límites entre 20 y 40°. El pH óptimo es 7,2 (límites 7-8,5).

El crecimiento en agar sangre pone de manifiesto, tras 24 horas de incubación, colonias pequeñas lisas a veces muy mucosas, en función de la cápsula, con un halo de hemólisis verde alrededor, (alfa hemólisis). Este fenómeno se debe a la neumolisina (también llamada alfa hemolisina) que degrada la hemoglobina transformándola en un pigmento verde y no como todavía hoy se cree hemolizando los hematíes. Este hecho se comprueba en agar chocolate, donde los hematíes están previamente lisados y sigue produciéndose el halo amarillo-verdoso (27). A las 48 horas el centro de la colonia se hunde como un cráter dándole una forma umbilicada típica. Otras técnicas basadas en reacciones antígeno-anticuerpo sirven de complemento en la confirmación del neumococo y son aplicables tanto a colonias crecidas como a muestras patológicas. La aglutinación (28), aplicada a LCR y sangre, coaglutinación para muestra de esputo (29), ELISA, etc. son ejemplos útiles que se emplean frecuentemente. En los últimos

años una prueba de detección de antígeno en orina y LCR ha inundado el mercado por su facilidad de ejecución y los buenos resultados que proporciona en el diagnóstico de neumonías y otros cuadros neumocócicos en pacientes adultos, ya que en los niños produce falsos positivos en orina al eliminar el antígeno por esta vía los portadores (30). Sin embargo si es útil para meningitis en pacientes de cualquier edad (31). Se trata de una inmunocromatografía (BINAX NOW), que da unas cifras de sensibilidad y especificidad del 80 y 97% respectivamente (32). Esta técnica puede aplicarse sobre colonias para confirmar de un modo rápido un diagnóstico. El inconveniente principal, además de los ya comentados falsos positivos en niños, es su precio por lo que conviene protocolizar estrictamente su uso para hacer una buena práctica en la utilización de los recursos.

Finalmente las pruebas moleculares ya han pasado la fase de fabricación casera y se presentan comercialmente lo que facilita su uso, aunque al mismo tiempo consumen más recursos. Sin embargo es el test de elección en determinadas circunstancias en que puede superar los resultados del cultivo. Así por ejemplo, resulta sumamente eficaz para el diagnóstico de empiema pleural o meningitis neumocócica confirmando no solamente la etiología sino facilitando además el serotipo (33, 34, 35).

Igual que el resto de estreptococos, el neumococo posee un carbohidrato grupo específico (polisacárido C) y una proteína no antifagocítica (36), y abundante fosfocolina en su pared celular al contrario que otros estreptococos (37). Los principales componentes de la pared son el peptidoglicano y el ácido teicoico rico en fosfocolina (27).

La cápsula está formada por polisacáridos que le confieren especificidad antigénica (38), conociéndose actualmente más de 90 serotipos distintos (39).

La inmunización de conejos estimula la aparición de anticuerpos que provocan in vitro una reacción de aglutinación con la bacteria haciendo la cápsula refringente (Reacción de Quellung). Estos anticuerpos séricos específicos son los que han dado lugar a la denominación en serotipos para su clasificación. De las dos nomenclaturas existentes, la americana los distingue con números correlativamente y la danesa, más aceptada, agrupa aquellos con semejanzas antigénicas en el mismo número (serogrupo), subdividiéndolo con letras, por ejemplo, 23A, 23B (serotipos). (36, 40). Los serotipos productores de infecciones más frecuentemente, fueron los primeros en identificarse y se les dio los primeros números. Así, los más bajos son los más aislados a partir de muestras patológicas (27).

Los neumococos son capaces de adquirir ADN de otros neumococos o de otras especies, lo que se conoce como “transformación” (41). La transformación de los tipos capsulares se produce tanto de modo experimental como en la naturaleza (42), lo que significa que pueden cambiar sus cápsulas. Este fenómeno se conoce desde los experimentos de Griffith (43), en la década de 1920. Inyectando en peritoneo de ratones neumococos vivos no capsulados, junto con neumococos muertos capsulados, se recuperan bacterias vivas capsuladas. Esta observación la explicó Avery (44), unos años después, probando la adquisición de ADN por los microorganismos recuperados con cápsula.

## EPIDEMIOLOGÍA

El nicho ecológico de *S. pneumoniae* es la nasofaringe, como sucede con otras bacterias propias del tracto respiratorio. La presencia de neumococo como colonizador del tracto respiratorio superior varía entre el 5 y más del 70% de personas sanas (45), siendo los niños y las poblaciones cerradas las que presentan las cifras más altas (36, 46, 47). La tasa de colonización es geográfica y estacional, con niveles altos en los meses fríos coincidiendo con la mayoría de viriasis respiratorias (48, 49). Varía igualmente con la edad, mucho más frecuente en niños menores de 6 años que asisten a guarderías y tienen hermanos jóvenes, constituyendo el principal reservorio para la extensión del neumococo en familias y comunidades (50). Los adultos presentan una colonización más baja y la adquieren generalmente por contacto con niños, favoreciéndola el consumo de tabaco, asma e infección respiratoria aguda (51). Las familias sin niños están menos colonizadas (52, 53). Recientemente se han obtenido tasas de colonización muy altas siguiendo la metodología de la WHO que intenta estandarizar los procedimientos para hacer comparables los resultados de distintos estudios (54) y técnicas de PCR.

El estado de portador comienza muy pronto, en los niños recién nacidos con bajo peso (55), incluso intraparto (56), aumentando rápidamente, 12% a los 2 meses, 32% a los 6 meses (57). La duración de este estado varía con el serotipo según algunos estudios, por ejemplo el serotipo 3 dura 8 semanas y el 19, 6 semanas (58), pero generalmente es mayor en niños y personas con bajos títulos de anticuerpos específicos en el momento de la colonización (59), ya que el estado de portador no induce un nivel

de inmunidad local o sistémica suficiente (60, 58). La dinámica de colonización se ha demostrado recientemente que cambia con rapidez. Así, un mismo individuo puede colonizarse y recolonizarse varias veces al año con distintos serotipos (47). Los nuevos métodos moleculares han permitido afinar los resultados, confirmándose la presencia de varios serotipos simultáneamente (61, 62, 63, 64). Cepas presentes en baja densidad pueden ser detectadas más fácilmente usando PCR-multiplex y microarray que usando el método clásico de Quellung. En una reciente publicación se afirma que dependiendo de la técnica empleada, los aislamientos de serotipos múltiples varía entre el 11 y el 48% (25).

La diseminación se ve favorecida por el hacinamiento, como ocurre en poblaciones de niveles socioeconómicos bajos y en determinados colectivos como guarderías, escuelas, instalaciones militares etc. (48, 65). En definitiva, la edad, condiciones y estilo de vida influyen en el estado de portador y son las principales razones no técnicas para explicar las diferencias observadas en distintos estudios (66, 67).

Variantes transparentes de neumococos con bajo nivel de polisacárido, se ha demostrado que son capaces de colonizar más eficazmente la nasofaringe en modelos animales de portadores (68). Por el contrario, variantes opacas ricas en cápsula disminuyen su capacidad de adherencia a las células hospedadoras (69). Arai et al (70), han demostrado una variación de fase, de transparente a opaca, entre los neumococos nasofaríngeos y óticos del mismo paciente. De este modo, la variante opaca con más cápsula se defiende mejor de la opsonización en el oído medio.

# PRINCIPALES MECANISMOS PATOGENICOS

## Adherencia

Los neumococos, como cualquier otro patógeno bacteriano extracelular, necesitan adherirse a las células del huésped. El éxito como colonizador demuestra la capacidad para adherirse a las células de mamíferos y replicarse en la nasofaringe. Para ello dispone de varios mecanismos como la adhesina de superficie A y las proteínas de unión a la colina (71). La variación de fase también puede desempeñar un papel importante. Los microorganismos con colonias transparentes poseen grandes cantidades de fosforilcolina y proteína A de unión a la colina, lo que facilita la adherencia a las células de mamíferos (72). Las colonias opacas por el contrario persisten más en la mucosa nasal y sin embargo son letales inyectadas peritonealmente. La invasión atravesando barreras mucosas puede deberse a la proteína A de unión a colina que interacciona con las inmunoglobulinas de superficie de células epiteliales y mucosas con endocitosis y liberación de la membrana celular interna (73).

## Inhibición de la fagocitosis

La cápsula desempeña un papel fundamental impidiendo la acción de los fagocitos, al no poder reconocer estos los receptores capsulares, inhibiendo el complemento y repeliendo las células fagocíticas mediante fuerzas electroquímicas.

## Otros factores de virulencia

La neumolisina producida por todos los serotipos es citotóxica para fagocitos y células epiteliales y provoca inflamación por activación, del complemento, factor de necrosis tumoral e interleucina 1 (74, 75).

La autolisina contribuye a reparar la pared bacteriana y en la infección es capaz de liberar componentes del peptidoglicano que activan el complemento y la neumolisina, provocando una intensa respuesta inflamatoria.

## PRINCIPALES MECANISMOS DE DEFENSA

### Anticuerpos frente a la cápsula

Los anticuerpos anticapsulares son protectores frente a la infección neumocócica de forma individualizada según el serotipo. Una vez infectado el paciente, aparecen en sangre a los 5-8 días del comienzo de la infección, momento en el que desaparece la fiebre en ausencia de tratamiento antibiótico. Hay ensayos in vitro que demuestran que se produce un incremento de la muerte de los neumococos en presencia de anticuerpos anticapsulares (76, 77). También en la era preantibiótica la administración de suero con anticuerpos específicos de tipo, conseguía mejoría en la neumonía neumocócica. La duración de estos anticuerpos, sin embargo, no parece muy prolongada ya que hay estudios que lo demuestran, como uno realizado en reclutas (78), donde se comprobó que casi ninguno tenía anticuerpos contra la mayoría de serotipos. También



parece que la colonización estimula la producción de anticuerpos en los primeros treinta días (79). Esta puede ser la causa de la escasez de enfermedad neumocócica pese a la alta prevalencia de colonización. Los casos de infección se producirán mayoritariamente una vez colonizado el individuo y antes de la producción de ellos.

### El bazo

Representa la primera barrera de defensa para eliminar los neumococos no opsonizados en el torrente sanguíneo (80). Esto se demuestra por el curso gravísimo que sigue la infección neumocócica en personas esplenectomizadas (81,82).

## FACTORES PREDISPONENTES

La defensa del huésped frente a la infección por neumococo se basa en los anticuerpos y el complemento por un lado y los polinucleares por otro. Así, la producción alterada de anticuerpos será un factor predisponente, agammaglobulinemia, tanto congénita como adquirida (83). El VIH por déficit de producción de anticuerpos es una causa conocida de provocar altas tasas de infección neumocócica (84). Los déficit de la fracción del complemento c1, c2, c4, también están ligados a una mayor susceptibilidad (83). Los pacientes esplenectomizados (85), la anemia de células falciformes, enfermedades del sistema linfoproliferativo, mieloma múltiple, alcoholismo, diabetes etc. también son factores predisponentes (86, 87, 88, 89). Las edades extremas de la vida, la presencia de

infecciones respiratorias, especialmente la gripe, y el tabaquismo facilitan igualmente la infección (36, 60, 90).

## PRINCIPALES CUADROS CLINICOS

### Neumonía e infección invasora

Los neumococos pueden alcanzar los alvéolos por fallo en los mecanismos de defensa como microaspiración o defecto ciliar. Una vez allí proliferan, activan el complemento y generan la producción de citocinas y leucocitos, produciéndose un exudado inflamatorio con acumulación de líquido que puede detectarse por rayos X. El diagnóstico microbiológico se realiza por tinción de Gram o cultivo de esputo y más fácilmente por la detección de antígeno urinario por inmunocromatografía, en el caso de los pacientes adultos como ya se comentó. El hemocultivo es un buen método diagnóstico si la neumonía es bacteriémica, pero esta circunstancia se da solamente en alrededor de un 20% de casos. La detección de antígeno y la PCR también están influenciadas por este hecho, así Smith et al (91), obtuvieron cifras de sensibilidad del 88% para el primero y del 53% para la segunda en el caso de cuadros bacteriémicos y del 27% y 8% respectivamente en neumonías no bacteriémicas. Otros estudios sobre esputos muestran mejor sensibilidad para PCR, pero baja especificidad (92, 93). Con muestras de sangre ocurre lo contrario, aumenta la especificidad y disminuye la sensibilidad (94).

El neumococo es el agente etiológico más frecuente en la neumonía adquirida en la comunidad (51), y de enfermedad

respiratoria e invasora en el mundo, particularmente en los menores de 5 años (95). Las pruebas diagnósticas como se ha comentado no permiten en muchas ocasiones la confirmación definitiva, especialmente en niños en los que es difícil obtener muestra respiratoria y el antígeno urinario no funciona por dar falsos positivos. Por ello las cifras de neumonía de origen neumocócico no son fáciles de calcular y hay que recurrir a métodos indirectos para obtener datos más o menos fiables. En USA por ejemplo se estimaron cifras de entre 200.000 y 1.000.000 de casos /año con una incidencia de 68-260 casos por 100.000 personas/año (96).

La neumonía neumocócica es la complicación bacteriana secundaria a la gripe más frecuente y el neumococo es la causa más habitual de empiema pleural, una complicación no rara en la neumonía primaria (48, 36). Diversos estudios coinciden en la estimación de que se producen cuatro neumonías por cada caso de bacteriemia neumocócica (97, 98, 49).

La mortalidad si la neumonía es bacteriémica se estima entre 10-30% para adultos y menos del 3% para niños, elevándose mucho en acianos con comorbilidad (51), pero también existen otros factores como pertenecer a las edades extremas de la vida , la virulencia de la cepa, y eventualmente la resistencia antibiótica (36, 99, 100).

La enfermedad invasora definida como el aislamiento de *S. pneumoniae* de un sitio habitualmente estéril, afecta más frecuentemente a niños menores de 2 años, adultos mayores de 65 y personas inmunodeficientes (51,101). Se calcula que 1,6 millones de personas mueren anualmente a consecuencia de este tipo de infección, incluyendo un millón de niños menores de 5 años (51).

La bacteriemia primaria neumocócica (en ausencia de foco conocido) se estima en 10% del total (102,103), destacando algunos autores la obligación de sospechar este cuadro en niños con fiebre elevada sin foco aparente (104,105). En niños, exceptuando el periodo neonatal, el neumococo es el principal causante de bacteriemia (60), tanto asociada a neumonía como de foco desconocido (106). La incidencia de enfermedad invasora en niños en Europa y USA es de 8-75 casos por 100.000 personas/año, mientras que en países en desarrollo aumenta a más de 250 por 100.000 (107,108). Los factores de riesgo para la infección invasora están relacionados con el consumo de alcohol, fallo cardíaco congénito, infección reciente por el virus de la gripe, diabetes, asma, tabaquismo y estancia en instalaciones cerradas, para pacientes inmunocompetentes (51). El riesgo se eleva entre los inmunodreprimidos, como esplenectomizados, VIH positivo etc. También está elevado en niños en países en desarrollo probablemente por hacinamiento, falta de acceso a cuidados sanitarios, malnutrición, en definitiva asociado a la pobreza. (109) Determinadas poblaciones como indígenas de Alaska, indios americanos, aborígenes australianos, maoríes en Nueva Zelanda y beduinos en Israel, también son más susceptibles a infecciones invasoras neumocócicas (51,107,108).

La edad y comorbilidad afectan la supervivencia según se demostró en un estudio de 18.000 neumonías. (109). La mortalidad afectó a menos del 3% de niños menores de 5 años, 14% entre los 5 y 65 años y 24% para los mayores de 65.

## Meningitis

La infección neumocócica es la causa más frecuente de meningitis bacteriana del adulto y de niños vacunados frente a *H influenzae*, contando los casos esporádicos (110). En un estudio reciente de USA que abarca desde 1997 a 2008, la incidencia de meningitis neumocócica disminuyó de 1,09 casos por 100.000 habitantes en el periodo 99-2000 a 0,08 en el 2006-2007 (111).

Los microorganismos alcanzan las meninges a través del torrente circulatorio tras una bacteriemia o se extienden directamente desde los senos y el oído medio (112), aunque esta segunda posibilidad se ha puesto en duda en un estudio de autopsias de los huesos temporales de niños fallecidos por meningitis bacteriana, en el que no se hallaron pruebas de extensión desde el oído (113). Una vez que el neumococo alcanza las meninges, la capacidad para producir inflamación y de escapar a la fagocitosis juega el papel principal en el desarrollo del cuadro.

El diagnóstico microbiológico tradicional suele ser exitoso si el paciente no ha sido tratado previamente con antibióticos o han pasado menos de tres horas desde el inicio del tratamiento. Los neumococos pueden verse en la tinción de Gram y recuperarse por cultivo convencional, de donde se podrán serotipar y someter a pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. En caso de tratamiento previo, se dispone de dos técnicas muy efectivas como son la detección de antígeno por inmunocromatografía y la PCR que identifica la presencia de neumolisina y puede determinar el serotipo (35). La inmunocromatografía detectó el 98,6% de cultivos probados y fue negativa en el 99,3% de meningitis bacteriana de

otra etiología en un estudio realizado en cinco centros de Asia y África (114).

La mortalidad varía del 16 al 37% en adultos y del 1 al 3% en niños, muy superior a la del meningococo, con cifras más elevadas en pacientes con comorbilidad (51), como sucede en los ancianos en los que la mortalidad puede alcanzar hasta el 80% (115). En el estudio de Tigpen ya citado, la mortalidad no varió significativamente durante el periodo 99-2007. Las secuelas neurológicas son más frecuentes que con otros microorganismos (36,116) e incluyen trastornos de la audición, retraso mental, alteraciones motoras y convulsiones (117). La meningitis recurrente es otro cuadro en que el neumococo ocupa el primer lugar, siendo la causa más habitual la existencia de comunicación entre el espacio subaracnoideo y la mucosa de las vías respiratorias altas, generalmente secundaria a traumatismo craneo-encefálico.

### Otitis

El principal microorganismo implicado en la otitis media aguda diagnosticada a partir de material obtenido del oído medio es el neumococo, junto con cepas no tipificables de *H. influenzae* y *B.catarrhalis* (118), tanto en niños como en adultos (119). La mayoría de niños antes de los seis años ha tenido al menos un episodio de otitis media aguda, presentándose más de la mitad de los casos antes de un año de vida (120, 121). La congestión de la trompa de Eustaquio, generalmente por infecciones virales previas, como se ha demostrado en modelo murino (122), favorece el proceso que habitualmente sigue a la colonización por un serotipo nuevo, aunque la mayoría de casos de colonización no van

seguidos de infección (123). Se estima que el neumococo es responsable del 30 al 60% de los casos de otitis media aguda (124,125) y la razón más habitual por la que se prescriben antibióticos a los niños (126). En una reciente publicación sobre población china, el neumococo fue responsable del 39,2% de los casos de otitis media aguda, siendo el primer patógeno en los grupos de edad de 0-1 años y 1-3 años (127). También en Francia ocupaba el primer lugar, en 2009, entre los niños con fallo tras tratamiento antibiótico por otitis, con unas cifras de neumococos no susceptibles a penicilina del 96% y con el serotipo 19A destacado como responsable del 84,5% de las cepas aisladas (128). En el norte de España, se ha observado un descenso de la resistencia antes de la introducción de la vacuna heptavalente hasta 2007 y una posterior elevación como consecuencia de la diseminación de los clones ST320 y ST276 del serotipo 19A (129). La otitis media del adulto con enfermedades de base como alcoholismo o cirrosis puede ser el origen de una infección neumocócica invasora grave como meningitis, endocarditis o sepsis. Los serotipos que producían otitis con más frecuencia antes de la comercialización de la vacuna PCV-7 eran 6, 14 19F y 23F posiblemente relacionado con su capacidad de adherencia (27). Sin embargo en la era postvacunal estos serotipos están siendo reemplazados por otros como 19A, 3 y otros no vacunales, como está sucediendo en España (130).

El diagnóstico etiológico de la otitis es sencillo si se obtiene material del oído medio, circunstancia por otro lado poco frecuente, pudiéndose entonces realizar por métodos tradicionales como, microscopía, cultivo y pruebas rápidas. Hotomi et al, obtuvieron una sensibilidad y especificidad del 81 y 80 % respectivamente en

muestras de oído medio mediante un test inmunocromatográfico (131).

### Sinusitis

La sinusitis aguda está causada por las mismas bacterias que la otitis, con *S. pneumoniae* como primer patógeno (132, 133). Igual que en el oído, la congestión nasal por infecciones virales o alergia juegan un papel primordial en el proceso, proporcionando la acumulación de líquido en los senos paranasales, un excelente medio de cultivo para la multiplicación bacteriana. Aproximadamente el 0,5% de todas las infecciones comunes se complican con una sinusitis (134). A partir de los senos el neumococo puede producir cuadros más graves como meningitis (135). Las muestras para diagnóstico son difíciles de obtener, no sirviendo el exudado nasal por su escasa fiabilidad, por lo que en casos refractarios al tratamiento hay que recurrir a la punción de los senos.

### Endocarditis

Antes de la era antibiótica la endocarditis neumocócica suponía el 15% de todas las endocarditis, disminuyendo posteriormente la cifra hasta un 3% aproximadamente (136,137). En algunas poblaciones sin embargo, como los habitantes de Groenlandia, las tasas siguen siendo muy altas, 24% del total, muy superiores a las más recientes publicadas en población caucásica que están entre el 1% y 3%. Además presentan una alta tasa de mortalidad y necesidad de cirugía para recambio valvular (138).



La mayoría de pacientes con endocarditis neumocócica presentan algún factor de riesgo entre los que destaca el alcoholismo (137, 139).

### Síndrome de Austrian

Se trata de un cuadro en el que se presenta la triada de meningitis, neumonía y endocarditis causada por un solo agente. Lo describió Herchl en 1862 siguiendo la autopsia de cinco pacientes y en 1881 Osler lo llamó Síndrome de Austrian cuando la etiología era neumocócica. (140,141). El proceso tiene una alta mortalidad describiéndose solo casos muy aislados (142,143). White et al., publicaron recientemente un caso en una mujer durante un viaje de vacaciones en Turquía causado por una cepa del serotipo 6A (144).

### Artritis

El neumococo es responsable de menos del 1% de las artritis infecciosas de adultos de 15 a 50 años, del 10% en niños y del 5% en mayores de 50 años (145,146). En algunos casos la artritis puede presentarse asociada a neumonía (147,148).

El serotipo 19A se ha aislado como responsable de artritis en el periodo postvacunal, sustituyendo a los serotipos vacunales que eran los agentes causales de los cuadros contabilizados en niños antes de la vacunación, según pone de manifiesto un estudio realizado en hospitales de París (149).

## Endoftalmitis

*S. pneumoniae* produce infecciones leves del ojo, como conjuntivitis, con mucha frecuencia, aislándose cepas no capsuladas habitualmente. La endoftalmitis sin embargo es mucho más rara y al mismo tiempo un cuadro muy grave que puede acabar con la pérdida de la visión. A veces tiene su origen como complicación de cirugía de cataratas, trasplante de córnea etc., (150,151). En otros casos se produce como un foco metastático de pacientes con bacteriemia, endocarditis o meningitis (152,153) e incluso como una endoftalmitis endógena en pacientes aparentemente sanos sin ningún factor de riesgo (154). En los últimos años se están aplicando pruebas moleculares para ayudar al diagnóstico en diversos tipos de muestra en infección invasora incluido el humor vítreo con el que Chandesris consiguió el primer resultado positivo en 2007 (155), por PCR, mejorando los resultados del cultivo tradicional que no supera la dificultad del tratamiento antibiótico previo o la escasa cantidad de muestra disponible en estos casos.

La endoftalmitis causada por *S. pneumoniae* se asocia con un pronóstico visual pobre a pesar de la instauración de tratamiento precoz adecuado (156).

En un estudio multicéntrico español que recogía 36 casos, el origen fue considerado exógeno en el 94,5% de los pacientes y los factores de riesgo más frecuentemente asociados fueron cirugía previa ocular y trauma ocular. Casi en la mitad de los casos se necesitó realizar evisceración, el 16% de ellos tras fallar el tratamiento antibiótico (157).

## Peritonitis

El neumococo es uno de los principales responsables de peritonitis espontánea en el paciente cirrótico (36,158). En algunos casos la peritonitis es secundaria a infección genital, un cuadro que parece aumentar en pacientes jóvenes de América del Sur (159, 160, 161, 162).

Lagos et al., en Chile informaron de la presencia común del serotipo 1 entre niñas de 5 a 14 años de edad (163). La peritonitis primaria neumocócica en pacientes con cirrosis se extiende muy a menudo vía hematógena desde el tracto respiratorio y se asocia con alta mortalidad (164).

## Síndrome Urémico-Hemolítico (SUH)

El síndrome urémico hemolítico (SUH), es la primera causa de fallo renal en niños menores de 3 años de edad. Habitualmente ocurre después de un episodio de diarrea debido a infección por *E. coli* productor de toxinas Shiga.

*S. pneumoniae* produce una atípica forma de SUH asociado a anemia hemolítica, trombopenia y fallo renal. Se estima que ocasiona aproximadamente el 5% de casos de SUH en niños, pero su frecuencia parece haber aumentado en la pasada década (165). En Taiwán se consideró la neumonía neumocócica invasora como la mayor causa de SUH en pacientes pediátricos entre 1995 y 2008 (166).

.En Utah se ha producido un aumento del porcentaje de infección invasora neumocócica complicada por SUH de 0,3 a 0,5 desde la introducción de la vacuna PCV-7, con una clara asociación con el

serotipo 3. También la neumonía y el empiema pleural estaban asociados con el desarrollo del síndrome en comparación con la infección invasora sin él (167).

En una serie que abarca desde 1997 a 2007 en USA con 37 casos recogidos, el 76% de los pacientes habían completado la vacunación con PCV-7, identificándose un 96% de las cepas como serotipos no vacunales, con el 19A, (50% de casos), en primer lugar (168), igual que en otro estudio realizado en Pensilvania (169).

## RESISTENCIA ANTIBIOTICA

### Penicilina

Durante aproximadamente cuatro décadas *S. pneumoniae* se mantuvo sensible a penicilina con una concentración mínima inhibitoria menor de 0,01 mcg/ml. En 1967 se describió la primera resistencia a este antibiótico en una cepa aislada del esputo de una mujer australiana con hipogammaglobulinemia, politratada con penicilina, tetraciclina, eritromicina, sulfamidas y cloranfenicol (170). Posteriormente se describieron cepas con resistencia en Nueva Guinea, donde se había administrado penicilina de forma profiláctica durante largos periodos (171). En 1977 y 1978 se descubren en Sudáfrica dos graves epidemias causadas por neumococos resistentes no solo a penicilina, (CMI=2-8), sino también a otros antibióticos. Los pacientes en su mayoría eran niños previamente hospitalizados o con malnutrición que además habían recibido en muchos casos tratamiento antibiótico (172,173).

Uno de los brotes estaba causado por el serotipo 19A y el otro por el 6A y 19A.

Debido al impacto que produjeron las miniepidemias sudafricanas se iniciaron los estudios de vigilancia en muchos países, demostrándose la presencia de cepas resistentes en diversos lugares, pero con grandes diferencias geográficas. Cifras inferiores al 1,5% se encontraron por ejemplo en Canadá, Francia y Nueva Zelanda (103, 174, 175) y superiores al 10% en España, Sudáfrica, Hungría e Israel entre otros (176, 177, 178).

En España, Cruz et al. , en 1981, aislaron una cepa con CMI mayor de 0,16, procedente de un niño con neumonía (179). Al año siguiente Casal et al., (180) encontraron, en neumococos productores de bacteriemia en enfermos de varios hospitales, un 8,7% de resistencias. En 1985, en un estudio realizado por Latorre con muestras de niños hospitalizados la cifra de resistencia alcanzó un 51%, correspondiendo el 21% a resistencia alta (181). En Galicia en 1989 la resistencia llega al 35,3 % (182) y en Barcelona al 40% en 1990 (183). A partir de esos años nos convertimos en uno de los países con tasas más altas de resistencia a penicilina, alcanzándose el pico en el periodo 93-97, con un 38,8% de cepas invasoras no susceptibles en un trabajo de ámbito nacional (184), comenzando entonces a declinar la resistencia hasta el 24,7% en 2007. Esta tendencia se ha observado en otros lugares como USA donde la disminución pasó del 21% al 14% entre 99 y 2005 (185), o Canadá entre 2000 y 2006 (186). Sin embargo, en otros países como Taiwán, los neumococos no susceptibles a penicilina aumentaron del 73% al 78% de 2003 a 2005(187) o Finlandia con incremento del 8% al 16% en el mismo periodo (188).

Existen diversas opiniones que tratan de explicar estos cambios tan dispares. Entre ellas podemos recordar las variaciones en el consumo de antibióticos entre épocas o regiones, la presencia y expansión de clones resistentes y la vacunación iniciada en 2001 que disminuye la presencia de serotipos vacunales, que suelen ser los más resistentes, con reemplazamiento por otros más susceptibles (189, 186,184).

El neumococo tiene cinco proteínas de unión a penicilina de alto peso molecular (187) tres de las cuales PBP1A, PBP2B y PBP2X están fundamentalmente envueltas en la resistencia, por modificaciones en la secuencia de aminoácidos que reducen la afinidad (190, 191,192). Clásicamente las alteraciones de PBP1A y PBP2X se asocian con resistencia a penicilina/cefotaxima y alteraciones en PBP2B con amoxicilina (193,194, 195), aunque no de manera exclusiva. Por ejemplo se han demostrado alteraciones en PBP2B ligadas con resistencia a cefotaxima (196). Sin embargo, otros mecanismos adicionales no relacionados con PBPs aún no identificados, son necesarios para el desarrollo de resistencia completa a penicilina (197).

Como consecuencia de estos complejos cambios en la afinidad por las PBPs periódicamente se encuentran cepas con muy elevada concentración mínima inhibitoria frente a los betalactámicos de mayor actividad, como penicilina, amoxicilina y cefotaxima, que pueden comprometer seriamente su eficacia. Los sistemas de vigilancia ya establecidos desde hace décadas, nos permiten controlar el continuo cambio en serotipos, clones y resistencias, tanto en nuestro entorno como en los lugares más alejados, contribuyendo a difundir información valiosa tanto desde el punto de vista epidemiológico como terapéutico.

## Cefotaxima

La cefotaxima demostraba una excelente actividad frente a neumococo en el momento de su comercialización, convirtiéndose desde el principio en un antibiótico de referencia para tratar infecciones graves, especialmente meningitis.

Liñares et al en un trabajo clásico (198) estudió la susceptibilidad de 300 cepas de neumococo con diversos grados de resistencia a penicilina, frente a 24 antibióticos beta-lactámicos, estableciendo tres grupos. En el de mayor actividad se encontraba cefotaxima junto a ceftriaxona, imipenen, meropenem, y cefpiroma, que eran los menos afectados a medida que aumentaba la resistencia a penicilina.

No obstante, ya se describían cepas raras con mayor CMI para cefotaxima que para penicilina, pero estas no se llegaron a extender como se temió inicialmente (199, 200).

Considerando como resistentes las cepas con CMI mayor de 2 que marcan las normas actuales para infecciones no meníngeas, el porcentaje de aislados que cumple ese criterio ha sido y es bajísimo, salvando las raras excepciones mencionadas en el párrafo anterior.

Sin embargo en el caso de meningitis, las circunstancias cambian sustancialmente. Así, a finales de la década de los 80 y comienzo de los 90 se empezaron a describir casos de meningitis neumocócica que no respondían al tratamiento con cefotaxima. Unas veces las cepas aisladas tenían una CMI=> 2, que en esos momentos era el punto de corte establecido para considerarlas resistentes (201, 199, 202) y en otros sin embargo las CMI oscilaban entre 0,5 y 1 mcg/ml (203, 204, 205) lo que abrió la

discusión acerca del tratamiento empírico de esta infección y de la necesidad de adecuar las normas sobre susceptibilidad a las nuevas circunstancias (206, 203).

Diversos autores propusieron el uso de vancomicina intravenosa o intratecal, cefotaxima en altas dosis o combinaciones entre ellas e incluso con rifampicina (205, 207, 208,209).

Friedlander et al en Dallas publicaron un incremento desde 0% en el periodo 81-83 al 4,5% en 91-92 de cepas de neumococo con CMI mayor de 0,5 a cefotaxima (210). En España entre el 90 y 96, (211) encontraron 26 cepas con CMI mayor de 2 y 196 con CMI= 2 entre 9243 neumococos estudiados. En un ensayo multicéntrico realizado en USA entre 1994 y 1995 el porcentaje de cepas resistentes fue solo del 3% ( 212).

En la última década se ha producido un incremento de resistencia en países donde no se ha introducido la vacuna PCV-7, como Taiwán, con aumento del 11 al 23% de aislados con CMI=1 entre 1997 y 2007 (213).

En otros países como Alemania, con tasas bajas de resistencia, esta no ha variado (214).

### Eritromicina

El primer aislamiento de neumococo resistente a la eritromicina se publicó en 1967 en Canadá, en una cepa procedente de un empiema (215). Inmediatamente se realizaron comunicaciones esporádicas (216, 217) comenzando en los 80 a apreciarse un aumento de la resistencia. En Francia por ejemplo, donde la resistencia era escasa antes de 1976, se alcanzó el 2,2% a finales de los 70 y el 26% en la década de los 90. (174, 218) En Hungría



los datos son todavía más llamativos, pasando del 10% en 1975 al 48,5% en el 1990 (219). Los datos de España señalaban tasas bajas de resistencia, 2,4% en el año 85 y 7% en el 89 (184), elevándose hasta el 27% en 2003, con una tendencia posterior a disminuir. Nosotros publicamos en 1992, una resistencia del 23% en adultos con infecciones invasoras y del 60% en niños portadores. (222).

El mecanismo de resistencia a macrólidos es debido sobre todo a los genes *ermB* y *mef*. El primero confiere alto nivel de resistencia a macrólidos, lincosaminas y estreptograminas por modificación de una metilasa, (fenotipo MLSB) y puede ser inducible o constitutivo, mientras que el segundo produce bajo nivel de resistencia (CMI menor16) a macrólidos de 14 y 15 átomos solo, (Fenotipo M), mediante un mecanismo de bomba de expulsión, con el gen *mef* (E) como más frecuente. En nuestro entorno predomina el fenotipo MLSB mientras que en USA y Canadá es más habitual el fenotipo M (221, 222, 223).

En los últimos años se ha incrementado la presencia de ambos mecanismos, preferentemente en países asiáticos, aunque también se ha hecho notar en Europa y USA (224, 225).

### Tetraciclina

El primer caso de resistencia a tetraciclina se publicó en Australia en 1963 (226). Al poco tiempo se detectaban brotes de cepas resistentes en dos hospitales de Liverpool (227). La emergencia de resistencias coincidió con el aumento del uso del fármaco, especialmente en pacientes con enfermedad pulmonar crónica.

En USA el primer aislamiento se documentó en 1964 (228). En la actualidad se ha producido un rebrote de resistencia comparado con el periodo previo a la vacunación (229).

En España la resistencia a comienzos de los 80 era del 67% (230), manteniéndose unos años después en un 72% (231,232), aunque en un estudio de Barcelona descendió al 37,6% (183). También en un multicéntrico de toda España ascendía al 60% en esa época. (233).

En la actualidad las cifras han bajado, 16% en un estudio comparativo español con otros seis antibióticos frente a ceftobiprole (234). También en otros sitios tan dispares como Nepal (235) 11%, Chile, 21% (236), Australia 11% (237) y norte de Alemania, 5%, (214), las cifras se mantienen bajas, aunque se haya producido un incremento en países donde se ha vacunado, o incluso sin la presencia de la vacuna (238).

La resistencia a tetraciclina va asociada frecuentemente a eritromicina porque los genes determinantes de ella van en los mismos transposones (239).

### Cloranfenicol

La resistencia a cloranfenicol es importante en países donde no se dispone de cefalosporinas de tercera generación, ya que es la alternativa para el tratamiento de las meningitis neumocócicas por cepas resistentes a penicilina.

En 1967 se conocieron las primeras resistencias en cepas de portadores nasofaríngeos (240) y en 1970 un aislado invasor en Polonia (241). Posteriormente se detectaron en las epidemias sudafricanas de 1977-1978 (172, 173).

España ha pasado por ser el país con más alto porcentaje de cepas resistentes, con más del 40% (242, 231), aunque posteriormente disminuyeron en el 90 hasta un 29% (243). En Hungría también se informaron tasas tan altas como las nuestras, 74,5% (178).

Actualmente se ha producido una disminución, informándose cifras muy bajas en sitios tan dispares como, Nepal 0,4% (235), Chile 7% (236) o Kuwait, 3,7% (238). También en países africanos encontramos tasas reducidas como en Tanzania 3,5% (244) o Marruecos, 8,1% (245). En otros sin embargo las resistencias son más altas como por ejemplo Malawi con un 27%. (246)

## VACUNAS

El primer intento por desarrollar una vacuna antineumocócica lo realizó Wrigh en 1911 efectuando un ensayo entre los mineros sudafricanos del oro (248). Este grupo tenía una tasa de ataque de neumonía neumococica muy alta, 100 casos por 100.000/ personas/año (247). El resultado no fue bueno al no tener en cuenta la diversidad de serotipos de la población estudiada. Unos años después se realizaron diversos ensayos entre los que destaca el de Cecil y Austin con más de 12.000 personas vacunadas (248).

En 1945 McLeod et al, demuestran la eficacia de una vacuna polivalente con cuatro polisacáridos capsulares, en un ensayo realizado en población militar con más de 8.000 casos entre vacunados y controles con placebo (249). De nuevo se comprueba

la eficacia de este tipo de vacuna en mineros sudafricanos, que evitaba la bacteriemia en un 80% y la neumonía en un 20% (250).

Con la llegada de la penicilina en 1940 (100), se olvidan un poco los trabajos con vacunas, por los buenos resultados obtenidos en el tratamiento de las infecciones neumococicas con el antibiótico.

En 1977 se comercializa la primera vacuna antineumococo a base de polisacáridos, constituida por 14 serotipos y posteriormente en el 83 la de segunda generación que abarca 23 serotipos (251,252). Desde el comienzo de su uso, las indicaciones permanecen en una constante controversia (253, 254). Inicialmente se demostró efectividad en comunidades cerradas como militares, mineros de Sudáfrica y grupos de Nueva Guinea (255, 256, 257). Posteriormente se recomendó para niños mayores de dos años con riesgo de infección como asplenia, anemia de células falciformes etc., y en adultos con factores de riesgo parecido, ampliando las indicaciones a alcohólicos, cirróticos, mieloma múltiple y fracaso renal. Las recomendaciones se fueron ampliando a personas sanas mayores de 65 años de edad y los portadores de VIH (258).

La eficacia de esta vacuna no ha sido fácil de comprobar porque los ensayos realizados en poblaciones concretas no se pueden extrapolar a otros con condiciones distintas, siendo necesarios grupos de estudio muy amplios para demostrar eficacia. (15,255, 259).

La vacuna no produce inmunidad duradera por lo que hay que repetir la administración a los cinco años (260,261). No tiene efecto protector en niños menores de dos años y en pacientes con inmunodeficiencias graves (262, 260, 263). En USA la vacuna se recomienda para personas mayores de 65 años y para individuos en riesgo entre los 2 y 64 años (51).

A pesar de las recomendaciones de la vacunación realizadas por la Organización Mundial de la Salud, el nivel de vacunación en la población general no ha alcanzado sus objetivos (264, 265). Recientemente se ha puesto en duda la eficacia de la vacuna en población anciana en el Reino Unido (266).

La vacuna PCV-7 comercializada en 2000, es una vacuna conjugada con una proteína que confiere inmunidad duradera y es efectiva en niños menores de dos años y personas inmunodeprimidas (51). Contiene siete serotipos que son los más prevalentes en infecciones invasoras en niños en USA (4,6B, 9V, 14,18C, 19F y 23F) (267). La vacunación es recomendada para niños menores de dos años y aquellos de 24 a 59 meses con factores de riesgo. En USA la vacuna cubría en el momento de la comercialización el 90% de los serotipos que causaban enfermedad invasora, pero estos números no se alcanzaban en otros países, como por ejemplo Escocia, donde la cobertura alcanzó el 76,5% de los casos de infección invasora en niños menores de cinco años (268) y todavía eran más bajos en países en desarrollo, cayendo la cobertura al 45% (269).

Desde la introducción de la PCV-7, la incidencia de meningitis bacteriemia y neumonía comenzó a descender tanto en niños como en adultos (190, 45, 270). El descenso en adultos fue estimable reflejando un efecto “herd” sobre la inmunidad (271, 272). Este efecto también se ha demostrado en lactantes menores de 90 días (273) y ha contribuido a hacer la vacuna coste-efectiva (274) y sin el cual no habría sido rentable en el Reino Unido, según un estudio de Melegaro (275).

Un meta análisis de nueve ensayos clínicos controlados de aplicación de PCV-7 en niños sanos menores de 2 años de edad,

demostraba eficacia en reducir también la otitis media aguda, cayendo la incidencia, 57% para serotipos vacunales y 29% considerando todos los serotipos. La incidencia de enfermedad invasora disminuyó un 89% para vacunales y un 64% para el conjunto. Sin embargo, al mismo tiempo que van desapareciendo los serotipos de la vacuna, se está produciendo un fenómeno de “reemplazamiento” por otros que no cubre, ocupando estos el nicho dejado por los primeros (276, 277, 189, 278, 124). En un estudio de vigilancia en USA se constató que la proporción de casos totales en todos los grupos de edad, causados por los serotipos no vacunales 11A, 16F, 19A, 22F, y 35B se incrementó significativamente entre 98-99 y 2004-2005. Este incremento fue más notable para el 22F y 19A. (279). Kellner et al., (280), obtuvieron resultados similares, poniendo de manifiesto una sustancial reducción de serotipos vacunales tanto en niños como en adultos, sugiriendo el comentado efecto “herd”. Al mismo tiempo la incidencia de los no incluidos en la vacuna se incrementó entre los adultos 183% y la incidencia total 73%.

En España la enfermedad invasora debida a los serotipos de la vacuna disminuyó, y paralelamente se elevó la causada por no vacunales, particularmente el 1 y 19A entre los años 96 y 2006 (184).

Dos nuevas vacunas han sido aprobadas, PHiD-CV y PCV-13, esta última para reemplazar a la PCV-7. La PHiD-CV (Glaxo), incluye dos tipos de polisacáridos conjugados a toxoide diftérico, 19F, o tetánico, 18C, y otros ocho 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 23F conjugados a NTHi proteína D (no tipable *Haemophilus influenzae*) (281), esto último con intención de prevenir la otitis media aguda por

*Haemophilus influenzae* no tipable y por tanto buscando un mayor coste-eficacia.

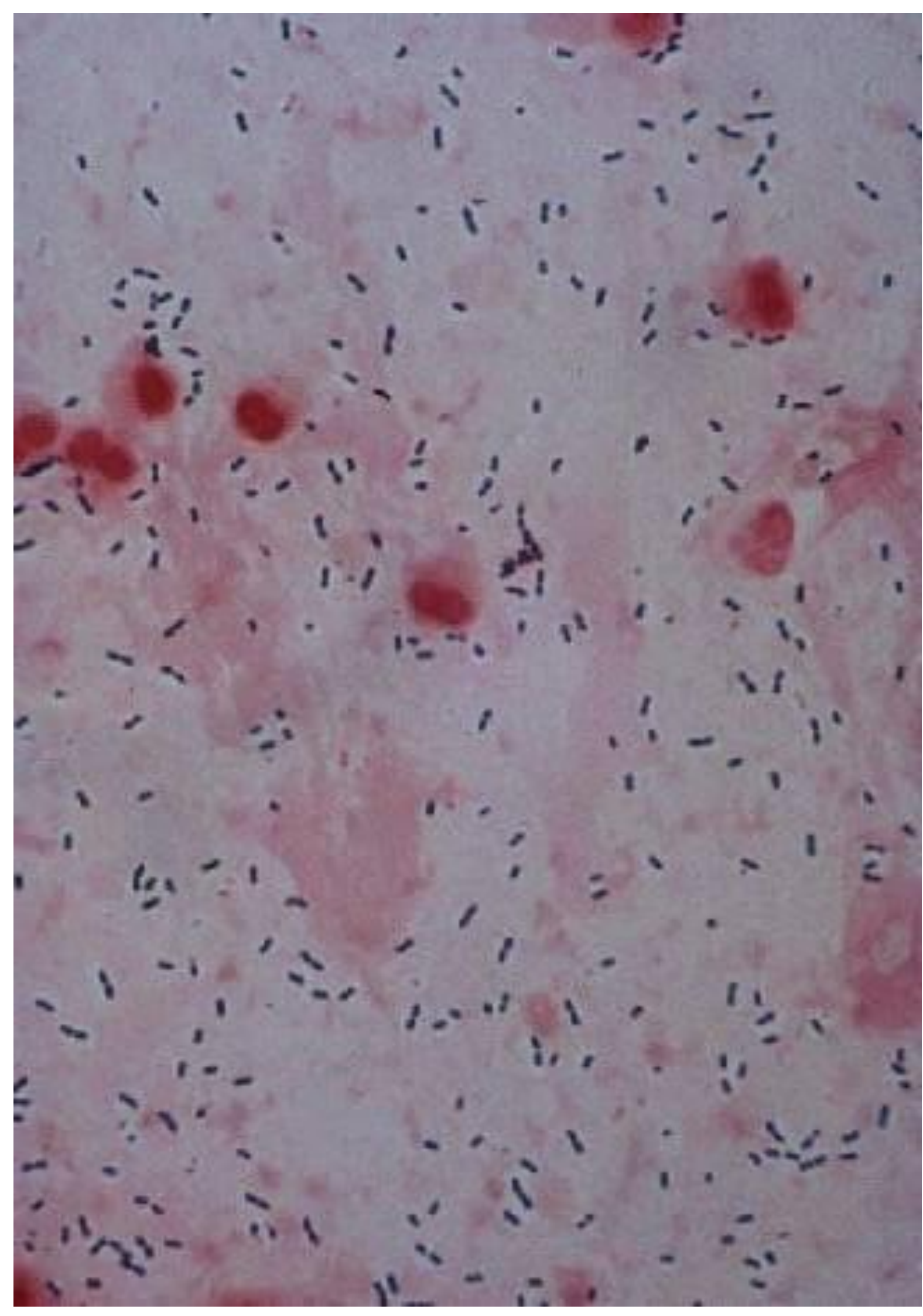
La PCV13 desarrollada por Wyet-Pfizer, tiene como dianas los diez de la de Glaxo, más tres serotipos adicionales, conjugados todos a toxoide diftérico (282).

Ninguna de las dos nuevas vacunas cubren el serotipo 22F que ha emergido en algunos lugares de forma notable en niños menores de dos años, como por ejemplo ha sucedido en el Reino Unido (272). La vacuna de Glaxo tampoco protege del serotipo 19A uno de los que más ha aumentado en numerosos países entre los que se encuentra España y que además presenta una elevada resistencia antibiótica. (283, 284,130)

En 2011 Skinner et al., (285) publicaron los resultados de un ensayo llevado a cabo en monos con una nueva vacuna de 15 serotipos que añade a la PCV13 el ya mencionado y emergente 22F y el 33F del que también hay datos que apuntan a un posible incremento y a una elevada capacidad invasora (286).







# OBJETIVOS

Los objetivos de nuestra Tesis fueron los siguientes:

## Primera parte: Neumococos Invasores

- 1º Conocer la evolución de los neumococos invasores circulantes en nuestro entorno y su posible variación, tras la comercialización de la vacuna conjugada heptavalente para niños, a partir del año 2001.
- 2º Vigilar las resistencias frente a los antibióticos y su evolución desde hace dos décadas, para mantener al día las mejores opciones terapéuticas.
- 3º Medir la cobertura de la nueva vacuna con trece serotipos que comenzó a utilizarse al final de nuestro trabajo.

## Material y Método

La primera parte de la Tesis se desarrolló a lo largo del tiempo comprendido entre los años 1993 y 2010, exceptuando el año 2004. Durante ese periodo todos los neumococos invasores aislados en el hospital Virgen de la Arrixaca se enviaron al Centro Nacional de Microbiología de Majadahonda, Madrid (lab. de neumococos, Dr<sup>a</sup> Fenoll), para incluirlos en el programa Nacional de Vigilancia. Allí se serotiparon todas las cepas y se nos notificaron los resultados periódicamente, archivándose los resultados en nuestro sistema informático. Al mismo tiempo en nuestro laboratorio se identificaban fenotípicamente los aislados y se determinaba la sensibilidad antibiótica con el sistema de que disponíamos en cada momento, entregando los resultados al clínico correspondiente. Simultáneamente y a partir de una resiembra fresca de 24h en agar sangre, las cepas se guardaron en medio de leche descremada (skin milk, Difco) a -80°.

### MUESTRAS

Se incluyeron en el estudio todos los aislamientos de neumococo obtenidos a partir de cavidades habitualmente estériles. Solamente se contabilizó una cepa por paciente aunque se recuperara el neumococo de distintas muestras, considerando en orden preferente, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, sangre y otras.

## IDENTIFICACION BACTERIANA

La identificación de los aislamientos de *S. pneumoniae*, se realizó utilizando las pruebas habituales:

Aspecto macroscópico en agar sangre

Prueba de la catalasa

Test de la optoquina

Solubilidad en sales biliares

Aglutinación de látex en caso de necesidad

## SEROTIPIA

La serotipia se realizó en el Centro de Referencia indicado anteriormente, utilizando la técnica de Quellung o hinchazón capsular.

## PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

Todos los neumococos guardados a  $-80^{\circ}$ , fueron sometidos a un nuevo test de susceptibilidad, esta vez con un método único, mediante tiras de E-test para los antibióticos más representativos, penicilina, cefotaxima y eritromicina y con discos para difusión en agar para los otros antibióticos, tetraciclina y cloranfenicol.

El estudio de sensibilidad se realizó por el método de difusión de gradiente en medio sólido mediante tiras de E-test (bio-Merieux) en

placas de Muller-Hinton sangre, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Brevemente, Tras dos resiembras de la cepa a testar en agar sangre de caballo, se preparó un inóculo equivalente a 0,5 de la escala de Mc Farland. Se sumergió una torunda en la suspensión exprimiendo el contenido en las paredes del tubo y posteriormente se sembró en sábana en una placa de Muller-Hinton sangre en tres direcciones. Tras dejar secar unos minutos se colocaron tiras de test de penicilina eritromicina y cefotaxima. En otra placa igual se aplicaron discos de los restantes antibióticos ensayados (tetraciclina y cloranfenicol). Ambas placas se incubaron en CO<sub>2</sub> a 37°C durante 24h. Las lecturas se hicieron midiendo los puntos de corte de las tiras o discos siguiendo las recomendaciones del CLSI 2010 (287), para su interpretación.

Como cepa control se utilizó *S. pneumoniae* ATTC 49619 de forma habitual en los distintos días en que se realizaron las pruebas. Para penicilina eritromicina y cefotaxima se aproximó la lectura a la dilución doble siguiente, en caso necesario.

Puntos de corte: Normas 2010 CLSI (287).

Penicilina; sensible CMI\*= $\leq$ 0,06, intermedio CMI 0,1-1, resistente CMI= $\geq$ 2

Eritromicina; sensible CMI= $\leq$ 0,25, intermedio CMI=0,5, resistente CMI= $\geq$ 1

Cefotaxima; sensible CMI= $\leq$ 0,5, intermedio CMI=1, resistente CMI= $\geq$ 2

CMI\* concentración mínima inhibitoria, (microgramos/ml).

Tetraciclina: sensible= $\geq$ 23, intermedio 19-22, resistente= $\leq$ 18

Cloranfenicol; sensible $\geq$ 21, resistente= $\leq$ 20. Halos medidos en milímetros.

Cepas aisladas

Un total de 367 cepas procedentes de muestras invasivas se enviaron al laboratorio de Centro nacional de Microbiología de Majahonda para su serotipado.

El resultado de las restantes 16, procedentes de líquido pleural, se obtuvo mediante la realización de PCR directamente sobre la muestra por un método comercial siguiendo las instrucciones del fabricante (Smart-Cycler Izasa), confirmándose posteriormente en el laboratorio del Hospital S. Juan de Dios en Barcelona (Dra. Muñoz-Almagro).

Hasta la aparición de la vacuna conjugada heptavalente, 2001, enviamos al centro de referencia otras cepas de neumococos procedentes de muestras no invasoras, incluyendo 132 nasofaríngeas para serotipado, que nos permiten ahora compararlas con las actuales, después de realizar la susceptibilidad antibiótica junto con las cepas invasoras.

## CARACTERISTICAS DEL HOSPITAL

El hospital Universitario Virgen de la Arrixaca está dotado de 873 camas, 544 para adultos en un pabellón general, 140 en el maternal y 179 en el pabellón infantil. Atiende a una población ambulatoria aproximada de 400.000 personas siendo hospital de referencia para toda la Región de Murcia en diversas especialidades médico-quirúrgicas, tales como Neurocirugía,

Unidad de Quemados, Cirugía Cardiovascular y Unidad de Trasplante.

Atiende además a la población pediátrica de otros hospitales del entorno que carecen de este Servicio.

El Servicio de documentación de nuestro centro nos facilitó los datos de población pediátrica que cubre, además de la suya propia. En el año 2000, un total de 94518 niños, que en 2010 ascendió a 119201.

## METODO ESTADISTICO

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

Las comparaciones entre grupos y las relaciones entre datos cualitativos se realizaron mediante un análisis de tablas de contingencia con el test de la  $\chi^2$ .

De Pearson, complementado con un análisis de residuos para ver el sentido de la diferencia/ dependencia.

Cuando el número de casos era insuficiente los valores de la significación (p) se obtuvieron aplicando el test exacto de Fisher (TEF).

# RESULTADOS

## SEROTIPOS

Durante el periodo de estudio se serotiparon 383 aislados de *S. pneumoniae*, 230 procedentes de adultos y 153 procedentes de niños. De los 41 serotipos distintos responsables de los cuadros invasores, 7 agrupaban el 54% de aislamientos. Considerando la serie completa los más frecuentes fueron 14, (43 cepas) ,19A, (36), 3 (32), 7F (29) y 19F (26). En el grupo de niños, el orden fue 19A, 14 y 7F. En cuanto a adultos 3, 14, y 19F encabezaron los aislamientos. Tablas 1, 2 y 3.

Un 53,7% de las cepas previas a la vacunación procedentes de niños, estaban incluidas en la PCV-7, observándose un descenso significativo hasta el 27,55% ( $p < 0,001$ ) y los 6 que añade la PCV-13 experimentaron un aumento espectacular del 25,92% al 60,20%,  $p < 0,00005$ . Tabla 4.

En cuanto a los adultos el panorama fue similar, descenso marcado de los PCV-7 del 43.13% al 17.94% ( $p < 0,0001$ ) y más moderado de los no vacunales, con un fuerte incremento en los complementarios de la PCV13 desde el 16,99% hasta 48,71% ( $p < 0,00001$ ). Tabla 5. En conjunto todos los de la PCV-13 aumentaron y los no vacunales disminuyeron, Tabla 6.

Si comparamos las cifras prevacunales con las de los últimos cuatro años, el descenso en serotipos de la primera vacuna fue todavía más acusado, 53,7% a 14,28% en niños, ( $p < 0,0001$ ) y 43,13 a



10,34 en adultos ( $p < 0,00005$ ). Paralelamente los 6 serotipos de la PCV-13 aumentaron al 70,0 y 60,34 respectivamente. Tablas 7 Y 8.

Por serotipos los más frecuentes antes de 2001 fueron los incluidos en la vacuna tanto en adultos, 14, 19F, 23F y 9V, como en población pediátrica 14, 6B y 18C, con ausencia en este caso del 9V. Tras la vacunación, en el tramo final especialmente, se produjo un cambio considerable en el orden de aislamientos, el 19A fue el primero en niños seguido de 14, 1, 7F y 3 y en los mayores 7F, 19A ,3 y 6A. Tablas 11 y 12.

En el periodo anterior a la vacunación, de 207 aislamientos, 95 estaban incluidos en la vacuna PCV-7, 45,8% de cobertura, descendiendo al 23,2% entre 2002 y 2010 y al 12,5% si solo consideramos el tramo final de estudio 2007-2010, con desaparición de 3 serotipos vacunales, 4, 6B y 9V y escasísima presencia del 23F (2 cepas) y 18C, (1 cepa). Paralelamente los serotipos no vacunales (incluidos los 6 complementarios de la PCV-13), iniciaron un recorrido inverso, antes de 2001 representaban el 54% y en conjunto en el segundo periodo aumentaron hasta el 76,7%. La diferencia es más alta si consideramos solo los últimos cuatro años, 88,8%. Esto es, en 2010 la utilidad de la PCV-7 era prácticamente marginal respecto de la población total, 12,5%, y también si solo consideramos el grupo pediátrico, 10 de 70 cepas, lo que supone un 14,28%, o el de adultos 10,34%. Tablas 7, 8, 9 y 10.

La nueva vacuna comercializada en 2010 que añade 6 serotipos a la anterior, habría conseguido una cobertura del 65,2% en el primer periodo y un 78,4% sobre las 176 cepas del segundo periodo. Tabla 9. En el momento de su comercialización, esta vacuna cubría el 78,1% de las infecciones producidas en los cuatro últimos años,

Tabla 10, con sensibles variaciones entre niños 84,28% y adultos 70,68%. Tablas 7 y 8.

En la era prevacunal el porcentaje de aislamientos entre los de la PCV-7, los seis que añade la PCV-13 y los no vacunales fue 45,8%, 19,4% y 34,7% respectivamente, pasando a cifras de 23,2%, 55,2% y 21,5%, tabla 9, en el conjunto del segundo periodo. Si solo contamos los cuatro últimos años del estudio los datos son todavía más significativos, 12,5%, 65,6% y 21,8% respectivamente. Esto supone un incremento para los seis serotipos nuevos añadidos a la vacuna primitiva y un descenso en conjunto de los siete incluidos en esta, estadísticamente significativos ( $p < 0,001$ ). Tabla 10.

Los serotipos responsables de infecciones invasoras que escapan a la protección de las dos vacunas están muy repartidos. Considerando solo la primera fase, encontramos 19 serotipos para 72 cepas, destacando el 12 con doce aislamientos y el 8 y 23A con nueve cada uno. El resto aportan en todos los casos seis o menos cepas. Tabla 3. En la segunda parte los 38 (cuatro de ellos no determinados según PCR) aislados no cubiertos, se distribuyen en 20 serotipos, con un número muy bajo de cepas cada uno, siendo el 9N el único que llama la atención porque además de ser el más frecuente (5 cepas), todas se obtuvieron entre 2007 y 2010. También es de destacar la desaparición del 11 durante este periodo. Tabla 3.

Las variaciones para serotipos ocurridas entre las dos épocas están recogidas en las tablas 11 y 12. Las diferencias más significativas las encontramos en el serotipo 19A que pasó del 1,4% antes del 2001 al 23,4% en el periodo final ( $p < 0,00005$ ) y el 7F del 2,89% al 17,1% ( $p < 0,0005$ ), respecto de los que aumentaron en frecuencia. Los descensos más pronunciados se dieron en el 19F del 9,6% al

2,3% ( $p < 0,01$ ) y el 23F del 7,2% al 1,5% ( $p = 0,021$ ). El serotipo 4 desapareció en el periodo postvacunal y 9V y 6B lo hicieron entre 2007 y 2010. El 18C disminuyó del 5,3% al 0,7% ( $p = 0,03$ ) y el 14 se mantuvo a lo largo del estudio sin cambios, aunque con un ligero declinar.

# SEROTIPOS INVASORES Y VACUNAS

PCV-7 4 6B 9V 14 18C 19F 23F TOTAL

	4	6B	9V	14	18C	19F	23F	TOTAL
Adultos	6	3	11	21	7	18	14	80
Niños	1	9	2	22	7	8	7	56
Total	7	12	13	43	14	26	21	136

PCV-13 1 3 5 6A 7F 19A TOTAL NV TOTAL

	1	3	5	6A	7F	19A	TOTAL	NV	TOTAL
Adultos	7	22	2	7	15	11	64	86	230
Niños	13	10	3	8	14	25	73	24	153
Total	20	32	5	15	29	36	137	110	383

# Serotipos no vacunales

Serotipos	17	21	22	25	28	31	33	10A	11	12	13	15	15A	15BC
<b>Niños</b>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0
<b>Adultos</b>	1	1	2	1	1	1	3	4	8	11	1	3	3	4

Serotipos	17F	20	22F	23A	23B	24	33F	34	35	35B	35F	42	6C	8	9N
<b>Niños</b>	0	1	1	3	2	3	1	1	0	0	1	1	0	2	2
<b>Adultos</b>	1	3	0	8	0	3	0	3	1	1	1	0	1	10	8

TABLA2

# Serotipos no vacunales periodos

Serotipos	17	21	22	25	28	31	33	10A	11	12	13	15	15A	15BC
<2001	1	0	2	0	1	0	3	3	6	12	1	3	4	2
>2001	1	1	0	1	0	1	0	1	2	0	0	0	1	2

Serotipos	17F	20	22F	23A	23B	24	33F	34	35	35B	35F	42	6C	8	9N
<2001	0	4	0	9	0	4	0	1	1	0	0	1	0	9	5
>2001	1	0	1	2	2	2	1	3	0	1	2	0	1	3	5

TABLA3

# Serotipos y vacunas

## Niños

<2001

>2001

54 cepas

98 cepas

%

P

PCV-7

29

53,70

27

27,55

0,001

6 PCV-13

14

25,92

59

60,20

0,00005

Total V

43

79,62

86

87,75

NS

NV

11

20,37

12

12,24

NS

TABLA4

# Serotipos y vacunas

## Adultos

<2001

>2001

	153 cepas	%	78 cepas	%	P
PCV-7	66	43,13	14	17,95	<0,00014
6 PCV-13	26	16,99	38	48,71	<0,00001
Total V	92	60,12	52	66,66	NS
NV	61	39,87	26	33,33	NS

TABLA5



# Serotipos y vacunas

Por periodos

<2001

>2001

207 cepas

%

176 cepas

%

p

PCV-7

95

45,89

41

23,29

<0,001

6- PCV-13

40

19,32

97

55,11

<0,001

Total PCV-13

135

65,21

138

78,40

<0,001

INV

72

34,78

38

21,59

<0,001

TABLA6

# Serotipos y vacunas niños

	<b>&lt;2001</b>		<b>2007-2010</b>		<b>P</b>
	<b>54 cepas</b>	<b>%</b>	<b>70 cepas</b>	<b>%</b>	
<b>PCV-7</b>	<b>29</b>	<b>53,70</b>	<b>10</b>	<b>14,28</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>PCV-13</b>	<b>43</b>	<b>79,62</b>	<b>59</b>	<b>84,28</b>	<b>NS</b>
<b>NV</b>	<b>11</b>	<b>20,37</b>	<b>11</b>	<b>15,71</b>	<b>NS</b>

# Serotipos y vacunas adultos

	<b>&lt;2001</b>		<b>2007-2010</b>		<b>P</b>
	<b>153 cepas</b>	<b>%</b>	<b>58 cepas</b>	<b>%</b>	
<b>PCV-7</b>	<b>66</b>	<b>43,13</b>	<b>6</b>	<b>10,34</b>	<b>&lt;0,00005</b>
<b>PCV-13</b>	<b>92</b>	<b>60,12</b>	<b>40</b>	<b>70,68</b>	<b>NS</b>
<b>NV</b>	<b>61</b>	<b>39,87</b>	<b>17</b>	<b>29,31</b>	<b>NS</b>

TABLA8

# Cobertura Vacunal Serotipos Invasores

	<b>&lt;2001</b>	<b>&gt;2001</b>	<b>P</b>
	<b>207 cepas</b>	<b>176 cepas</b>	<b>%</b>
	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
PCV-7	<b>95</b>	<b>41</b>	<b>&lt;0,001</b>
6 PCV-13	<b>40</b>	<b>97</b>	<b>&lt;0,001</b>
Total V-13	<b>135</b>	<b>138</b>	<b>&lt;0,001</b>
NV	<b>72</b>	<b>38</b>	<b>&lt;0,001</b>

TABLA9

# Cobertura Vacunal

## Serotipos Invasores

	<b>&lt;2001</b>	<b>2010</b>	<b>p</b>
	<b>207 cepas</b>	<b>128 cepas</b>	<b>%</b>
	<b>%</b>		
PCV-7	<b>95</b>	<b>16</b>	<b>12,50</b>
	<b>45,89</b>		<b>&lt;0,001</b>
6 PCV-13	<b>40</b>	<b>84</b>	<b>65,62</b>
	<b>19,32</b>		<b>&lt;0,001</b>
Total PCV-13	<b>135</b>	<b>100</b>	<b>78,12</b>
	<b>65,21</b>		<b>&lt;0,001</b>
NV	<b>72</b>	<b>28</b>	<b>21,87</b>
	<b>34,78</b>		<b>&lt;0,001</b>

TABLA10

# Serotipos PCV-13

## Evolución

Serotipo	<2001		2010		P
	207 cepas	%	128 cepas	%	
1	6	2,8	8	6,2	NS
3	14	6,7	16	12,5	NS
5	5	2,4	0	0	NS
6A	6	2,8	8	6,25	NS
7F	6	2,8	22	17,1	<0,0005
19A	3	1,4	30	23,4	<0,00005

TABLA11

# Serotipos PCV-7

## Evolución

Serotipo	<2001		2010		P
	207 cepas	%	128 cepas	%	
4	7	3,3	0	0	0,03
6B	10	4,8	2	1,1	<0,015
9V	9	4,3	0	0	0,015
14	23	11,1	10	7,8	NS
18C	11	5,3	1	0,7	0,033
19F	20	9,6	3	2,3	0,01
23F	15	7,2	2	1,5	0,021

TABLA12

## MENINGITIS

Durante el periodo de estudio se diagnosticaron 66 meningitis, todas ellas por cultivo, lo que supuso un 17,2% de todos los procesos invasores. La tabla 1-meningitis, muestra los datos por periodos y la distribución entre niños y adultos. Antes de 2001 se produjeron 44 episodios, 34 en adultos y diez en niños, disminuyendo significativamente el número de casos, 22, producidos por 14 serotipos, en el periodo postvacunal y variando a la vez sustancialmente la proporción a favor de los niños, 13 adultos frente a 9 niños.

La incidencia antes de 2001 fue 1,2 para la población infantil disminuyendo ligeramente en el periodo final 2007-2010 a 1,04, Antes de la vacunación con la PCV-7, 19 de las 44 meningitis, 43,1%, fueron ocasionadas entre los 7 serotipos de la vacuna, reduciéndose la cifra después de 2001 a 5 de 22, 22,7%. ( $p > 0,05$ ).

Los seis serotipos adicionales que cubre la PCV-13, produjeron 4 de los 44 casos, 9%, antes y 10 de 22, 45,4%, después. ( $p < 0,001$ ). Los serotipos que no cubren ninguna de las dos vacunas, disminuyeron del 47,7%, (21 de 44) al 31,8%, (7 de 22) pero sin significación estadística.

Considerando solo los aislamientos del segundo periodo, la cobertura de la PCV-7 alcanzaría el 22,7%, mientras que la nueva PCV-13 se elevaría a 68,18%.

En cuanto a las resistencia frente a los antibióticos, Tabla 2 meningitis, aplicando los criterios del CLSI de 2010, penicilina R ( $CMI > 0,06$ ), disminuyó del 43,18% al 33,6% ( $p > 0,05$ ), no aislándose ninguna cepa con  $CMI \geq 2$  en la segunda época.



La cefotaxima antes de la utilización de la vacuna heptavalente presentó unas cifras elevadas de cepas no susceptibles (CMI>0,5), 22,72, reduciéndose al 9,09% en periodo postvacunal, tendencia que no alcanzó significación estadística.

Los serotipos responsables de la resistencia frente a penicilina fueron cinco de los vacunales (6B, 14, 9V, 19F y 23F) en la primera época, además del 24 y 15. En el segundo periodo persistían representantes del 14 y 19F, apareciendo mayoritariamente nuevos serotipos, 19A, 15BC, 6A y 35B no cubiertos por la vacuna heptavalente

La resistencia a cefotaxima en los 10 casos registrados antes de 2001 se debió a los serotipos 23F, 19F, 14, 9V y 6A. Los dos casos de la segunda época, ambos de adultos, estaban producidos por 19A y 19F.

El relativamente bajo número de casos, 66, y su reparto entre 27 serotipos, deja pocas posibilidades de comentario sobre serotipos individuales. No obstante, puede destacarse que los nueve aislamientos pertenecientes al 12 y 20 (5, todos en adultos, y 4 casos respectivamente), se produjeron en el periodo prevacunal, al contrario que los cuatro aislamientos del serotipo 19A, que tuvieron lugar en el periodo postvacunal. Tablas 3 y 4 meningitis.

# Meningitis Según vacunas

<2001

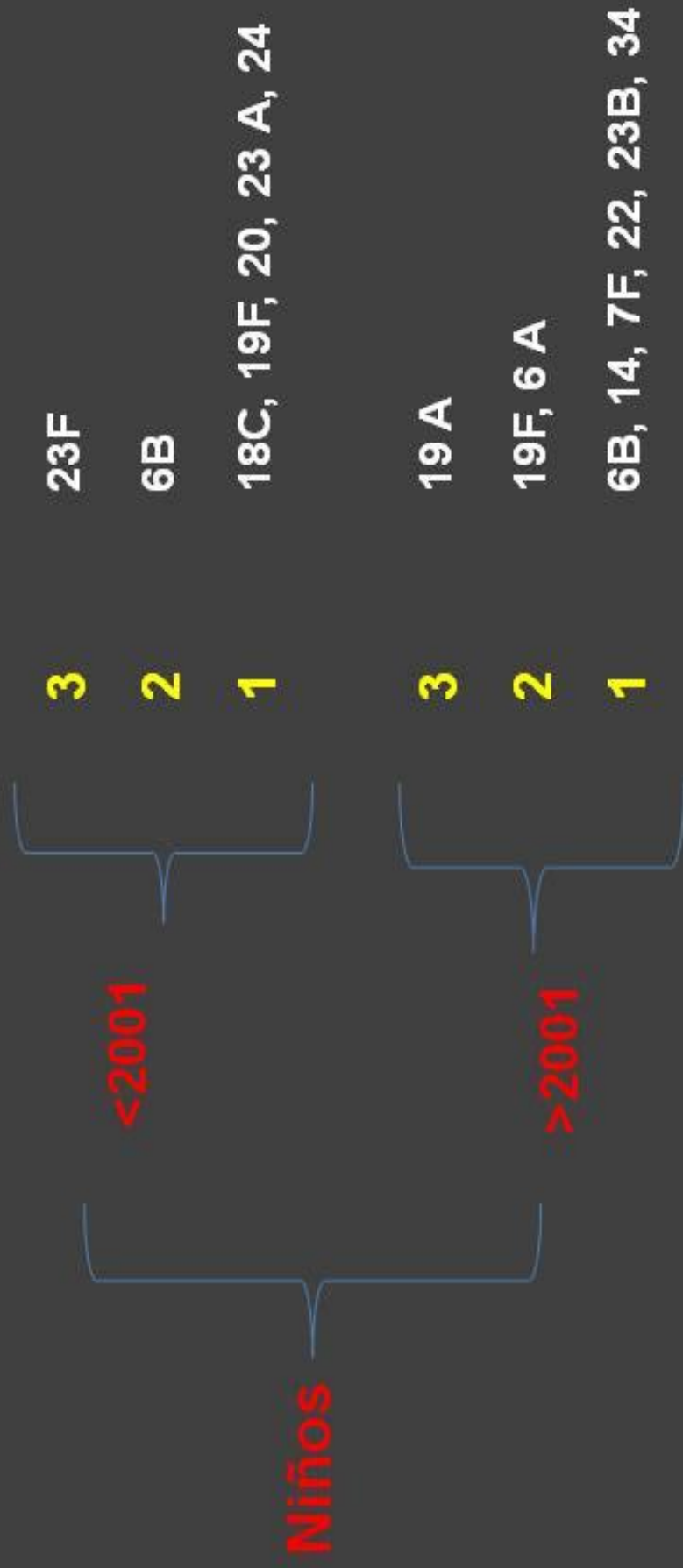
>2001

	Niños	Adultos	Total	Niños	Adultos	Total	P
PCV-7 (22cepas)	7	12	19	4	1	5	NS
PCV-13	0	4	4	6	4	10	<0,001
NV (28cepas)	3	18	21	3	4	7	NS
	<b>10</b>	<b>34</b>	<b>44</b>	<b>13</b>	<b>9</b>	<b>22</b>	

# Meningitis resistencias

	<2001		>2001		p
	44 cepas	%	22 cepas	%	
Peni I	2	4,5	0	0	0,549
Peni R	17	38,63	8	33,6	0,858
CTX	10	22,72	2	9,09	0,310

# Meningitis serotipos



# Meningitis serotipos

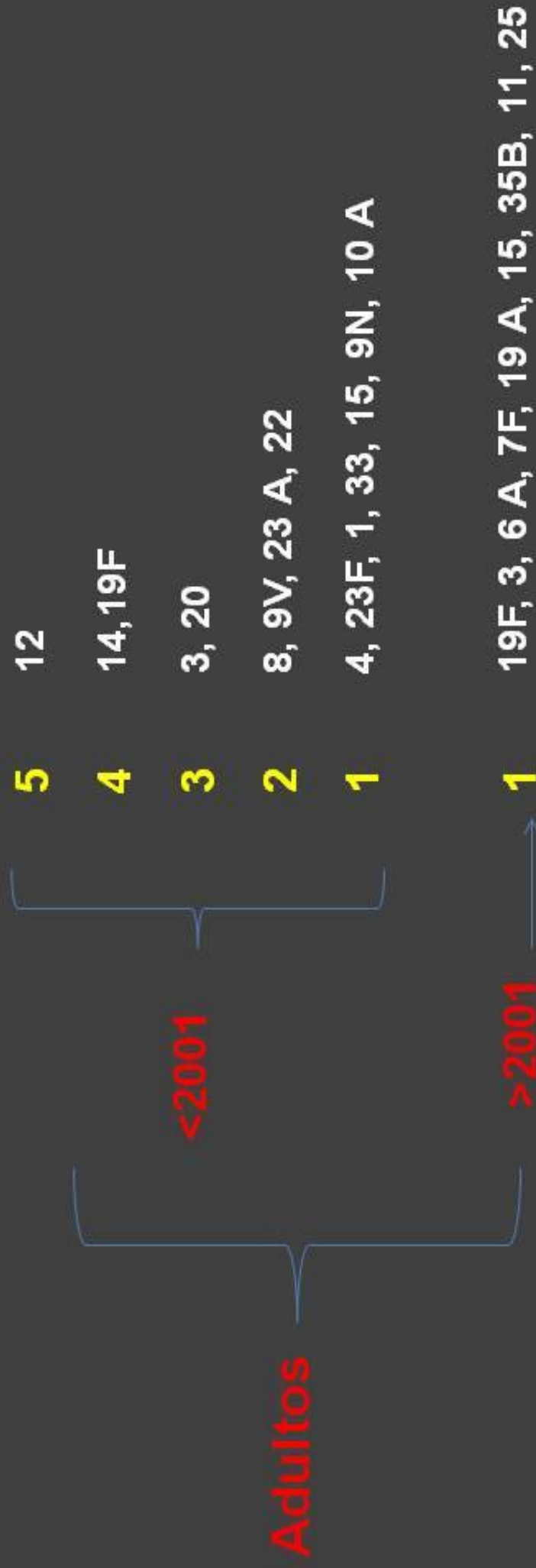


TABLA4

## EMPIEMA PLEURAL

Se aislaron un total de 55 neumococos a partir de muestras de líquido pleural a lo largo del estudio. De ellos 33 procedían de población pediátrica y 22 de adultos. La proporción a lo largo del tiempo varió en el caso de los niños, en los que solamente cuatro muestras positivas fueron procesadas antes de 2002, a pesar de que en ese periodo los envíos al Centro Nacional de Microbiología se realizaron de manera masiva, con un número muy alto de muestras que incluían portadores nasofaríngeos, esputos, exudados conjuntivales etc. además de las muestras de infecciones invasoras. Por el contrario, después de 2001 se incrementó el número de muestras con aislamiento o PCR positivos en niños, pasando de los 4 anteriores a 29.

En adultos sin embargo, no hubo variaciones, 12 casos antes y 10 después.

En la tabla empiema-1, puede observarse la distribución de aislamientos por periodos edad y serotipos. En la época prevacunal 8 de 16 cepas estaban incluidas entre los que cubre la PCV-7 y en la segunda por el contrario solo 3 de las 39 , dos del serotipo 14, y una del 9V todas en niños , con una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ). La presencia de aislados de los 6 serotipos complementarios de la PCV-13 aumentó de 5 de 16 a 31 de 39 ( $p < 0,01$ ), entre las dos épocas.

La tasa de incidencia de empiema en niños aumentó notablemente cuando comparamos los datos del periodo 96-2000, incidencia 0,63/100.000 personas/año, con el de 2007-2010, 5,45 por 100.000/personas/año, considerando el área de influencia de nuestro hospital  $p < 0,001$ . Si no contamos los diagnósticos

conseguidos por PCR, la incidencia en este periodo hubiera aumentado también, pero hasta 2,93. El incremento fue debido a los serotipos complementarios de la PCV-13 que pasaron de 4 a 31 casos,  $p < 0,001$ .

El serotipo que se aisló con mayor frecuencia fue el 19A con 14 cepas, produciéndose el primer aislamiento en 2003, con un notable incremento a partir de 2007 en que se consiguieron las 13 restantes. ( $p < 0,001$ ). En segundo lugar aparece el serotipo 3 con 11 aislamientos, que se obtuvieron a lo largo de todo el estudio sin variaciones reseñables. Las cuatro cepas del serotipo 1, dos de adultos y dos de niños, se recuperaron en la era posvacunal y el primer aislamiento tuvo lugar en 2007. Tablas 2 y 3 empiema.

Como se ha comentado en el apartado de material y métodos, empleamos la técnica de PCR en 16 líquidos pleurales, resultando todos ellos positivos a pesar de tener el cultivo previo negativo y se confirmaron como positivos en el Servicio de Microbiología del hospital San Juan de Dios en Barcelona (Dra. Muñoz-Amagro), donde también se determinó el serotipo mediante técnicas moleculares. De los 16 casos, 3 procedían de muestras de adultos y 13 de niños. Los serotipos encontrados fueron 19A, 3, 7F y 1 todos de la PCV-13 y no vacunales (4 cepas).

# EMPIEMA Y VACUNAS

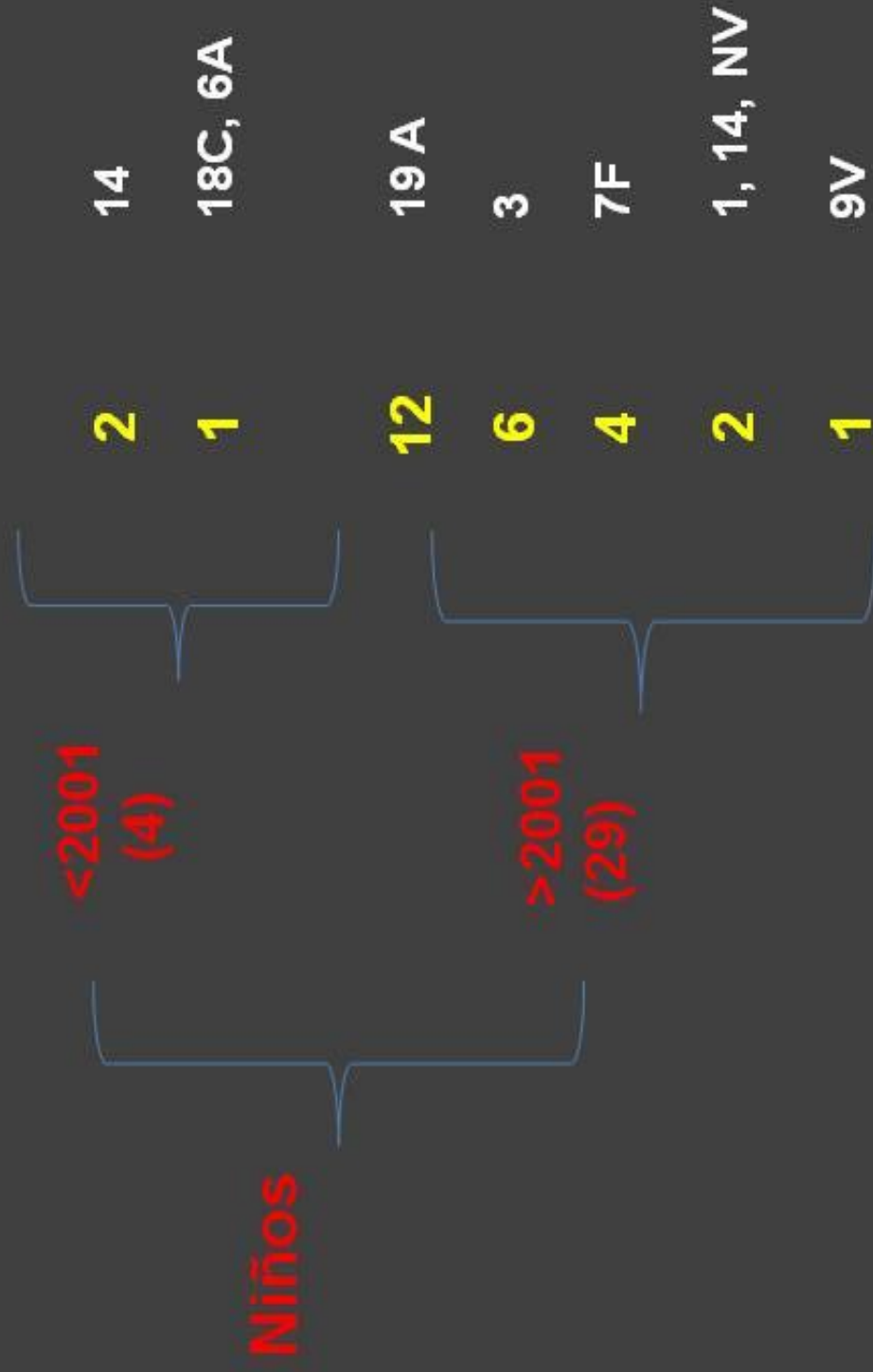
n° aislados

% PCV-7 PCV-13 N/V Total

	Adultos	5	4	3	12
<2001	Niños	3	1	0	4
	Total	8	5	3	16
	Adultos	0	7	3	10
>2001	Niños	3	24	2	29
	Total	3	31	5	39



# Empiema y serotipos



# Empiema y serotipos

<b>3</b>	<b>23F, 3</b>
<b>2</b>	<b>15 A</b>
<b>1</b>	<b>4, 19F, 7F, 33</b>
<b>2</b>	<b>1, 3, NV, 19 A</b>
<b>1</b>	<b>7F, 19N</b>

**<2001  
(12)**

**>2001  
(10)**

**Adultos**

## INFECCION INVASORA

De los 383 neumococos controlados durante las dos décadas, 258 procedían de sangre, 66 de líquido cefalorraquídeo, 55 de líquido pleural, 2 de humor acuoso 1 de líquido articular y 1 de líquido ascítico.

En el periodo anterior a 2001 se aislaron 207 cepas y en el posterior 160, además de 16 identificadas por pruebas moleculares. Considerando el periodo final de estudio 2007- 2010 el número de neumococos recuperados fue 128, de los que 16, procedentes de líquido pleural, carecían de antibiograma por haberse diagnosticado por PCR.

La incidencia global calculada para el periodo 96-2000 fue de 8,3/100.000/ personas año, aumentando a 9,5 en el periodo 2007-2010. Sin embargo si deshechamos los 16 diagnósticos conseguidos por PCR en esta fase, el incremento fue más leve, quedando la cifra total en 8,5/100.000/personas/año.

Los serotipos vacunales PCV-7 representaban en el primer periodo casi el 40%, pasando al 14% en el segundo.

## RESISTENCIAS DE SEROTIPOS INVASORES

De las 383 cepas invasoras recuperadas durante el estudio, 367 se consiguieron por aislamiento en cultivo y 16 se identificaron por PCR, por lo que los datos de resistencia están referidos a 367 cepas.

## Penicilina

Para calcular los datos de resistencia tomamos como referencia las normas del CLSI de 2010, que introducen variaciones importantes si tenemos en cuenta los datos para penicilina oral, Susceptible  $\leq 0,06$ , Intermedio  $0,12-1$  y Resistente  $\geq 2$  mcg/ml, o parenteral, S  $\leq 2$ , I  $= 4$  y R  $\geq 8$  mcg/ml., quedando esta última equiparada a la amoxicilina. Desde un punto de vista práctico consideraremos los puntos de corte para penicilina oral como referencia para expresar los resultados ya que así vienen reflejados tradicionalmente en las publicaciones, pudiendo de ese modo establecer comparaciones. En la discusión comentaremos los resultados desde ambas indicaciones para dar un enfoque más práctico a los datos.

Considerando las 367 cepas disponibles de todo el periodo estudiado, un 42,77% fueron resistentes a penicilina, 36,78% con resistencia moderada y 5,99% alta. Tabla 1. Las cifras resultantes no estuvieron presentes en igual proporción en las dos fases. En la prevacunal, 36,71% y 7,72% con resistencia moderada y alta respectivamente y en la postvacunal 36,87% y 3,75%, con diferencias no significativas, Tabla 2A.

En función de la edad o tampoco encontramos diferencias, los resultados para adultos fueron, moderada 35,96%, alta 5,26% y para niños 38,12 y 7,19 respectivamente. Tabla 3.

Si comparamos por periodos, antes de 2001, en adultos, el porcentaje de intermedios quedó en 35,29 y para los niños 40,7 y el de resistentes 7,18 y 9,2 respectivamente, sin diferencias apreciables. Tablas 4 y 5. En el periodo posterior la cepas moderadamente sensibles suponían el 37,3% y 36,4% y las de resistencia alta 1,3 y 5,8 respectivamente.

Entre los aislados de la primera época y los del periodo final 2007-2010, la resistencia mostró una tendencia al alza de 36,7 a 38,39 para los neumococos con resistencia moderada y a la baja para aquellos con  $CMI > 1$ , 7,5 a 3,5 pero en ambos casos con una  $p > 0,05$ . Tabla 2B.

La proporción de cepas resistentes de los serotipos de la PCV-7 y los no vacunales no varió entre las dos épocas, sin embargo se observó un incremento significativo en los 6 complementarios de la PCV-13 del 2,8% al 31,76%,  $p = 0,0007$ . Tabla 6.

La resistencia a penicilina debida a los serotipos vacunales disminuyó y la de los complementarios aumentó de forma significativa,  $p < 0,0001$ , en ambos casos. En la primera fase detectamos 92 aislados no susceptibles a penicilina, de los cuales el 83,7% correspondía a serotipos de la PCV-7, 1,08% a los seis de la PCV-13 y el resto, 14,13% a los no vacunales. En la segunda fase 65 cepas presentaban la misma característica, de ellas un 49,23% se debían a los de la PCV-7 un 41,53% a los complementarios de la PCV-13 y el resto, 9,23%, a los que no cubren ninguna de ellas. Tabla 7.

Entre los serotipos más recuperados, 14, 23F, 19A y 19F presentaron las tasas de resistencia más altas, Tabla 8, con un 97,6%, 95,2%, 84,9% y 96,1% respectivamente. Los serotipos vacunales 6B y 9V también alcanzaron números altos pero solo dispusimos de 12 y 13 cepas de las que 9 y 11 respectivamente eran resistentes.

En la figura 1 se puede apreciar la distribución de las cepas según su CMI. En ellas podemos distinguir una población muy sensible y numerosa, 178 cepas, con  $CMI \leq 0,015$ , una intermedia menos

numerosa entre los datos centrales y otra bastante considerable en torno al punto de corte, CMI=1.

No encontramos ninguna cepa en toda la serie con resistencia alta CMI $\geq$ 4.

### Eritromicina

Siguiendo las normas citadas anteriormente una CMI $\geq$ 1 define la población resistente. De las 367 cepas invasoras, el 32,42% fueron resistentes a eritromicina. Tabla 1. Por periodos aumentó de 30,91% antes de 2001 a 34,37% después. Tabla 2A. El incremento fue mayor, hasta 37,5%, si se compara con los últimos cuatro años. Tabla 2B. Sin embargo esta tendencia no alcanzó significación en ninguno de las dos series enfrentadas,  $p > 0,5$ .

Comparando adultos y niños en el global de casos, los datos fueron 27,19% y 41,0% respectivamente con diferencias significativas  $p < 0,01$ . Tabla 3.

Por periodos se produjo un aumento en adultos del 23,52% al 34,61%, ns, y un descenso desde 51,8% a 34,1%,  $p < 0,05$ , para los niños. Tablas 4 y 5.

Antes de la vacunación se detectaron 64 cepas como resistentes a eritromicina, 70,31% de las cuales eran de los serotipos de la PCV-7, 9,37% de los seis complementarios de la PCV-13 y 20,31% no vacunales. Después de 2001 las cifras cambiaron a 41,8%, 38,18% y 20% respectivamente, resultando significativos el descenso de los PCV-7,  $p = 0,003$  y el aumento de los 6 complementarios,  $p = 0,0004$ . Tabla 9.

La proporción de cepas resistentes a eritromicina según vacunas en los dos periodos, Tabla 10, nos muestra un aumento en la segunda

parte que alcanzó significación estadística en el grupo de no vacunales,  $p=0,05$ .

De los serotipos frecuentemente aislados los más resistentes fueron 19F y 23F, ( $R>70\%$ ), seguidos de 19A y 14 ( $R>40\%$ ).Tabla 8. Aunque con un número más bajo de cepas también presentaron altas tasas de resistencia 6B (11 de 12) 6A (9 de 15) 24 (4 de 6) y el serogrupo 15 considerado globalmente (8 de 12).

Considerando todo el estudio, de 23 cepas con resistencia baja a eritromicina (CMI 1-16), 14 pertenecían al serotipo 14 (60%), mientras que solo encontramos 5 de 97 en las que tenían  $CMI>16$  (5,1%).

En las figuras 3 se aprecia la clara división en dos poblaciones que define la resistencia a eritromicina, La primera está en torno a una  $CMI=0,12$  que representa a las cepas susceptibles y la segunda alrededor de 128, indicando que la mayoría de aislados resistentes están muy alejados del punto de corte.

### Cefotaxima

Teniendo en cuenta las normas del CLSI de 2010, las cepas con  $CMI>0,5$  se consideran resistentes a cefotaxima para meningitis y ese es el criterio teórico que hemos adoptado. De este modo los datos de resistencia fueron como se describen a continuación:

Sobre el global de población de neumococos invasores 18,80%  
Tabla1.

Por periodos, 20,28% antes y 16,70% después de 2001. Tabla 2A, y 20,28 y 15,17 si comparamos con la fase 2007-10. Tabla 2B.

Por edad, 19,73% para adultos y 17,2% para niños. Tabla 3.

Por periodos y edad, en el primero 21,5% en adultos y 16,6% en niños y en el segundo 16,0% y 17,6% respectivamente. Tablas 4 y 5. En ninguna de las series anteriores comparadas encontramos diferencias con significación estadística.

Por serotipos, 23F, 14, 19F y 19A encabezaban las resistencias con cifras que iban desde el 76% del primero al 22% del último. Tabla 8. Otros serotipos con menos aislamientos pero con resistencia a cefotaxima fueron 6B, 9V y el serogrupo 15.

.  
Las figura 3 que representan la CMI de cefotaxima pone de manifiesto su similitud en actividad con penicilina. Por la parte de abajo, un alto número de cepas, 171 de las 367 de los neumococos invasores, presentaron una  $CMI \leq 0,015$  para cefotaxima y 178 para penicilina. Por el lado opuesto, 69 aislamientos estaban entre 1 y 2 y ninguno llegó a 4 o más (por lo que todas serian sensibles aplicando criterios para infecciones no meningéas), observándose que otros 48 se situaron justo en el punto de corte para meningitis,  $CMI=0,5$ .

### Resistencia combinada

De los 112 aislados correspondientes al periodo final 2007-2010, 47 eran resistentes a penicilina (41,96%) y de ellas a su vez 33 presentaban resistencia simultánea a eritromicina (29,46%), con presencia mayoritaria de los serotipos 19A (13 cepas) y 14 (8



cepas). Todas estaban en el rango de susceptibles a cefotaxima, pero 16 de este grupo tenían una CMI>0,5.

Entre las 65 cepas sensibles a penicilina, encontramos 9 (8,03%), resistentes a eritromicina y ninguna con CMI>0,5 a cefotaxima, perteneciendo 5 de ellas a serotipos de la PCV-13 (19A ,6A y 3).

### Tetraciclina

La resistencia global a tetraciclina entre los neumococos invasores alcanzó un 37,87%.

Las cifras disminuyeron claramente entre el primer y segundo periodo de 42,9% a 31,25%, con significación estadística,  $p=0,021$ .

Por grupos de edad, los procedentes de adultos fueron menos resistentes, 35,93%, que las de niños 40,28% con una  $p$  no significativa. Tablas 11 y 12.

Más del 90% de la resistencia se la repartieron entre 11 serotipos, tres pertenecientes a la PCV-7, 6B, 19F, y 23F que representaron 38,8% del total, dos, 19A y 6A de la PCV-13 y el resto 34, 23A ,9N y el serogrupo 15 de los no vacunales.

De las 139 cepas resistentes a tetraciclina, 98 también lo eran a eritromicina y de 227 sensibles solo 21 mantenían la resistencia.

### Cloranfenicol

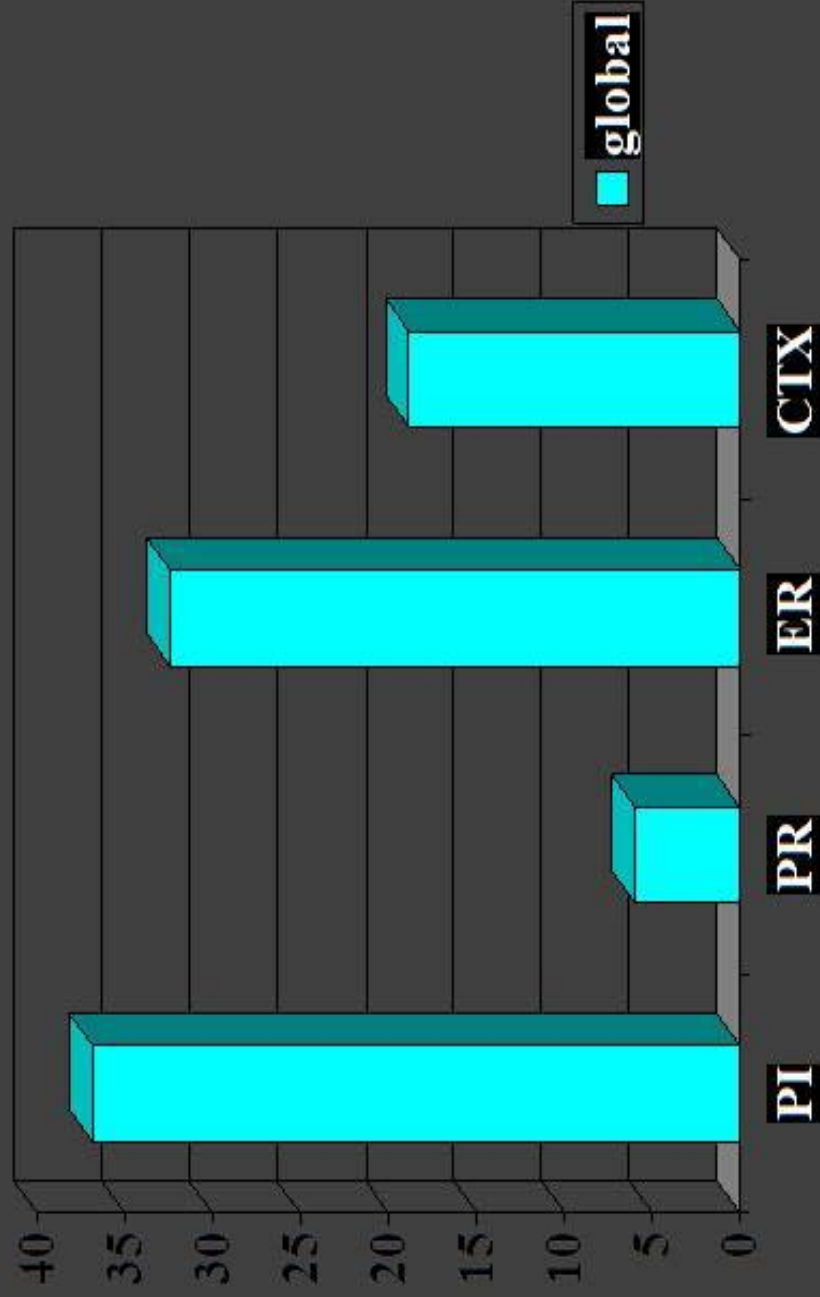
Solo el 17,21% de las cepas invasoras presentaba resistencia a cloranfenicol.

La diferencia entre los dos periodos fue estadísticamente significativa evolucionando desde un 26,57% al 5,03%,  $p=0,00001$ .

.También entre las dos poblaciones estudiadas se encontraron diferencias pero sin significación estadística, 19,48% de resistencia en adultos y 12,94% en niños,  $p=0,106$ . Tablas 11 y 12.

# RESISTENCIAS INVASORES

Global 92-2010



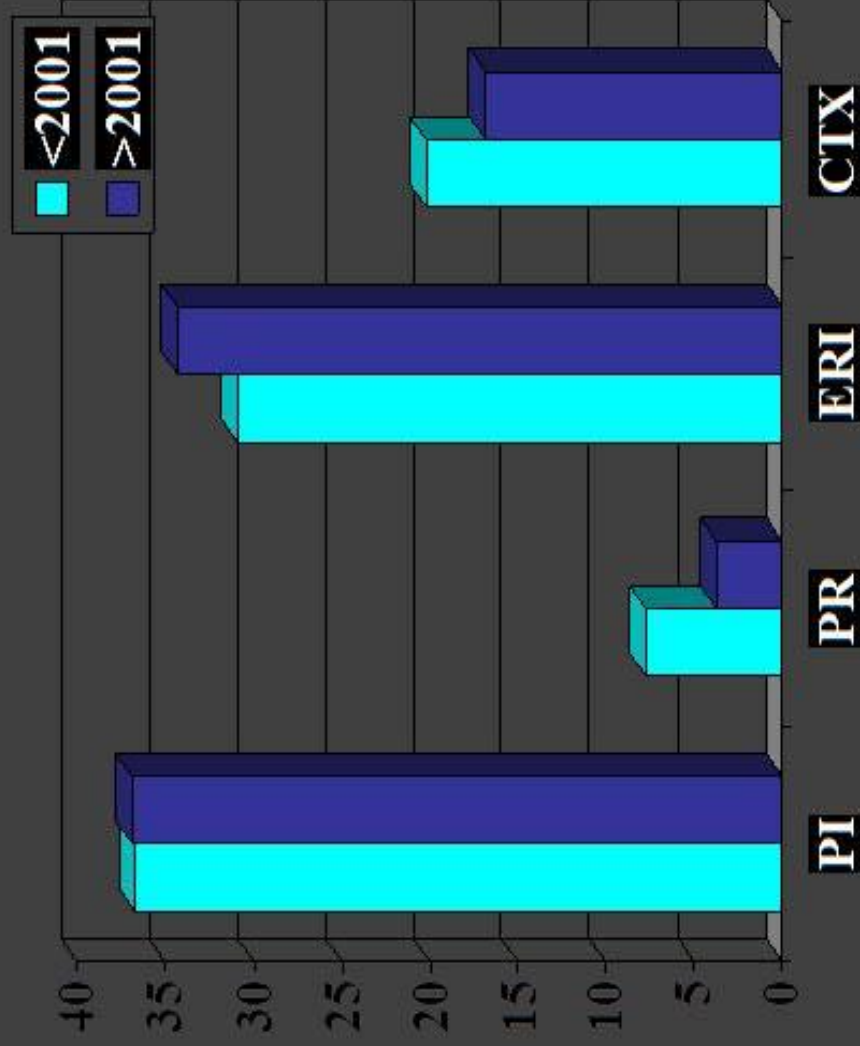
%

PI	36,78
PR	5,99
ER	32,42
CTX	18,80

TABLA1

# RESISTENCIAS INVASORES

global por períodos



% <2001 >2001 P=

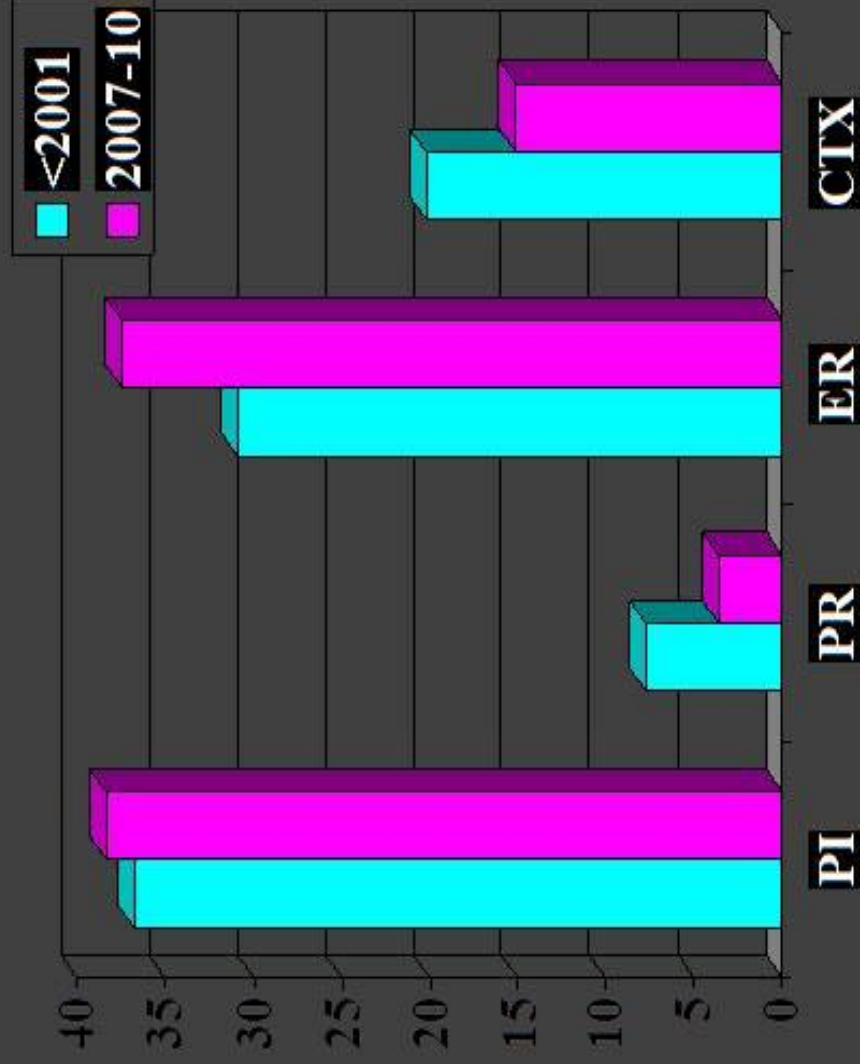
PI	36,71	36,87	ns
PR	7,72	3,75	ns
ER	30,91	34,37	ns
CTX	20,28	16,81	ns

RUIZ, J.

TABLA2A

# RESISTENCIAS INVASORES

global por períodos

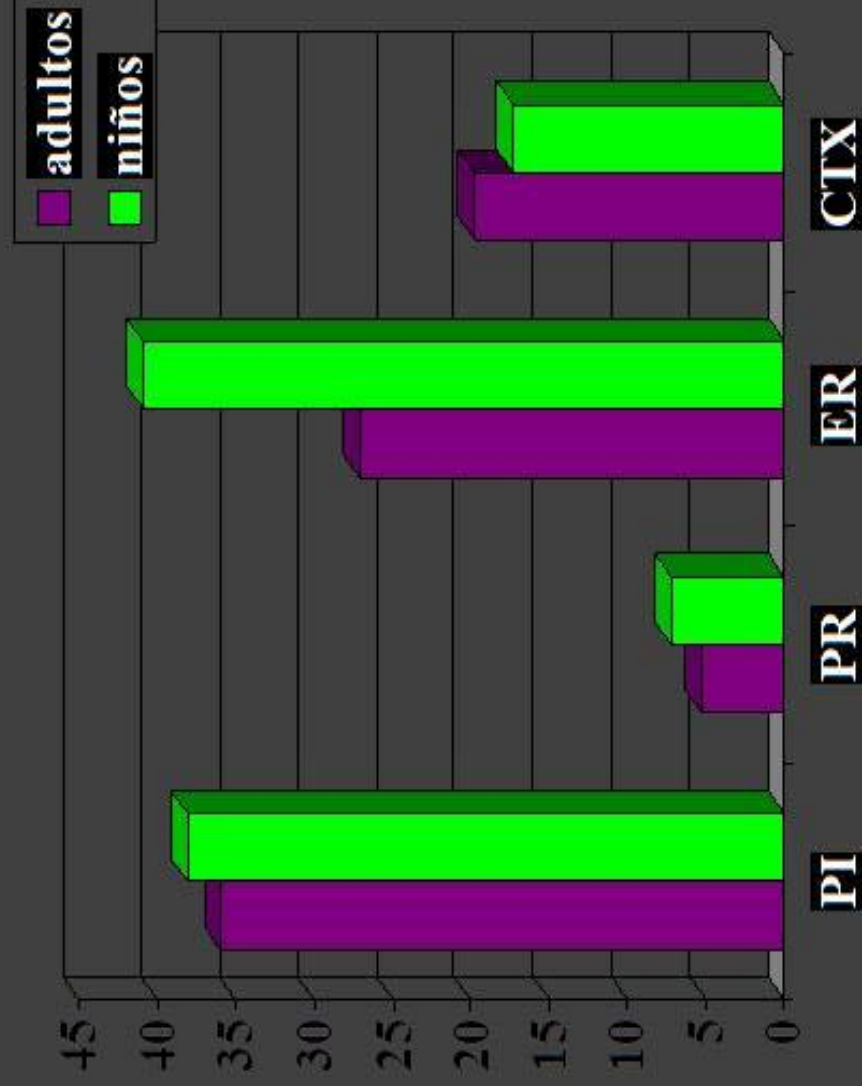


% <2001 2007-10 P=

	<2001	2007-10	P=
PI	36,78	38,39	0,358
PR	7,72	3,57	0,144
ER	30,91	37,5	0,23
CTX	20,28	15,17	0,262

# RESISTENCIAS INVASORES

global adultos frente a niños

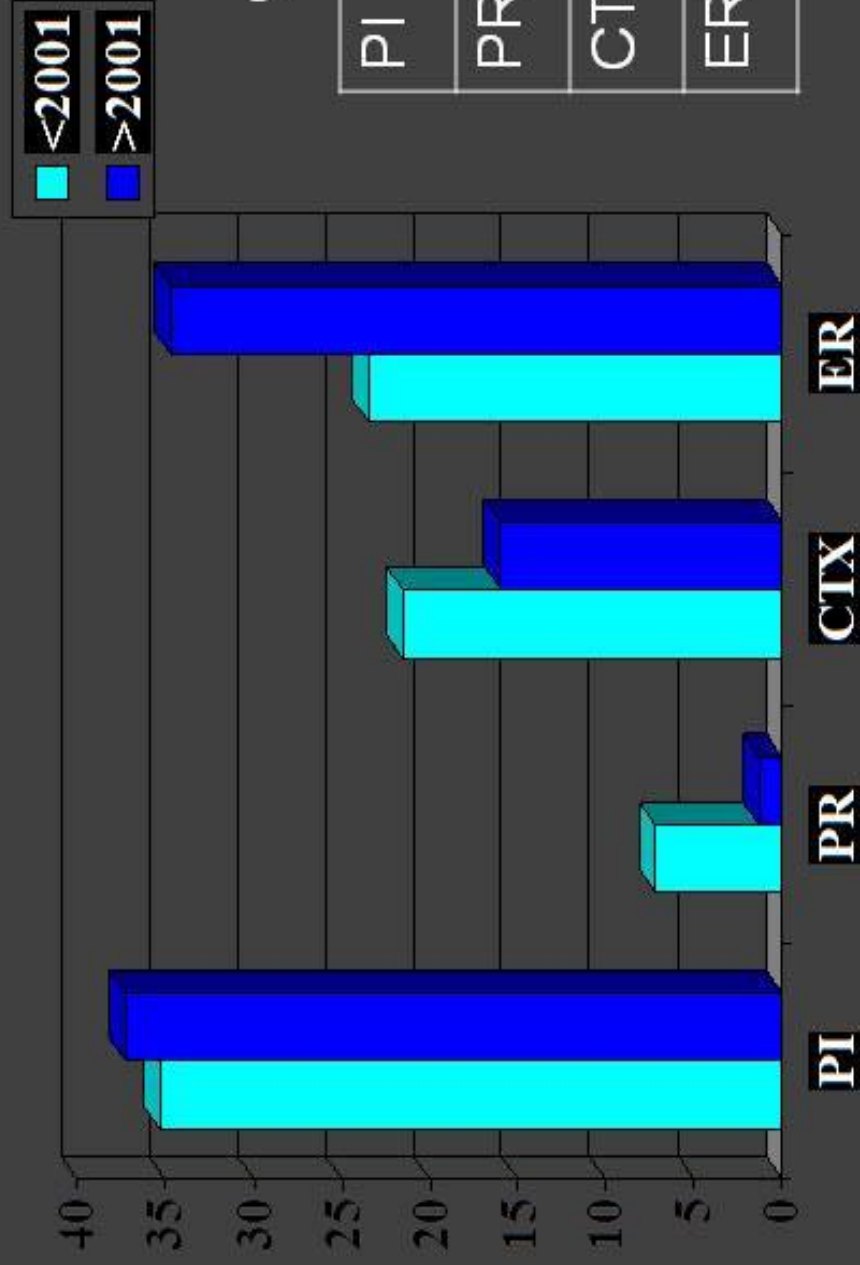


% adulto niños P=

PI	35,96	38,12	ns
PR	5,26	7,19	ns
ER	27,19	41,00	<0,01
CTX	19,73	17,26	ns

# RESISTENCIAS INVASORES

por período y edad: adultos



% <2001 >2001 P=

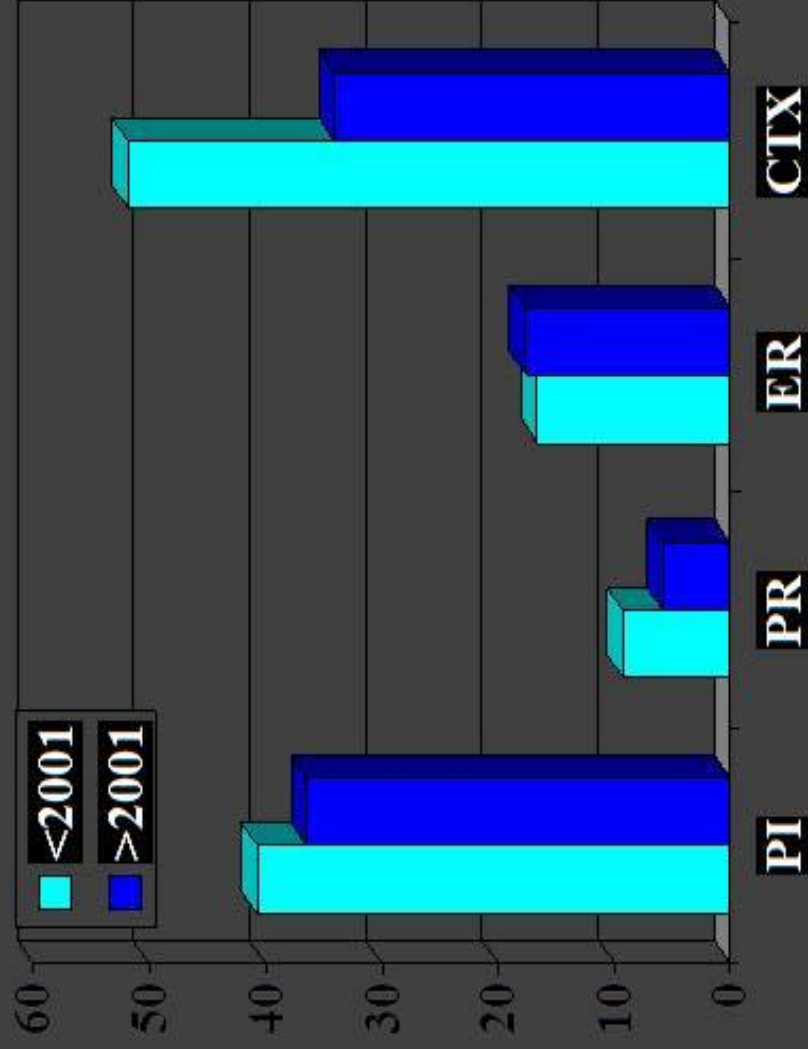
PI	35,29	37,3	ns
PR	7,18	1,33	ns
CTX	21,56	16,00	ns
ER	23,52	34,66	ns

RUIZ, J.

TABLA4

# RESISTENCIAS INVASORES

por período y edad: niños



% <2001 >2001 P=

	<2001	>2001	P=
PI	40,7	36,47	ns
PR	9,25	5,88	ns
ER	16,66	17,64	ns
CTX	51,85	34,11	<0,05

RUIZ, J.

TABLA5



# RESISTENCIA A PENICILINA

Evolución según vacunas: invasores

<2001

>2001

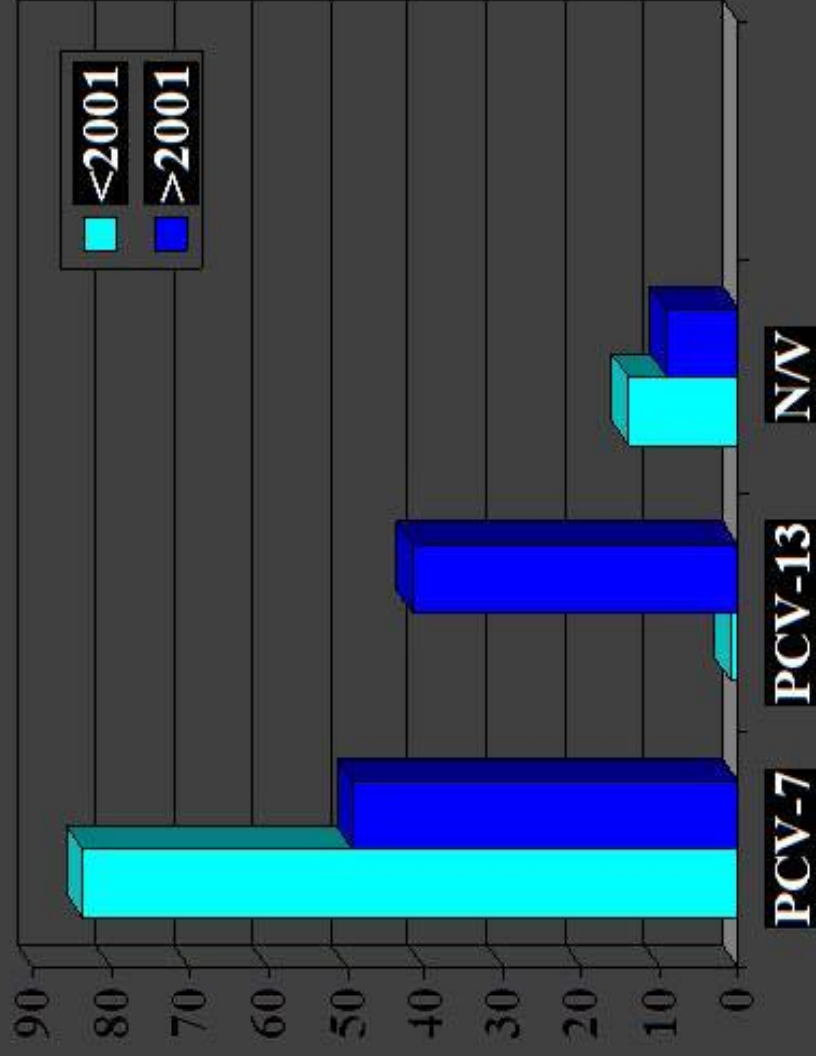
	R/Total	%	R/Total	%	P=
PCV-7	77/92	83,69	32/41	78,04	0,434
PCV-13	1/35	2,85	27/85	31,76	0,0007
N/V	14/80	17,50	6/34	17,64	1

TABLA6

RUIZ, J.

# RESISTENCIA A PENICILINA

según vacunas: invasores



% <2001 >2001 P=

PCV-7	83,7	49,23	<0,0001
PCV-13	1,08	41,53	<0,0001
NV	14,13	9,23	ns

RUIZ, J.

TABLA7

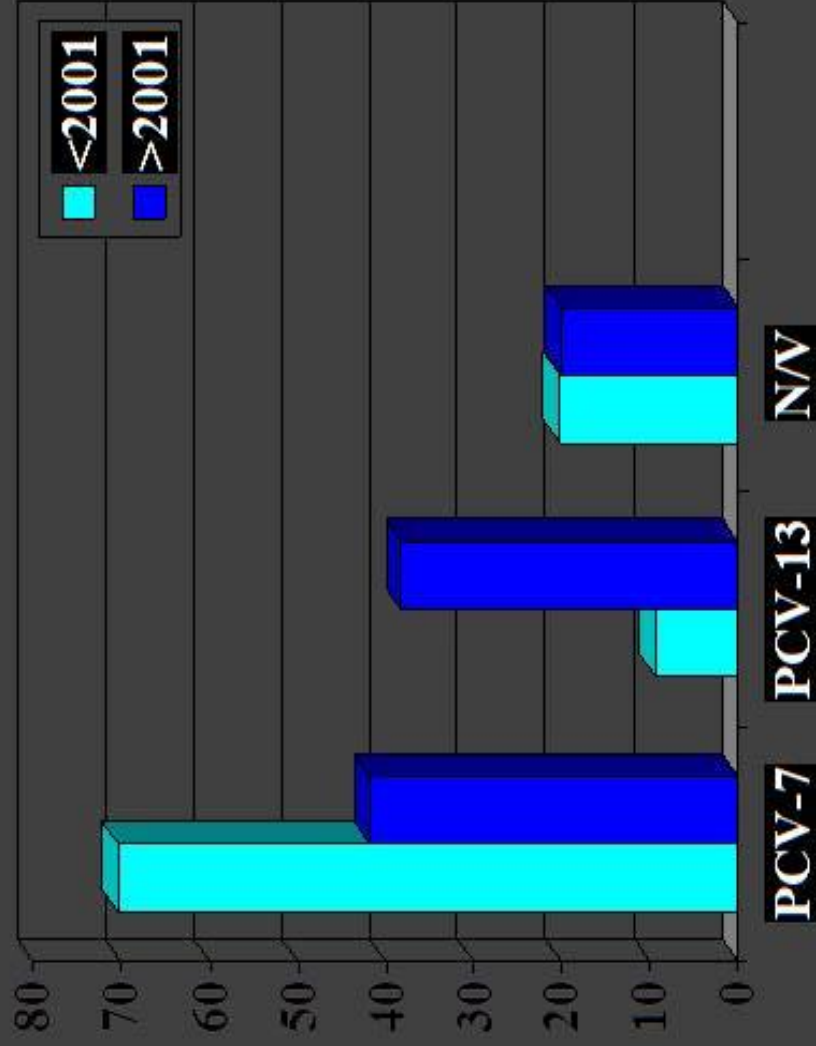
# Resistencias por serotipos invasores

	19A	14	23F	19F	6A	6B	9V	15
PI	69,4	79	71,4	84,6	20	66,6	69,6	58,3
PR	0	18,6	23,8	11,5	0	41,6	15,3	25
CTX	22,2	46,5	76,1	34,6	0	33	30,7	50
ER	44,4	44,18	71,4	76,9	60	91,6	0	66,6

TABLA8

# RESISTENCIA A ERITROMICINA

según vacunas: invasores



% <2001 >2001 P=

PCV-7	70,31	41,81	0,003
PCV-13	9,37	38,18	0,0004
N/V	20,31	20,00	1

TABLA9

RUIZ, J.

# Resistencia a eritromicina

## Evolución según vacunas: invasores

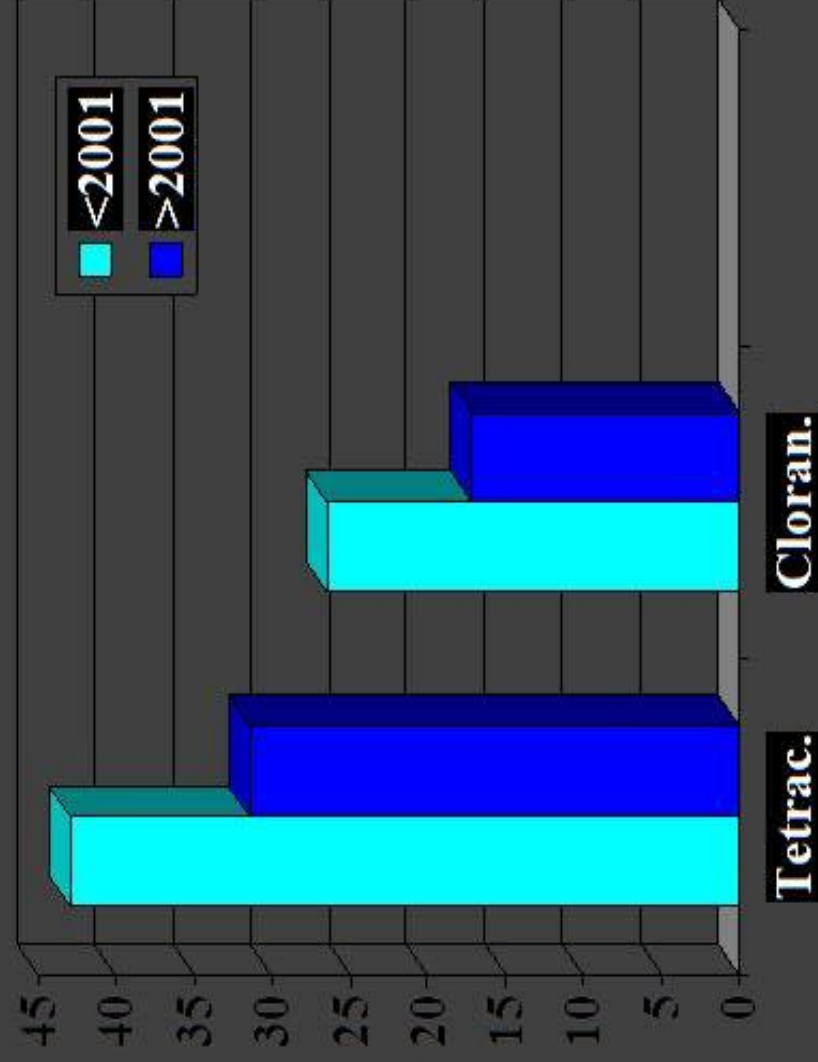
% R/Total <2001 R/Total >2001 P=

PCV-7	45/92	48,9	23/41	56,0	0,444
PCV-13	6/35	17,1	21/85	24,7	0,385
NN	13/80	16,2	11/34	32,3	0,05
	64/207		55/160		

# RESISTENCIA POR EDAD TETRACICLINA Y CLORANFENICOL

%	Adultos	Niños	P=	Total
Tetrac.	35,9	40,28	0,402	37,87
Cloran.	19,49	12,94	0,106	17,16

# RESISTENCIA POR PERÍODOS TETRACICLINA Y CLORANFENICOL



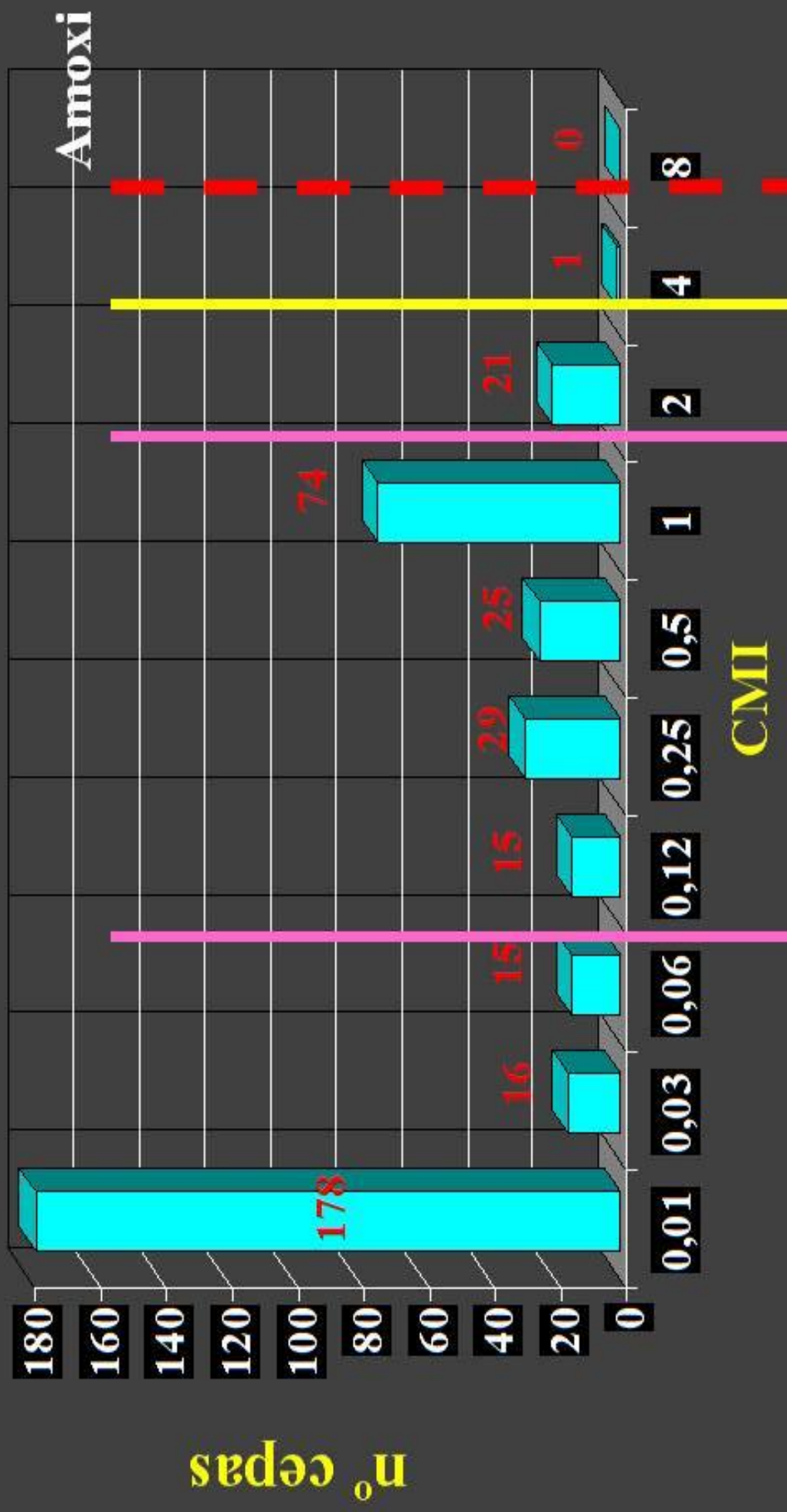
% <2001 >2001 P=

Tetrac.	42,99	31,25	0,021
Cloran.	26,5	5	<0,00001

RUIZ, J.

TABLA12

# CMI DE PENICILINA



S

MS

R

FIGURA1



# CMI DE ERITROMICINA

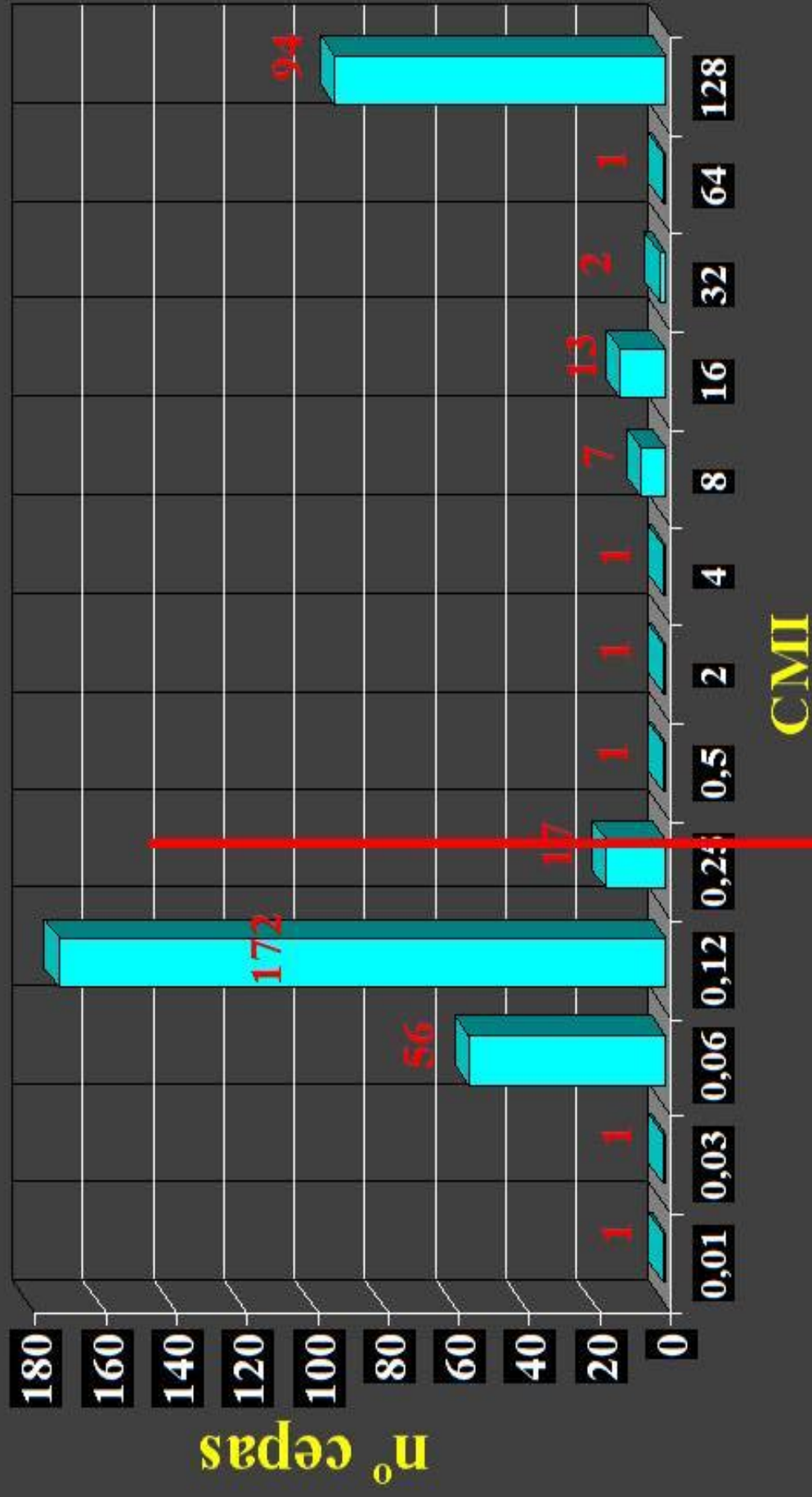
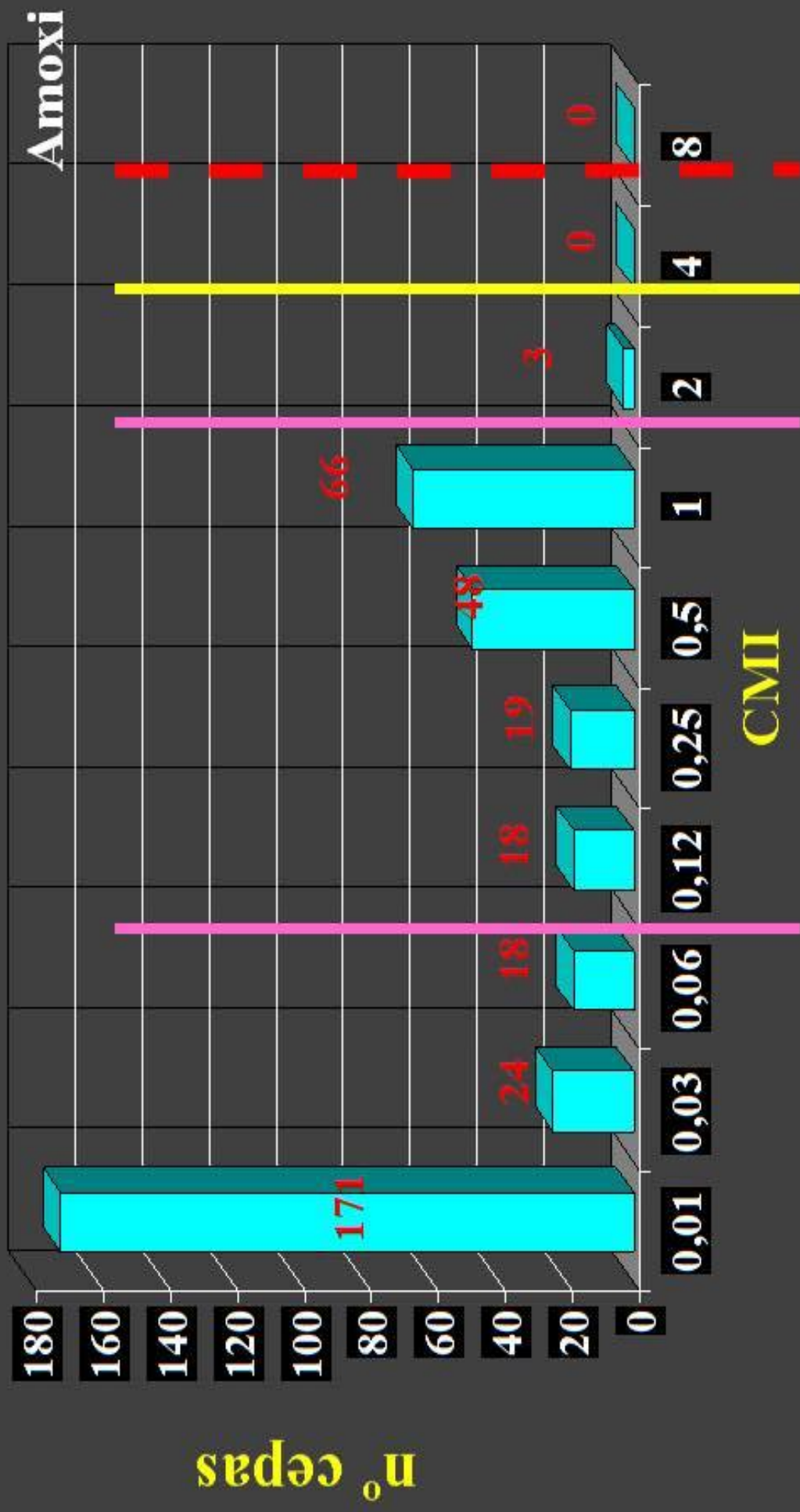


FIGURA2

# CMI DE CEFOTAXIMA



S

MS

R

FIGURA3

# Discusión

## Serotipos

La distribución de serotipos, como ya se ha comentado, varía con el tiempo de forma natural y está asociada a diferentes factores tales como la edad, área geográfica, uso de antibióticos, vacunación etc. Por ello los resultados de un estudio solo representan la fotografía en un instante o periodo en la zona o región cubierta.

En nuestro caso representan los cambios ocurridos durante dos décadas en el área de influencia de nuestro hospital.

En él podemos distinguir claramente dos periodos separados por el comienzo de la vacunación como se ha observado prácticamente en todos los lugares donde ésta se ha instaurado. (288,289)

En la primera época las 207 cepas estudiadas pertenecían a 37 serotipos, representando los siete cubiertos por la PCV-7 el 45,8% con este orden de frecuencia, 14(11,1%), 19F (9,6%), 23F (7,2%), 3 (6,76%), 18C (5,3%), 6B (4,8%), 9V (4,3%), y 4 (3,3%), una distribución bastante diferente de la encontrada en algunas zonas, como por ejemplo, Holanda, representada en un trabajo del Centro Nacional de Referencia de ese país, que cubría una cuarta parte de toda la población. Allí en la era prevacunal el orden era 14 y 7F igualados con el 12,2%, seguido del 4 (8,7%) 9V (8,7%) y 8 (7,5%). (290). Tampoco coinciden nuestros datos, a pesar de la cercanía con los ofrecidos en otro amplio ensayo de Portugal sobre 495 aislados de adultos y niños recogidos entre 30 laboratorios de microbiología, El orden en este caso fue 14,1, 3, 4, 8,19A y 7F, con solo dos serotipos vacunales 14 y 4 entre los siete primeros.

(291). En otra publicación alemana referida a datos previos a la vacunación, el orden tampoco se asemejaba mucho al nuestro, aunque coincidía como los anteriores en la situación privilegiada del serotipo 14, al que seguían 7F, 3, 4 y 1. (214).

Por el contrario, nuestra situación era bastante similar a un sitio tan lejano como Nueva Zelanda, donde los serotipos vacunales eran los más aislados, representando el 80% en niños menores de 2 años (292).

Después de 2001 los 176 aislamientos obtenidos se repartieron entre 31 serotipos con un orden de frecuencia sustancialmente distinto al anterior, 19A (18,7%), 7F (13,0%), 14 (11,3%), 3 (10,2%) y 1 (7,9%), con porcentajes todavía superiores comparando con 2007-2010 (Tablas 11 y 12). Este drástico cambio probablemente este asociado a la introducción de la vacuna heptavalente que como en otros lugares ha provocado un fenómeno de “reemplazamiento” al ocupar los serotipos no cubiertos por la vacuna, contra los que no se tienen anticuerpos, el nicho ecológico dejado por los que si cubre. Este fenómeno ha tenido lugar tanto en portadores como en infecciones invasoras afectando a niños y también a adultos por el efecto “herd”. Este “reemplazamiento” ha obscurecido en parte la eficacia de la vacuna sobre la incidencia de enfermedad invasora, que si bien inicialmente parecía muy pronunciado, posteriormente se ha atenuado. En el Reino Unido donde se ha observado este fenómeno, se ha detectado un incremento de los serotipos 7F, 19A y 22F. (272) y en USA del 22F y 19A, este último asociado a un determinado clon (ST320) con alta resistencia antibiótica y distinto al detectado en RU (ST199) o Portugal (ST 230) (293, 294, 295). La vacuna además de disminuir la infección invasora en vacunados ha inducido un efecto indirecto sobre grupos no vacunados, como se

ha observado en niños mayores de 5 años y en adultos (272). El nivel de inmunidad “herd” se ha sugerido que incrementa con el número de dosis (296). Previa a esta observación, la vigilancia llevada a cabo en USA descubrió una caída de infección invasora neumocócica del 42% en lactantes menores de 90 días, (273) indicando que la inmunidad puede extenderse a aquellos que todavía no tienen edad para vacunarse o para no haber completado la vacunación.

Hay numerosos ejemplos que describen el cambio de serotipos con unos resultados más uniformes en cuanto a los más frecuentes, aunque con peculiaridades según zona geográfica. En Utah entre 2001 y 2010 estudiando una población de menores de 18 años, el orden de aislamientos fue 7F, 19A, 22F y 3, apareciendo aquí un serotipo poco frecuente entre nosotros, el 22F. (289).

En Canadá datos de 2007-2009, periodo postvacunal, en una población general, el orden quedó así, 19A, 3, 22F, 4, 5 y 11A, que difieren más de los nuestros ya que el 4 y 5 desaparecieron antes de la vacuna.(297). Otros datos de Canadá (189) describen incrementos significativos para los serotipos 5, de 0 a 37%, 22F (238%), 12 (113%), 3(88%), y 11A(83%).

En Portugal los resultados son muy parecidos según el trabajo de Horacio et al, en población adulta entre 2006-2008. Los serotipos 3, 1, 7F, 19A, y 14 ocupando los primeros lugares, asociándose el 1 con adultos jóvenes y el 3 con ancianos. (298). En población pediátrica en el mismo país 1, 7F y 19A fueron los más frecuentes, relacionándose el 1 con niños mayores de un año y el 19A a menores de dos años. (299).

Datos españoles arrojan resultados similares a los de Portugal en niños, según el trabajo de Muñoz-Almagro et al. (300), con 1, 19A y

7F ocupando los primeros lugares. Esta misma autora también en población infantil observa un incremento espectacular del serotipo 19A entre 2001 y 2007 probablemente por la existencia de clones multirresistentes preexistentes en la etapa anterior. (301).

En un estudio nacional español que recoge datos de 1979 a 2007, los serotipos 5 y 7F disminuyeron en los 80 y aumentaron en 2000. El 1 comenzó a aumentar en los 90 y a partir de 2000 se produjo un ascenso más marcado. El 6A presentó un incremento significativo a partir de finales de los 90 y 19A se elevó rápidamente a partir de 2000. (184). En Canarias el serotipo 3 se situó en cabeza, seguido del 6A 15 y 19A en un estudio realizado por Artilles et al., en (302).

Otras causas, además de la vacunación, pueden estar influyendo en estos cambios observados ya que de hecho tienen lugar de modo natural a lo largo del tiempo, produciéndose fluctuaciones en ausencia de la vacuna. (303, 304).

Los incrementos con significación estadística que observamos en nuestros resultados comparando los dos periodos, corresponden a los serotipos 19A, 7F. Estos cambios se hacen más notorios si comparamos con los cuatro últimos años en los que el nivel de población infantil vacunada alcanzó el máximo. Los descensos para los vacunales fueron manifiestos para todos los serotipos excepto para el 14 que apenas varió su incidencia. Algunos como el 4, 6B y 9V desaparecieron y del 18C solo se recuperó una cepa después de 2007. Otros que desaparecieron en la segunda etapa fueron el 12 y el 5 a pesar de que no están en la vacuna PCV-7. Este último serotipo según el estudio nacional (184), descendió en los 80 y se elevó en 2000. En Madrid Picazo et al., lo encuentran en tercer lugar de frecuencia en la era postvacunal entre 330 niños de 22 hospitales. (305).

Los serotipos procedentes de niños (153 cepas), más frecuentes fueron 19A, 14 y 7F. El primero experimentó el mayor incremento de todos, 2 cepas aisladas antes de 2001 y 23 después, resultando más acusado el incremento si se compara con los cuatro últimos años. Este serotipo aparece muy ligado en la serie a la producción de empiema pleural, hecho que se ha generalizado en otros países, asociándose también a otitis media aguda y a pacientes menores de 2 años (306, 307, 308, 299). El serotipo 14 estuvo presente en los dos periodos de forma notable y a pesar de la vacunación no se observaron cambios significativos, 7 de 54 cepas antes y 15 de 98 después. En el estudio nacional alcanzó un pico máximo alrededor de 2000, comenzando a declinar hasta 2007, pero quedando por encima claramente del resto de sus acompañantes en la PCV-7 (184).

El serotipo 7F aumentó también en el segundo periodo, pasando de 3 a 11 cepas, ocupando uno de los tres primeros lugares en la mayoría de series publicadas en niños (289, 309), junto al serotipo 1, se ha asociado a diagnósticos negativos por cultivo y positivos por PCR en muestras de empiema pleural (310, 311, 312).

En nuestra población adulta obtuvimos 153 aislamientos antes de 2001 y 98 después. En la primera fase los serotipos preeminentes fueron 14, 19F, 3 y 23F y en la segunda 7F, 19A y 3. Se observó un descenso de todos los vacunales con desaparición del 4 y 6B. También descendió el 3. El remplazamiento se efectuó a expensas principalmente del 19A y el 7F. Estos datos son similares a otros cercanos como los de Horacio en Portugal (298) y Vila-Córcoles en España (313) y a algunos más lejanos como los de Ho en Hong Kong (308).

## Serotipos Peculiares

El serotipo 1 aparece como uno de los más comunes entre los causantes de infección invasora neumocócica desde su descripción y asociación con neumonía en 1913 (314), aunque su frecuencia varía entre países y épocas (269). Es uno de los pocos que se asocia a brotes en comunidades cerradas (315, 316, 317,318) y su incremento se ha ligado con el incremento de enfermedad invasora nacional (319, 320). Se le ha relacionado recientemente con empiema pleural y desde antiguo con peritonitis y salpingitis en niñas adolescentes (321, 322, 323).

Durante nuestro estudio encontramos 20 cepas del serotipo 1, seis en la era prevacunal y 14 en la postvacunal lo que supone un incremento desde el 2,8% hasta el 7,8%. En cambio en el estudio de portadores no conseguimos ni un solo aislamiento entre las 343 cepas totales recuperadas. Este hecho se repite en muchos trabajos en los que raramente se detecta en nasofaringe de personas sanas, incluso en lugares donde está causando infección en ese momento. (324, 319, 325,326). Esta circunstancia junto con su capacidad para producir brotes, sugiere que tiene una alta tasa de ataque (327). Efectivamente así ocurrió en nuestro caso cuando comparamos las cepas invasoras con las de portadoras, resultando el de mayor capacidad invasora, tanto en la comparación efectuada con el serotipo 14 como referencia, como si se calculaban los resultados tomando el conjunto

La baja prevalencia entre portadores supone que está exento de la presión de selección que ejercen los antibióticos sobre otros serotipos habituales de la nasofaringe, lo que ayuda a mantener unos niveles de resistencia mínimos incluso en zonas donde se está



recuperando con frecuencia en ese momento y aunque allí las resistencias globales sean elevadas (328,319,329). Esto ocurrió en nuestro caso, todas las cepas aisladas eran susceptibles a todos los antimicrobianos ensayados.

### Serotipo 19A

Recientemente en estudios llevados a cabo en diversos países como España, Portugal, Reino Unido, USA y Canadá, donde se ha aplicado la vacuna heptavalente, se ha demostrado que incluso con una modesta tasa de cobertura, se ha producido un profundo efecto sobre los serotipos responsables de infección invasora (330, 331, 300, 332, 297, 289). En particular ha emergido el serotipo 19A como responsable de un número considerable de casos (330,300, 306). Aunque este incremento se ha relacionado con la vacunación (332), otros informes han puesto de manifiesto la misma tendencia en países donde no se ha usado la vacuna (333, 334). Por ello se ha especulado con que la vacunación puede haber reforzado o acelerado una tendencia temporal a la que pueden contribuir otras causas como el uso de antibióticos o la existencia de clones resistentes (295, 334), incluso por la emergencia de nuevas cepas de “neumococos recombinantes” que escapan a la vacuna, con cápsula de 19A y un genotipo que fue asociado al serotipo 4 (332). En nuestro país se han identificado clones estrechamente relacionados con el Dinamarca14-32 (331, 335), además de otros que también han sido detectados en Portugal (295, 291) y Francia (336).

En el presente estudio, antes de 2001 solo se aislaron tres cepas del serotipo 19A, todas ellas previas al 97, lo que significó un porcentaje muy reducido respecto del total, 1,4%. Una vez instaurada la vacuna se produjo un incremento manifiesto de aislamientos, el primero en 2003, que alcanzó su pico en el periodo final 2007-2010, con el 23,4% de las cepas de este tramo.  $p < 0,00005$ . Una mayoría procedía de niños, 23 de 30, y en especial de muestras de líquido pleural, 14 de 30. En un estudio nacional español este serotipo aumentó del 4,6% en la década de los 90 al 13,5% del periodo 2006-2008, (335,184). También se ha citado como productor frecuente de empiema pleural y se le ha asociado a niños menores de 2 años con mayor frecuencia, aunque produce otras infecciones en adultos en un número de casos no desdeñable (307, 301, 289, 295, 337). Este serotipo es el responsable de la mayoría de resistencias a eritromicina y betalactámicos entre los causantes de enfermedad invasora después de la vacunación (338). En nuestra serie encontramos un 69% de cepas resistentes a penicilina y un 44% a eritromicina.

### Serotipo 6C

De los últimos serotipos descritos, 11E (39), 6D (339) y 6C (340) en nuestra colección aparece una sola cepa del 6C aislada a partir de la sangre de un adulto en 2010, aunque es posible que otros anteriores clasificados como 6A también lo sean. En otro trabajo realizado en España, un 27% de las cepas clasificadas como 6A entre el 97 y 2009, pertenecían en realidad al 6C, observándose un

incremento paulatino desde el inicio, 9,8% hasta el final 42%, de todas las cepas clasificadas como 6A. El aumento en aislados pediátricos fue desde el 0,1% en la era anterior a la PCV-7 al 1% en la posterior, y desde el 0,3% al 1,7% en adultos, (341). En un estudio de Sudáfrica representó el 5% de los aislados identificados previamente como 6A y se le relacionó con mayor frecuencia a infección en niños. (342). Además este serotipo se asoció a la diseminación de determinados clones con resistencia a la eritromicina (341). Nuestra cepa era también resistente a eritromicina, igual que 7 de las 16 aisladas en el estudio de portadores más adelante descrito.

Marimón et al., (343) en el norte de España encontraron 10 cepas del serotipo 6C entre 1530 invasoras entre 1990 y 2009, todas ellas procedentes de adultos. Green et al, (344), observaron un incremento de aislados del 6C en niños entre el 93 y 2009. En el Reino Unido también se ha descrito un incremento en portadores durante la fase de implantación de la PCV-7 (345).

A pesar de no estar incluido en la vacuna PCV-13, parece que esta puede producir un efecto protector por inmunidad cruzada con el 6A (346).

### Serotipo 11E

El serotipo 11E procede del 11A, (11Abeta), por inactivación de un gen, wcjE, y se ha sugerido que no se trasmite entre hospedadores, sino que es el 11A el que lo hace y posteriormente por presión selectiva se produce la alteración genética comentada, apareciendo más frecuentemente entre cepas invasoras que entre portadores. (347).

Durante el presente estudio obtuvimos 8 aislados del serogrupo 11, todos procedentes de adultos, pero no disponemos de la subdivisión en serotipos por lo que no sabemos si entre ellos había alguna del recientemente descubierto 11E (39). Sin embargo en el trabajo realizado en portadores recuperamos 21 cepas del 11A y una del 11F, no encontrando ninguna del 11E, como parece que es habitual en este tipo de muestras.

### Serotipo 22F

A pesar de las publicaciones recientes que sitúan a este serotipo entre los que están dando lugar al fenómeno de remplazamiento en algunos países como USA (289), Reino Unido (348, 309) y Canadá (297), nosotros aislamos una sola cepa, que fue responsable de una meningitis en un niño en 2010. También encontramos 8 cepas en el estudio de portadores, ocupando un puesto bajo, similar al que ocupaba en otro trabajo reciente sobre portadores realizado en San Sebastián. (47).

## Meningitis

*S. pneumoniae* es el microorganismo que con mayor frecuencia causa meningitis en los adultos (349) y puede serlo también en niños en épocas no epidémicas, superando al meningococo (106, 350). El cuadro se asocia a altas tasas de mortalidad y secuelas neurológicas. La vía más común de infección comienza en la nasofaringe donde el neumococo reside habitualmente. Durante la

invasión la bacteria se adhiere a las células epiteliales, y a continuación, pasa al torrente circulatorio, activa el complemento y el sistema de coagulación. La liberación de mediadores inflamatorios facilita el paso de la barrera hemato-encefálica, donde la bacteria se multiplica libremente continuando el proceso inflamatorio que produce pleocitosis, daño coclear edema cerebral, hidrocefalia y complicaciones cerebrales. (351).

De las 383 infecciones invasoras de nuestro estudio, 66 fueron meningitis, lo que supone el 17,2%. Esta cifra puede infraestimar la realidad por haber utilizado solo el cultivo como método diagnóstico, aunque la meningitis no se afecta tanto como el empiema pleural que se origina tiempo después del comienzo de la neumonía, generalmente tras el inicio del tratamiento antibiótico. Los pacientes con meningitis suelen acudir precozmente al hospital ante la gravedad manifiesta habitual. No obstante, en un reciente estudio español (352), llevado a cabo en niños con enfermedad invasora, se mejoró el diagnóstico global utilizando cultivo (38% de resultados positivos) y PCR (81,4 %), consiguiendo en total un 29,9% de casos con meningitis.

Nosotros observamos un descenso en el número de casos a partir de la introducción de la vacuna conjugada PCV-7, pasando de 44 a 22.

La proporción de niños afectados sin embargo aumentó respecto a la de adultos, 10 de 44 antes y 9 de 22 después. El bajo número de casos en niños no creemos que esté afectado por falta de notificación de los casos ya que durante el primer periodo todos los neumococos aislados incluidos los no invasores se enviaban al Centro Nacional de Referencia en Majadahonda (Madrid).

La incidencia en el periodo 2007-2010 para población infantil fue de 1,04 por 100.000/ personas /año, inferior al periodo 96-2000, 1,2 por 100.000/personas/año, considerando el área de influencia de nuestro hospital. Datos de un amplio estudio americano (111), muestran una clara disminución entre 98-99 y 2006-2007 separados por una masiva vacunación, pasando de 1,09 por 100.000/personas/año a 0,81 por 100000/personas/año. Las razones apuntadas se relacionan con la disminución de serotipos vacunales, aunque se indica que no fueron mayores por el fenómeno de remplazamiento observado al ocupar su lugar nuevos serotipos. En nuestro caso ocurrió algo parecido, antes de 2001 el 43,1% de aislamientos estaban incluidos en la PCV-7 y después solamente el 22,7%. Estos datos coinciden con la tendencia observada en un amplio estudio nacional (350).

En Francia a pesar de las altas tasas de vacunación con PCV-7 no se ha observado una disminución significativa de las meningitis neumocócicas, sustituyendo los serotipos no vacunales a los anteriores, especialmente frecuentes fueron 19A y 7F. (353). Además se han comprobado casos de fallos después de vacunación completa, como los descritos en otra larga serie francesa, en la que detectaron tres meningitis por los serotipos 6B, 4 y 19F en niños vacunados correctamente. (354).

Los seis serotipos que añade la PCV-13, solo causaban 4 de los 44 episodios (9%), registrados antes de 2001, aumentando significativamente,  $p < 0,001$ , los aislados posteriores, 10 de 22, 45,4%. Sumando la cobertura de los trece serotipos podemos concluir que actualmente la vacunación con PCV-13 cubre el

68,1%. Datos similares han sido presentados por autores de USA e Italia (111, 355).

Los 44 casos de la era prevacunal estaban repartidos en 19 serotipos, encontrándose representados todos los de la PCV-7, especialmente 19F, 23F y 14. De los no vacunales el 12 y el 20 con 5 y 4 cepas respectivamente fueron los más llamativos ya que desaparecieron en el segundo periodo. En este último apenas encontramos aislados de la PCV-7, aumentando los de la PCV-13, especialmente el 19A. La recuperación de este serotipo se ha disparado en muchos países, tanto como productor de meningitis como de otros cuadros invasores (350, 335, 356, 354), relacionando este hecho con la introducción de la vacuna, aunque también ocupa un lugar destacado en otros donde no se ha vacunado. (357).

La resistencia a penicilina disminuyó del 43,18% del primer periodo al 36,3 del segundo,  $p=0,03$ , considerando como tales las cepas que presentaban una concentración mínima inhibitoria mayor de 0,06. Este descenso se debe entre otras razones, a la desaparición de los serotipos vacunales tradicionalmente más resistentes, aunque la irrupción de otros como el 19A dificulte la continuidad de esta tendencia.

La resistencia a cefotaxima, antibiótico de elección en el tratamiento de la meningitis, experimentó una tendencia descendente del 22,72% al 9% pero sin significación estadística.

Nuestros datos están ampliamente confirmados en un estudio nacional con un elevado número de cepas de todo el país (350), en el que se recomienda mantener cefotaxima y vancomicina como tratamiento empírico inicial hasta conocer los datos microbiológicos.

## Empiema pleural

El empiema pleural es la complicación más frecuente de la neumonía neumocócica que se produce cuando la bacteria alcanza el espacio pleural bien por vía hematológica o por extensión de la misma neumonía, ocasionando una reacción inflamatoria y acumulación de pus. En la era pre-antibiótica aparecía en el 5% de los casos (358). El incremento en la incidencia de empiema infantil que se observa en muchos lugares podría estar relacionado a enfermedad neumocócica invasora causada por serotipos no vacunales emergentes que han sustituido a los de la PCV-7 (312).

A pesar de la proliferación de publicaciones que corroboran el aumento de empiema en niños (359,360), las razones no están del todo claras, ya que el incremento comenzó en la era prevacunal en algunos países (361, 362,363).

El empiema en niños es una enfermedad relativamente poco común que ocurre en el 0,7% de neumonías (364). En los últimos años sin embargo, pasado un tiempo desde la comercialización de la vacuna heptavalente en el año 2000, cerca del 40% de niños hospitalizados por neumonía presentaban empiema como complicación del cuadro inicial (311), a pesar de que la incidencia de enfermedad invasora global ha disminuido (365).

En un trabajo realizado en España en el que participaban 22 hospitales, el empiema paraneumónico representó el 30% de los cuadros invasores neumocócicos detectados en niños, entre los años 2007 y 2009 (366).

En USA las tasas de hospitalización de niños por empiema se incrementaron un 70%, pasando de 2,2 por 100.000 en 1997 a 3,7 por 100.000 en 2006, decreciendo en el mismo periodo la



neumonía, sepsis y meningitis por *S. pneumoniae* (367). Hendrickson et al. (368), también comunicaron un incremento de cinco veces de empiema paraneumónico en niños, comparando datos anteriores y posteriores la introducción de la vacuna heptavalente. También en Utah se constató un aumento de casos durante 2001-2004, 71casos/año frente a 38/casos/año entre 96 y 2000 (369). Fletcher et al., en el Reino Unido observaron un incremento de tres veces durante 2003-2004 (370).

En nuestro estudio los casos diagnosticados aumentaron significativamente de 4 a 29 en niños entre el periodo prevacunal y postvacunal, no observándose diferencias en lo referente a adultos, 12 y 10 respectivamente. Por el contrario si se apreció un incremento significativo en la incidencia de empiema pleural en niños entre los años inmediatamente anteriores a la vacuna, 96-2000 y el tramo final de estudio 2007-2010, en que los efectos de ésta fueron mayores. De 0,63/100.000/personas/año, pasamos a 5,45/100.000/personas/año,  $P < 0,001$ . Los responsables mayoritarios del aumento fueron los serotipos complementarios de la PCV-13.

Los datos del primer periodo son parecidos a los publicados por Espín et al. (371), por esas fechas, en un trabajo realizado en toda la Comunidad de Murcia, donde de 68 infecciones invasoras recogidas, solo un aislamiento procedía de liquido pleural.

Las razones de este aumento en niños no están claras y podrían asociarse a cambios en la práctica de pediatras que estando más sensibilizados actualmente enviaran más muestras de liquido pleural a microbiología, también a cambios de serotipos productores de empiema propios de distintas épocas, a la utilización de antibióticos y mejoras técnicas diversas. (372). Sin embargo, el

aumento de casos coincide con la tendencia general ya mencionada en otros lugares.

La presencia del serotipo 19A de forma destacada en el segundo periodo, 14 de 43 aislamientos y la ausencia total del primero, coincidiendo también con datos tanto de España (338), como de otros países donde ha emergido a partir de la vacunación, nos hace pensar en una muy probable relación. El segundo serotipo en frecuencia, el 3, no varió en todo el estudio como ocurre en otros trabajos (350). Sin embargo el serotipo 1 (4 cepas) en nuestro caso, no ha aumentado tanto como lo ha hecho en diversas publicaciones, donde ocupa el primer lugar, incluido algunas regiones españolas, como en el trabajo de Obando (373), que reúne datos de Barcelona, Sevilla y Málaga. Allí de 111 cepas recuperadas el 48% correspondían al 1, seguido por el 7F, 13% y el 3, 11%. En cuarto lugar se situó el serotipo 5, que no aparece en nuestra serie en ningún tipo de muestra invasora desde antes de 1998. En un estudio realizado en Madrid (366), el serotipo 1 supuso el 38% de casos de empiema, mientras que el serotipo 19A estaba más ligado a infección no respiratoria. El trabajo nacional más amplio es el de Fenoll et al. (338), que recoge datos de toda España desde 1997 a 2008. En él se demuestra una significativa reducción de serotipos vacunales a lo largo del tiempo y un incremento paralelo del 19A en adultos y niños y del 1 en adultos.

Byington (369), et al., detectaron el serotipo 1 como el más frecuente en la era postvacunal, 46% de aislados, seguido del 3, 20% y 19A ,14%. En una publicación del Reino Unido 18 de 27 empiemas infantiles estaban producidos por el serotipo 1 (370).

## INFECCION INVASORA

La incidencia de enfermedad invasora por neumococo esta infraestimada en la mayor parte de estudios publicados ya que hasta hace poco tiempo no se empleaban técnicas moleculares que tienen una alta sensibilidad que no se altera por la imposibilidad de obtener muestra adecuada, como en la neumonía, o por la escasez de la misma en otros casos como la endoftalmitis, o por el tratamiento antibiótico que una alta proporción de pacientes ha recibido previamente a su llegada al hospital donde en la práctica totalidad de los casos se realiza el diagnóstico.

Resti et al., han comparado en paralelo la eficacia del cultivo y la PCR en tiempo real (RT-PCT), en una serie de 83 niños con neumonía, sepsis-meningitis y artritis, en la que parte de ellos (50%) habían recibido tratamiento antibiótico antes de su admisión en el hospital. Los resultados de los cultivos fueron positivos en el 21,4% de pacientes tratados previamente y en el 46% a los que no se les había administrado antibióticos. La técnica molecular fue más sensible que el cultivo en cualquier tipo de enfermedad estudiada, pero particularmente en los pacientes con neumonía, en los cuales la diferencia fue estadísticamente significativa (374).

También en otro estudio del mismo grupo, afirman que la incidencia de infección invasora en niños menores de dos años fue de 11,5 por 100.000/personas año y 51,8 por 100.000/ personas/año por cultivo y PCR respectivamente (375). Estas diferencias son también muy marcadas cuando la muestra a estudiar es líquido pleural ya que la presentación del derrame y su consolidación tarda un tiempo durante el cual el paciente ya ha sido tratado con antibióticos,

convirtiendo el cultivo en una técnica con pobres resultados frente a la PCR que no se afecta.

Obando et al. (373), demostraron superioridad de la PCR sobre el cultivo en muestras pleurales, obteniendo un 79% de resultados positivos con PCR en pacientes con cultivo positivo y un 84% en los de cultivo negativo. Además determinados serotipos tradicionalmente sensibles a los antibióticos como 1, 3, 5, y 7 estaban sobrevalorados en los casos de cultivo negativo de su serie, poniendo de manifiesto el sesgo que puede producirse en el número total de casos y en la distribución de serotipos. Esta distribución con mayor representación del serotipo 1 detectado por PCR en los casos de fracaso del cultivo, se contradice con los datos ofrecidos por Picazo et al. (366), que encuentran este serotipo y el 5 más frecuentemente entre los cultivos positivos de su serie, con una teórica mejora para el serotipo 1 del 38% al 52,6% y del 5 del 15% al 32,7% si solo se hubieran considerado las cepas obtenidas a partir de cultivo.

En nuestro estudio solo 16 pacientes se diagnosticaron exclusivamente por PCR, todos a partir de líquido pleural, y los serotipo encontrados estaban repartidos entre 1, 3, 19A, 7F y cuatro no vacunales, que por otro lado también los encontramos al mismo tiempo y habitualmente en cultivo en los últimos años como consecuencia probablemente del fenómeno de remplazamiento que se ha producido tras la introducción de la vacuna PCV-7.

Strachan et al., (376) también confirmaron la superioridad de la PCR sobre el cultivo para el diagnóstico de empiema en niños, con un 21,4% de resultados positivos por el método tradicional y un 62,8% por técnica molecular. Igualmente Tarragó et al., demostraron un incremento en los diagnósticos de empiema con

una PCR que fue positiva en el 87,5% de 88 líquidos pleurales con cultivo negativo detectando también los serotipos 1, 7F y 3 como responsables del 34,3%, 10,4% y 11,9% respectivamente. (310).

La Organización Mundial de la Salud estima que anualmente, mueren alrededor de un millón de niños menores de 5 años de neumonía, sepsis o meningitis neumocócica en todo el mundo (377).

La incidencia de infección neumocócica invasora en nuestro trabajo se incrementó ligeramente de 8,3/100.000/personas/año en el periodo 96-2000, a 8,5/100.000/personas/año, durante 2007-2010, considerando solo las cepas aisladas por cultivo.

La incidencia de enfermedad invasora en Europa y USA en niños está entre 8-75 casos por 100.000 de población, mientras que en los países en desarrollo es varias veces más alta, de 100 a más de 500 casos por 100.000 de población (107,108). En mayores de 65 años la incidencia de enfermedad invasora neumocócica fue de 48 episodios por 100.000 personas/año durante el periodo 2002-2009 que abarcaba un estudio español, observándose una reducción en serotipos vacunales del 37,2% al 14,6% (313). También en Portugal se ha comunicado una disminución de enfermedad invasora neumocócica por serotipos vacunales en adultos con incremento paralelo por los no vacunales (298).

Los datos de incidencia varían ampliamente dependiendo de factores tales como la edad, área geográfica, raza, nivel económico y condiciones de base. (107).

Varios estudios de USA posteriores a la vacunación masiva con la PCV-7, han probado que la vacuna es segura y eficaz en prevenir la infección invasora en niños. (378,379).

En un ensayo llevado a cabo en Inglaterra y Gales en población general la incidencia de enfermedad invasora neumocócica descendió entre 2006 y 2010, periodo posvacunal, de 16,1 por 100.000 /personas/año a 10,6/100.000/personas /año, lo que suponía una reducción del 34%. Los serotipos vacunales descendieron en todos los grupos de edad, 98% en menores de 2 años y 81% en mayores de 65. No obstante los serotipos no vacunales aumentaron 68% en el primer grupo y 48% en el segundo. La reducción en la población adulta implica un efecto “herd” de la vacuna. (309).

Ensayos realizados con la vacuna de 9 serotipos que añade el 1 y 5 a los de la PCV-7 también han mostrado eficacia en reducir la mortalidad en niños de Gambia (380), y la incidencia de infección respiratoria baja en niños HIV positivos sudafricanos. (381).

## RESISTENCIA SEROTIPOS INVASORES

La resistencia antibiótica de *S. pneumoniae* ha estado durante muchos años sometida a un debate intenso, ya que las normas que se han aplicado para su interpretación “in vitro” fueron discutidas desde finales de los ochenta y comienzo de los 90. Por aquellos tiempos una CMI>0,06 se consideraba se consideraba resistente o intermedia sin especificar en qué procesos había que aplicarla. Pallarés et al., (382), (383) entre otros, comenzaron a publicar datos de pacientes con infecciones neumocócicas no meningéas, especialmente neumonías, que respondían al tratamiento con

penicilina del mismo modo si el neumococo tenía una CMI=2 o si era más baja.

También el punto de corte para el tratamiento de meningitis con cefotaxima ocasionó discrepancias en función de los resultados clínicos que se obtenían. (384, 203, 385).

Después de mucha controversia se llegó a la publicación de normas como las que nosotros hemos considerado (287). Para penicilina oral se mantienen los valores tradicionales, pero para penicilina parenteral se consideran resistentes los neumococos con CMI=>8, para infecciones no meníngeas y => 012 en caso de meningitis.

Para cefotaxima-ceftriaxona también se han producido cambios, <=0,5 sensible para meningitis y <=1 para otras infecciones con una zona de intermedios en 1 y 2 respectivamente. Muy probablemente no serán los últimos cambios en función de los resultados que se vayan obteniendo.

Lo restrictivo de las normas, especialmente para penicilina, originó una corriente de opinión generalizada en la práctica médica que consideraba que los neumococos no debían tratarse con este antibiótico, recomendando en muchas ocasiones el uso de macrólidos y cefalosporinas orales. Estas últimas precisamente están influidas por el comportamiento de la bacteria frente a la penicilina. Así, si un neumococo presenta un grado de resistencia intermedio, las cefalosporinas orales se afectan más y en algunos casos pierden su eficacia. (386,387).

La aplicación de unas u otras normas, evidentemente, cambia los resultados y dificulta las comparaciones (388).

## Penicilina

Siguiendo las ya comentadas nosotros encontramos un 42,69% de resistencia a penicilina desglosado en 36,7 para los de resistencia moderada y 5,99% alta. Las cifras no variaron de forma significativa entre el periodo prevacunal y el posterior, como ha ocurrido en otras zonas (389,298) y en contraste con otros trabajos que observan una reducción. Así Hompton et al. (390), la describen tanto en niños como en adultos mayores de 65 años en Georgia, USA. Tyrrel (189), en Canadá y Kemp (391), en Francia también en niños y adultos.

Lo que sí ha variado en nuestro estudio es la proporción de serotipos causantes de resistencia. En la primera fase el 83,7% de las resistencias se debían a serotipos PCV-7 y solo 1,08% a los seis complementarios y en la segunda las cifras cambiaron disminuyendo los primeros y aumentando los segundos significativamente en ambos casos. Esto es, las resistencias se mantienen porque se ha producido un “reemplazamiento” o sustitución de serotipos y la desaparición de parte de los antiguos se ha visto compensada por el incremento de otros nuevos también resistentes. Especialmente significativo es el caso del serotipo 19A que ha experimentado un incremento notable de un periodo a otro y se ha convertido en el principal responsable del fenómeno. Gertz et al. (392), en 2007 en una población general de USA con una resistencia del 26%, observa que el 19A era responsable del 53% de ella y el resto de no vacunales del 40%. Dos estudios españoles corroboran esta situación en otras zonas del país. (301).

La proporción de cepas resistentes no varió entre los dos periodos para los serotipos de la vacuna PCV-7 ni para los no vacunales,



pero sí que lo hizo de forma significativa la de los complementarios de la PCV-13 del 2,8% al 31,76%,  $p=0,0007$ , a costa principalmente del 19A como se ha comentado. Este incremento se ha asociado a la extensión de diversos clones resistentes, alguno específico de nuestro entorno. (393). El resto de las resistencias a penicilina se presentaron en los serotipos PCV-7 todavía circulantes especialmente el 14 del que las 20 cepas recuperadas en la segunda fase eran resistentes. En los no vacunales los responsables estaban muy repartidos con solo una o dos cepas en cada uno. En otros estudios sin embargo se han descrito resistencia notables en 15A ,23A ,35B y 6C. (392), que nosotros hemos observado en portadores.

### Eritromicina

La tasa de resistencia a macrólidos es incluso más alta que la de penicilina en estudios de España y otros países de Europa como Grecia, Francia, Portugal y Polonia. (394,395).

La eritromicina ha sufrido menos cambios de normas de interpretación, por lo que la comparación con otros trabajos es más sencilla. En un proyecto de vigilancia internacional en 2003-2004, 37,2% de los aislados eran resistentes a eritromicina observándose importantes diferencias geográficas (396). El 32,4% de nuestras cepas presentaban resistencia a eritromicina, con aumento durante la segunda fase pero sin significación estadística, incluso en relación al periodo final 2007-2010.

Por edades se produjo un descenso significativo entre la población infantil, como ya se ha descrito en niños menores de dos años (397).

La proporción de cepas resistentes no varió para los representantes de las dos vacunas, pero había una tendencia al alza. Sin embargo sí que se alcanzaron diferencias significativas en los no vacunales,  $p=0,05$ . Liu (398), en Pensilvania también encontró un incremento de resistencia a eritromicina, al tiempo que descendía la de penicilina. También RichterCID2009 185 informó de incrementos, igual que Horacio en Portugal en población adulta. (298).

Estos resultados contrastan con datos de Alberta, Canadá (189), donde se observó un descenso en la resistencias tanto a eritromicina como a penicilina tras la introducción de la vacuna y en otros españoles en que las tasa de infecciones invasoras por cepas resistentes se mantuvo estable (300, 396).

El porcentaje de resistencia a eritromicina debido a serotipos de la PCV-7 disminuyó significativamente,  $p=0,003$ , al tiempo que aumentaba el de los representantes de la PCV-13,  $p=0,0004$ , sin que variase la de los no vacunales. Esto supone que el descenso de los serotipos prevacunales resistentes ha sido compensado por la aparición de otros que cubre la PCV-13, especialmente de nuevo el 19A, responsable de gran parte de infecciones postvacunales con neumococos resistentes de este grupo. Este hecho se repite en otros estudios (184, 338,398).

De la revisión de las CMI obtenidas frente a eritromicina, podemos intuir que la mayoría de cepas presentaban el mecanismo de resistencia ligado al gen *ermB*, puesto que la población con  $CMI>16-32$  era predominante y este es el fenotipo que se asocia a él. No obstante en algunos casos la resistencia alta puede deberse a una combinación del gen anterior con los del grupo *mef*. En España y otros países europeos predomina el primero que afecta a

la metilasa y produce resistencia cruzada a macrólidos lincosaminas y estreptograminas (397, 399, 400) y va asociado frecuentemente a resistencia a tetraciclina (401,397).

### Cefotaxima

Con las normas restrictivas aplicadas, frente a cefotaxima observamos una resistencia del 18,8%, sin que hubiera diferencias al comparar época o edad. Tasas similares se han publicado tras la vacunación, en Francia (391) y Canadá (311).

En cuanto a serotipos destacan las resistencias de los vacunales, especialmente el 23F, 76%, y entre los no vacunales la mitad de las cepas del serogrupo 15 y un 22% del 19A.

Cabe destacar que 48 aislados estaban situados justo en el punto de corte elegido por nosotros, lo que resulta preocupante, ya que en las infecciones meníngeas estaría en el límite de seguridad establecido y cualquier diferencia metodológica podría inclinar esas cepas hacia el lado de dudoso éxito terapéutico.

Solo 3 cepas tenían CMI=2 que las define como intermedias y ninguna 4 o más que describe a las resistentes, resultado similares a los ofrecidos en un estudio del Reino Unido (402).

En definitiva la resistencia a cefotaxima en nuestro ensayo no debe ser motivo de preocupación en lo referente al tratamiento de infecciones no meníngeas puesto que respetando las normas actuales no encontramos ninguna cepa resistente. Sin embargo, junto a la resistencia observada, 18% debemos recordar el elevado número de cepas que están en una CMI=0,5, lo que sugiere seguir

las recomendaciones de tratamiento combinado con vancomicina hasta conocer los datos referentes a cefotaxima.

En el caso de las cefalosporinas orales la cuestión es distinta, ya que como se ha comentado presentan menor actividad que cefotaxima y se afectan fácilmente con el aumento de CMI a penicilina (386,387).

### Tetraciclina y cloranfenicol

Estos dos antibióticos son poco utilizados en nuestro país, especialmente el segundo que prácticamente ha desaparecido, aunque puede ser una alternativa en infecciones graves en otros países

Probablemente como consecuencia del bajo uso entre otras razones, se ha producido un descenso estadísticamente significativo en las resistencias entre las dos fases, tanto para tetraciclina como para cloranfenicol. La mayoría de cepas resistentes a tetraciclina también lo eran a eritromicina porque los genes de resistencia viajan en los mismos transposones (396).

### Resistencia combinada

En el primer periodo un 26% de cepas presentaban resistencia combinada penicilina- eritromicina, principalmente entre los serotipos vacunales y el serogrupo 15. La cifra en la segunda parte no varió, aunque a los serotipos de la PCV-7 se sumaron 6A y 19A, este último en primer lugar. Tasas de resistencia a eritromicina mayores entre las cepas penicili-R que entre la penicilin-S son habituales. (397).

La resistencia a eritromicina en cepas sensibles a penicilina fue moderada, predominando los serotipos 6A y 19A y casi ausencia de los vacunales.

No encontramos ningún neumococo resistente a linezolid, rifampicina, vancomicina y levofloxacino, aunque de este último circulan cepas en comunidades cercanas desde que se generalizó su uso. (403,404).

En resumen, los cambios observados en las resistencias en nuestra Comunidad parecen estar relacionados al uso de la vacuna heptavalente, aunque otros factores, tales como la presión antibiótica y la emergencia y extensión de clones resistentes puedan también influir.

La aplicación de una nueva vacuna que protege frente a trece serotipos, probablemente estará ejerciendo su influencia sobre la situación de serotipos y resistencia actuales por lo que será necesario seguir realizando estudios de vigilancia.

# ***Segunda Parte***

**ESTUDIO DE PORTADORES  
NASOFARÍNGEOS DE  
*STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*  
EN LA REGIÓN DE MURCIA**

# INTRODUCCIÓN

*S. pneumoniae* es el principal agente etiológico de infección invasora en niños, particularmente en los menores de cinco años y en personas ancianas (95). La nasofaringe es el nicho donde se asientan los diversos serotipos de neumococos existentes, colonizándola durante periodos variables y sirviendo como punto de partida para producir infecciones. De hecho la enfermedad neumocócica va siempre precedida por la colonización con la cepa homóloga (66). Además, la colonización da lugar a la extensión horizontal del microorganismo dentro de la comunidad, como puede observarse por ejemplo en hospitales, guarderías, recintos militares o prisiones, donde la acumulación de personas favorece la transmisión de cepas (405, 406, 407,408). Los niños pequeños presentan la incidencia más alta de colonización, considerándose este grupo como el principal vector para la diseminación horizontal en la comunidad (409).

La aparición reciente de nuevas vacunas conjugadas ha contribuido eficazmente a prevenir infecciones invasoras en niños, (410) manifestando además un efecto protector contra infecciones de las mucosas tal como la otitis media aguda, una entidad frecuentísima en esta población (411,410).

No obstante, estos efectos beneficiosos se han visto obstaculizados por el “reemplazamiento”, sustitución, en la nasofaringe, de los serotipos vacunales por otros distintos como consecuencia de la vacunación. (412,413).

En nuestro país, en el año 2001, cuando se introdujo la PCV-7, solamente se había realizado un estudio de colonización en

escolares de 6 años (414). Este hecho, unido a la controversia creada en algunas comunidades como la nuestra, acerca de sus indicaciones y la no inclusión en calendario oficial, con la excepción de Madrid en 2006, conlleva que las coberturas vacunales fueran dispares y estimadas, por lo que los cambios ocurridos en los portadores sanos, podían ser variables en las distintas comunidades. Se hacían necesarios nuevos estudios de portadores previos a la introducción de las nuevas vacunas conjugadas decavalente y trecevalente, con aumentos en la cobertura de los serotipos causantes de enfermedad invasora. Un conocimiento previo de la situación era, pues, imprescindible para poder evaluar los posibles cambios que se produzcan en los portadores y su incidencia sobre la enfermedad invasora.

## OBJETIVOS

- 1.-Conocer el porcentaje de portadores nasofaríngeos en la población pediátrica de nuestra comunidad y su relación con edad, sexo, estación y estado vacunal.
- 2.-Estudiar la evolución de los distintos serotipos que colonizan a dos cohortes de niños de uno y cuatro años en nuestro medio tras la vacunación con PCV-7, comparándolos con datos previos.
- 3.-Analizar los patrones de resistencia de las cepas obtenidas de portadores.



4.-Definir la cobertura de la nueva vacuna PCV-13 y saber si nuevos serotipos fuera del alcance de ésta podrían estar colonizando a los pacientes.

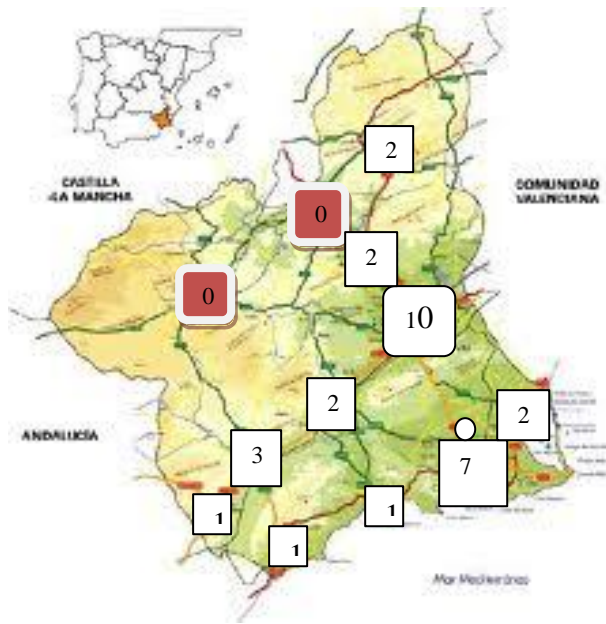
## MATERIAL Y METODOS

A través de una convocatoria de la APERMAP (Asociación de Pediatría Extrahospitalaria y Atención Primaria de la Región de Murcia) se han incorporado al estudio 60 pediatras que, de forma voluntaria, han querido participar en él. Por otra parte se solicitó la colaboración y participación de los distintos servicios de microbiología de los hospitales públicos para los que teníamos pediatras que participaban en el proyecto y que podían remitirles sus muestras, incorporándose todos al mismo.

Hemos dividido el número de pediatras participantes por áreas hospitalarias en función de la población que representan, intentando, dada la voluntariedad de la participación, que esté representada toda la población con el siguiente reparto: Cartagena-Mar Menor H U. Santa Lucía 13 pediatras y hospital Los Arcos 7 pediatras; en Murcia el H.U. Virgen de la Arrixaca 10 pediatras, el H.U. Morales Meseguer 10 pediatras y el H U Reina Sofía 8 pediatras; en Lorca el H U. Rafael Méndez 7 pediatras H; y en Yecla el H. de Yecla 5 pediatras. Quedan excluidos del estudio, por falta de pediatras interesados las áreas correspondiente a los hospitales de Caravaca y Cieza que entre ambos suponen aproximadamente

el 10% de la población de la comunidad, lo que no interfiere en la validez de los resultados.

Mapa de las áreas cubiertas por el estudio



## DISEÑO

Estudio multicéntrico transversal.

Criterios de inclusión: Niños de 12 meses (10-14 meses) y de 4 años (3,5-4,5 años) vacunados o no, con vacuna antineumocócica conjugada heptavalente (PCV-7).

Criterios de exclusión: se excluyeron aquellos sujetos que presentaban proceso infeccioso respiratorio agudo febril, y

enfermedades crónicas de base como cardiopatías congénitas con repercusión hemodinámica, fibrosis quística, portadores de traqueotomías o inmunodeprimidos.

## RECOGIDA DE DATOS

Se realizó en dos fases:

- 15 de junio- 15 de agosto de 2009, que denominaremos “verano o 2009”
- 15 de enero- 15 de marzo de 2010, que denominaremos “invierno o 2010”

Tras explicación verbal, se recogió consentimiento informado y se realizó un cuestionario, que incluía los siguientes datos: centro de salud, fecha de recogida, edad, sexo, vacunación antineumocócica, lactancia materna y factores de riesgo como escolarización/asistencia a guardería, antibióticos en el último mes, padre fumadores y número de hermanos. Se consideraron como vacunados a los de un año con al menos dos dosis de vacuna conjugada heptavalente y a los de cuatro años con al menos dos dosis habiendo recibido una de ellas después del año de edad. La información se recogió de forma preferente de la historia clínica y sólo de información verbal de los padres si no existían datos en la historia. El proyecto fue aceptado por la Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia (FFIS) y becado por el programa “Proyectos Fundación Cajamurcia” con la beca FFIS/CM09/037.

# Procesamiento microbiológico de las muestras

## Muestras

La toma de las muestras, exudado nasofaríngeo, se realizó mediante torunda pernasal flexible, de acuerdo a procedimiento estándar, por personal de enfermería de las consultas de pediatría de cada centro. Se remitieron a su hospital de área, en medio de transporte, donde se sembraron en placa de agar-sangre e incubaron durante 24-48 horas en atmósfera de CO<sub>2</sub> (5-10%) a una temperatura de 37 ° C.

## Identificación Bacteriana

La identificación del neumococo se efectuó mediante la morfología de la colonia, alfa hemólisis en agar-sangre y sensibilidad a la optoquina. Tras su aislamiento e identificación preliminar, todas las cepas se enviaron al Hospital Virgen de la Arrixaca donde se completó su identificación mediante solubilidad en sales biliares, optoquina y aglutinación en caso necesario. Posteriormente se congelaron en skin milk a -80°C. Una vez terminada la recogida de muestras, se descongelaron las cepas sembrándose nuevamente en agar-sangre para realizar el estudio de sensibilidad, el serotipado presuntivo y el envío al Laboratorio Nacional de Referencia de neumococos de Majadahonda, Madrid, donde se procedió al serotipado definitivo por el método de Quellung.

## Estudio de sensibilidad

Se realizó por el método de difusión de gradiente en medio sólido mediante tiras de E-test (bio-MeriuX), en placas de Muller-Hinton sangre, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Brevemente, Tras dos resiembras de la cepa a testar en agar sangre de caballo, se preparó un inóculo equivalente a 0,5 de la escala de Mc Farland. Se sumergió una torunda en la suspensión exprimiendo el contenido en las paredes del tubo y posteriormente se sembró en sábana en una placa de Muller-Hinton sangre en tres direcciones. Tras dejar secar unos minutos se colocaron tiras de E-test de penicilina y cefotaxima. En otra placa igual se aplicaron discos de los restantes antibióticos ensayados (eritromicina, clindamicina, vancomicina, linezolid, rifampicina y levofloxacino). Ambas placas se incubaron en CO<sub>2</sub> a 37°C durante 24h. Las lecturas se hicieron midiendo los puntos de corte de las tiras o discos siguiendo las recomendaciones del CLSI 2010 (287), para su interpretación. Como cepa control se utilizó, *S. pneumoniae* ATCC 49619 de forma habitual en los distintos días en que se realizaron las pruebas. Para la penicilina y cefotaxima se aproximó la lectura a la dilución doble siguiente, en caso necesario.

## SEROTIPADO PRELIMINAR

El serotipado preliminar se llevó a cabo mediante el Pneumotest-látex. (Statens Serum Institut, Coopenague, Dinamarca). Este es un simple procedimiento de látex aglutinación para serogrupo/serotipado de *S. pneumoniae*. Las cepas son clasificadas como serogrupo, serotipo o pertenecientes a un pool. El reactivo viene en envase listo para usar y permite la clasificación del 90-95% de neumococos aislados de pacientes.

El kit contiene 14 viales con partículas de latex ligadas con antisueros neumococicos obtenidos en conejos. La reactividad cruzada se ha eliminado por absorción. Junto a los reactivos e instrucciones de manejo se facilita una carta de interpretación según los resultados de los diferentes viales.

La reacción puede llevarse a cabo a partir de un cultivo en Todd-Hewitt de una noche de incubación o directamente de colonias recientes de placas de agar sangre. Nosotros utilizamos este segundo procedimiento. Para ello se colocaron 10 microlitros de buffer fosfato en el círculo de una tarjeta cerca de la gota de látex y una colonia de neumococo en la gota de buffer. A continuación se mezclaron las dos gotas extendiéndolas para cubrir todo el círculo. La tarjeta se rotó durante 5-10 segundos observando en busca de aglutinación. Se repitió la operación con los látex adecuados y se procedió a la clasificación con la carta correspondiente facilitada por el fabricante.

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

Boldface indicates that the group/type is included in the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine.

( ) states types within a group.

## PORTADORES PREVIOS A 2001

Durante el periodo 1998-1999 recogimos muestras nasofaríngeas de niños que visitaron las consultas ambulatorias de pediatría del área de influencia de nuestro hospital en el marco de un estudio que se inició para comparar resistencias a eritromicina con cepas invasoras. Los niños eran menores de cinco años y no debían presentar enfermedad respiratoria en el momento de la recogida ni tener enfermedades de base o ingresos previos en los dos últimos meses. De ese grupo pudimos recopilar 132 cepas de neumococo a los que se les determinó el serotipo-serogrupo y la resistencia antibiótica frente a eritromicina por el método de dilución en agar. Posteriormente las cepas que se mantenían congeladas, se resembraron para estudiar la sensibilidad por el método de E-test frente a diversos antibióticos entre ellos penicilina y cefotaxima. Estos datos los emplearemos como referencia de las resistencias y serotipos de portadores anteriores a la vacunación. En el apartado de resultados se incluyen dos tablas.

## MÉTODO ESTADÍSTICO

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

Las comparaciones entre grupos y las relaciones entre datos cualitativos se realizaron mediante un análisis de tablas de contingencia con el test de la  $\chi^2$ .



De Pearson, complementado con un análisis de residuos para ver el sentido de la diferencia/ dependencia.

Cuando el número de casos era insuficiente los valores de la significación (p) se obtuvieron aplicando el test exacto de Fisher (TEF).

## Resultados

De todas las variables estudiadas, nos centraremos exclusivamente en los datos relacionados con, edad, sexo, estado vacunal, estación, serotipos y resistencias, prescindiendo del resto.

### Serotipado preliminar

Empleando el método Pneumotest-latex, (Statens Serun Institut, Dinamarca), clasificamos los neumococos de forma rápida, llegando hasta la categoría de serogrupo en la mayoría de casos según el esquema de trabajo que el fabricante presenta. Estos resultados no pudieron completarse para llegar a la subdivisión en serotipos porque necesitábamos sueros adicionales específicos para realizar la reacción de Quellung y dado el elevado importe que tenían no pudimos cubrirlo con la asignación de la beca solicitada. Por ello se completó su clasificación en el Centro Nacional de Microbiología de Majadahonda.

No obstante, debemos señalar que aproximadamente un 10% de nuestros resultados fueron corregidos por los datos del laboratorio

de referencia. Esta discrepancia, en nuestra opinión, puede deberse a dos causas, la primera la obsesión por ahorrar reactivos debido a su coste que pudo hacernos dar por definitivos algunas aglutinaciones prematuras, y la segunda la existencia de colonizaciones que nosotros no contemplamos inicialmente por considerar que las cepas procedentes del resto de hospitales venían puras. Ninguna de las dos circunstancias pudimos comprobar por agotamiento de los reactivos y el presupuesto.

## Serotipos de portadores

Un total de 1563 niños participaron en el estudio de portadores, controlándose 833 en verano, 2009, y 730 en invierno, 2010. La cohorte de 1 año estaba formada por 729 y la de 4 años por 834. El grupo masculino reunía 806 personas y el femenino 757. Se aisló neumococo en 488 muestras lo que supuso un porcentaje global de portadores del 31,22%. Tabla 1.

Encontramos diferencias significativas entre los aislamientos de verano e invierno, 24,60%, frente 38,76%, respectivamente,  $p < 0,00001$ , considerando la población en conjunto y también si separábamos por edad. Tabla 2. En el grupo de 4 años y en el de niñas, las tasas de recuperación fueron también superiores pero sin alcanzar significación estadística. Tablas 3 y 4.

Los resultados respecto al estado vacunal pueden verse en la tabla 5. Consideramos como vacunados todos aquellos que habían recibido al menos una dosis de PCV-7, ya que los datos no cambiaban si teníamos en cuenta otras dosis. Entre estos últimos,

de 964 pacientes recuperamos 283 neumococos, 29,35%, y de los 598 no vacunados, 205, que representan un 34,28%  $p=0,041$ .

Comparando edad y estado vacunal las diferencias seguían siendo significativas en la cohorte de un año,  $p=0,026$ , pero no en la de cuatro,  $p=0,51$ . Tabla 6.

De todos los neumococos aislados, 488, perdimos 121 cepas por diversas circunstancias como, rotura de congelador, contaminación, muerte en alguno de los traslados etc. Por ello al hablar de serotipos tomaremos 343 como cifra de referencia y de resistencias 367.

La distribución por serotipos está en las tablas 7A y 7B. En ellas podemos ver que se identificaron 34 serotipos diferentes, cubriendo el 83,38% los doce más frecuentes. El orden en cuanto al número de aislamientos fue 6A (10,49%), 19A (9,03%), 15A, 23B y 11A, siguiéndoles a continuación varios con un 4,66%.

Recuperamos 44 cepas, 12,8%, incluidas en la vacuna PCV-7 repartidas entre cuatro serotipos, 14 y 23F (16 cepas cada uno), 19F, 10 y 6B, 2. Otros 83 aislamientos, 24,19%, se distribuían entre los 6 complementarios de la PCV-13, destacando los serotipos 6A y 19A con 36 y 31 cepas respectivamente. Sumando ambos grupos se obtienen 127 aislados que quedarían cubiertos por la PCV-13, lo que supone un 37,02% de cobertura. Tablas 7A, 7B y 8.

Respecto al estado vacunal, observamos que 19 cepas pertenecientes a la PCV-7 se aislaron a partir de pacientes vacunados y 25 de no vacunados  $p = 0,036$ . Entre los serotipos no vacunales las diferencias más acusadas las encontramos en el 6A, con un 7,07% de recuperaciones procedentes de vacunados y un 15,77% de los que no habían recibido ninguna dosis,  $p = 0,016$ .

Entre los de la PCV-7 la disminución del 14 también fue significativa,  $p = 0,028$ . Tabla 9.

Comparando los serotipos más frecuentemente aislados en este estudio con los responsables de infección invasora en el periodo 2007-2010, Tabla 10, podemos comprobar que el 19A, 6A, y 14 tienen un nivel de representación en ambas series destacado. Sin embargo, llaman la atención en sentido contrario 15A, 23B, y 6C que se encontraron entre los habituales de la nasofaringe de los niños y apenas aparecieron en la serie de invasores. Todavía más llamativos son 11A y 15B que representan el 6,10% y 4,66% de los portadores y no aparecen en ningún caso de los invasores. Las diferencias fueron significativas para 19A, más invasor y 15A, 23B, 11A, 6C y 15B más colonizadores. Por otro lado, no se recuperaron cepas del serotipo 1 a pesar de estar produciendo infecciones invasoras por esa época. Algo parecido sucedió con el 7F del que solo se aislaron dos cepas de las 343 de portadores.

## Resistencia en portadores

En este apartado utilizaremos dos cifras de referencia, 343 cuando intervienen las cepas serotipadas con antibiograma y 367 si no influyen los serotipos

### Penicilina

La resistencia global de las 367 cepas ensayadas en el estudio de portadores de 2009-2010, fue del 28,06%.

En la tabla 11, podemos ver la comparación de resistencias entre los 132 casos previos a la vacuna y los 343 del trabajo llevado a cabo entre 2009 y 2010. El descenso es muy acusado entre los dos estudios, disminuyendo los moderadamente resistentes de 59,5% a 27,52,  $p < 0,001$ , y los resistentes de 15,9 a 0,54%,  $p < 0,001$ .

Los principales serotipos implicados en la resistencia de los portadores de 2009-2010 pueden verse en la tabla 12. El 19A con un 54,8%, se encontraba a la cabeza, seguido del 15A y 6A. Otros serotipos también con resistencia, tabla 13, pero con pocas cepas, estaban representados por 14, (14 de 16), 19F, (6 de 10) y 23F (3 de 16) que junto con una de dos cepas del 6B, totalizaban 24 de las 44 pertenecientes a la PCV-7, 54,05% de resistencia. Entre los no vacunales destaca el 35B con 10 de 14 aislamientos no susceptibles y los no tipables 8 de 17.

En esta serie había dos aislamientos con CMI= 2, y 101 con resistencia moderada. Si restamos diez no serotipados, un 25,80% correspondían a serotipos de la PCV-7, 29,03% a los seis complementarios de la PCV-13 y el resto, 45,16% a no vacunales. Tabla 14.

Entre los portadores anteriores a 2001 el serotipo 14 fue el más resistente 100%, teniendo que referirnos a serogrupos en los casos que le siguen 23, 6 y 19 con cifras porcentuales de 91, 86 y 78 respectivamente. Tabla 15. En conjunto estos descritos representaban >80% del total de la serie.

En el estudio de 2010 no encontramos diferencias significativas en la resistencia a penicilina en los grupos de vacunados-no vacunados, verano-invierno y niños-niñas. Sin embargo sí que existían al comparar la cohorte de 1 año, 33,75%, con la de 4 años, 23,78%,  $p = 0,036$ . Tablas 15, 16, 17, 18 y 19.

## Eritromicina

La resistencia en portadores descendió de 59,8% antes de 2001 a 45,77% en 2009-2010,  $p < 0,001$ . Tabla 11. Por serogrupos destacan 6, 19 y 23 en la primera fase con cifras superiores al 50% en los tres casos (Tabla 15) y 15A, 11A, 19A, 6C, 6A, y 15B, cuya resistencia oscilaba entre el 84% del primero y el 31,25% del último, en la segunda fase, Tabla 12. Otros con menor número de cepas que también tenían resistencias en este periodo fueron, 33F (7 de 7), 23A (9 de 14) y no tipables, (10 de 17), Tabla 13.

La proporción de cepas resistentes entre los serotipos PCV-7 fue del 68%<sup>5</sup>, la de los complementarios de la PCV-23 del 46,9% y la de los no vacunales del 43%.

De los 343 aislamientos conseguidos entre los portadores de 2009-10, 162 eran resistentes a eritromicina, de ellos el 18,51% pertenecían a la primera vacuna, un 24,07% a los seis serotipos complementarios de la segunda y un 57,40% a un grupo que no cubren ninguna de las dos. Tabla 20.

No encontramos diferencias significativas en la resistencia a eritromicina en los grupos de vacunados-no vacunados, edad 1 o 4 años y verano-invierno. Si que existían en la cohorte niño-niñas, 38,88% frente a 52,68% respectivamente,  $p = 0.008$ . Tablas 16, 17, 18 y 19.

La resistencia a clindamicina se detectó en 110 cepas, 29,97%, destacando los serotipos 19F y 33F en los que todas las cepas eran resistentes, 10 y 7 respectivamente, el último de ellos con susceptibilidad total a penicilina. También es de destacar el 15A con 18 de 25 aislamientos resistentes.

## Cefotaxima

En los portadores del primer periodo, las resistencias (CMI>0,5), estaban representadas en los serogrupos 23, 14, 6 y 19, oscilando del 72,2% al 26,3%, Tabla15. La resistencia global se situó en 32,5%. La disminución con respecto al segundo periodo, 5,99%, fue estadísticamente significativa, P<0.001. Tabla11.

En el estudio de portadores de 2009-10 solo encontramos 22 cepas con CMI>0,5, (5,99%) de las que un 63,6% pertenecían a serotipos de la PCV-7, (10 de ellas al 14) y el resto se repartían entre no tipables, PCV-13 y no vacunales.

Solo 2 aislados presentaban una CMI=2 y ninguna superó esta cifra, no acercándose por tanto a la resistencia real en infecciones no meningéas.

## Resistencia combinada

De las 103 cepas no susceptibles a penicilina, 69 presentaban resistencia a eritromicina, perteneciendo la mayoría de ellas a los serotipos 19A, 12 cepas, 15A y 14, 11 cada uno. Tabla 21. También en este grupo, 17 aislados eran a su vez no susceptibles a cefotaxima (CMI>0,5), con representantes de los serotipos 14, 19F y 23F entre los vacunales y 15A ,19A y NT entre los no vacunales.

De los 254 neumococos sensibles a penicilina, 78 se consideraron resistentes a eritromicina, (21,25% sobre 367) con representación de 20 serotipos distintos, destacando 15A ,11A ,19A ,23A ,6A y 6C. Tabla 22.

Para clindamicina encontramos 60 cepas susceptibles dentro del grupo de 168 resistentes a eritromicina.

Resistencia a linezolid, levofloxacino, rifampicina y vancomicina.

Frente a estos antibióticos no se detectó ningún aislado, de toda la colección, resistente.



# Estudio de portadores

	1	4	SEXO	SEXO	SEXO	TOTAL	%	TOTAL
	AÑO	AÑOS	M	F	F	POSITIVOS	POSITIVOS	SEROTIPADOS
2009	833	446	440	393	393	205	24,60	145
2010	730	388	366	364	364	283	38,76	198
SUMA	1563	834	806	757	757	488	31,22	343

TABLA1

# Distribución de portadores por estación

2009 (Verano)                      2010 (Invierno)                      P

	Nº cepas	%	Nº cepas	%	
Global	205/833	24,60	283/730	38,76	<0,00001
1 año	92/387	23,77	122/342	35,67	0,0004
4 años	113/446	25,33	161/388	41,49	<0,00001

TABLA2

# Portadores según Edad

	1 año(729)	%	4 años (833)	%	P
Portadores	214	29,35	274	32,89	0,132

Total portadores 35,90%

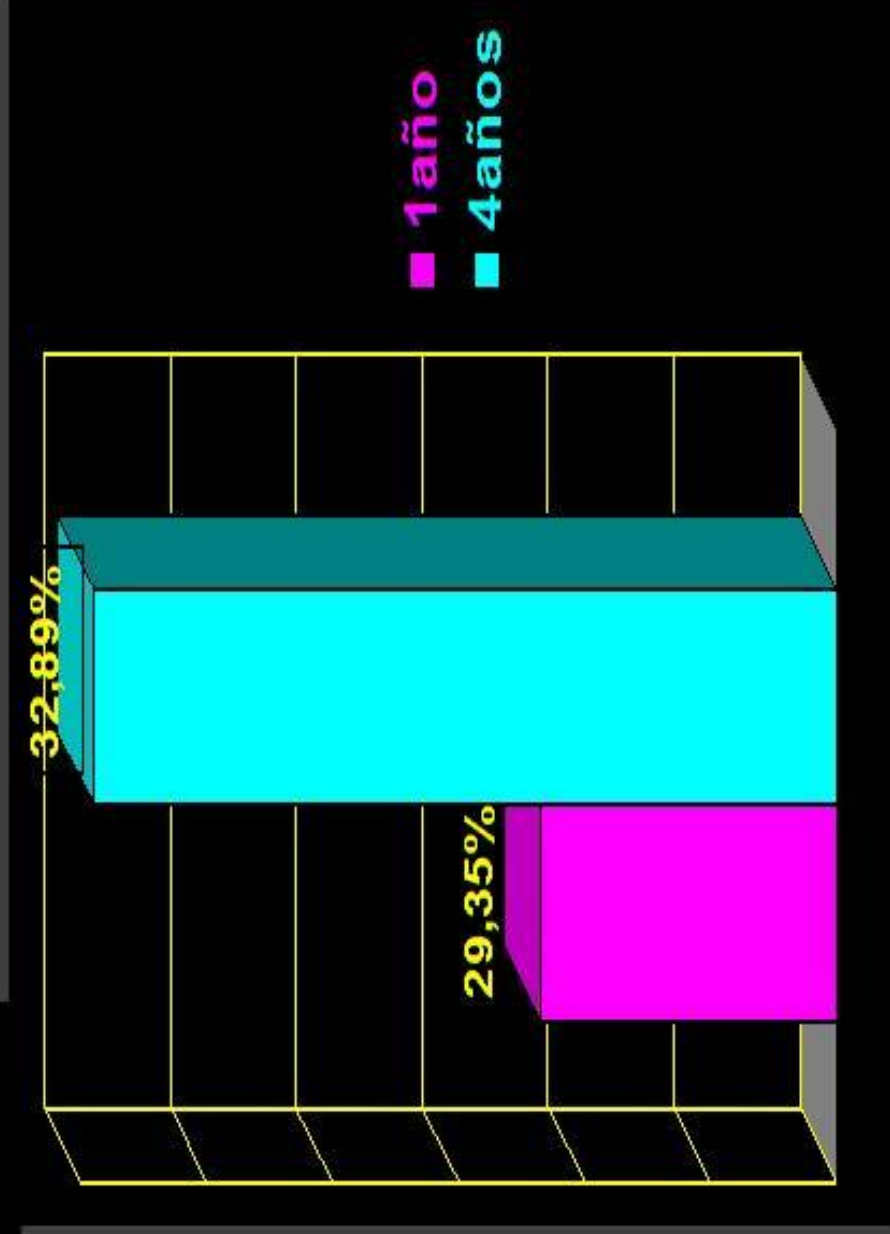


TABLA3

# Distribución de portadores por sexo

Masculino		Femenino		P
Cepas	%	Cepas	%	
237/806	29,40	251/757	33,15	0,110

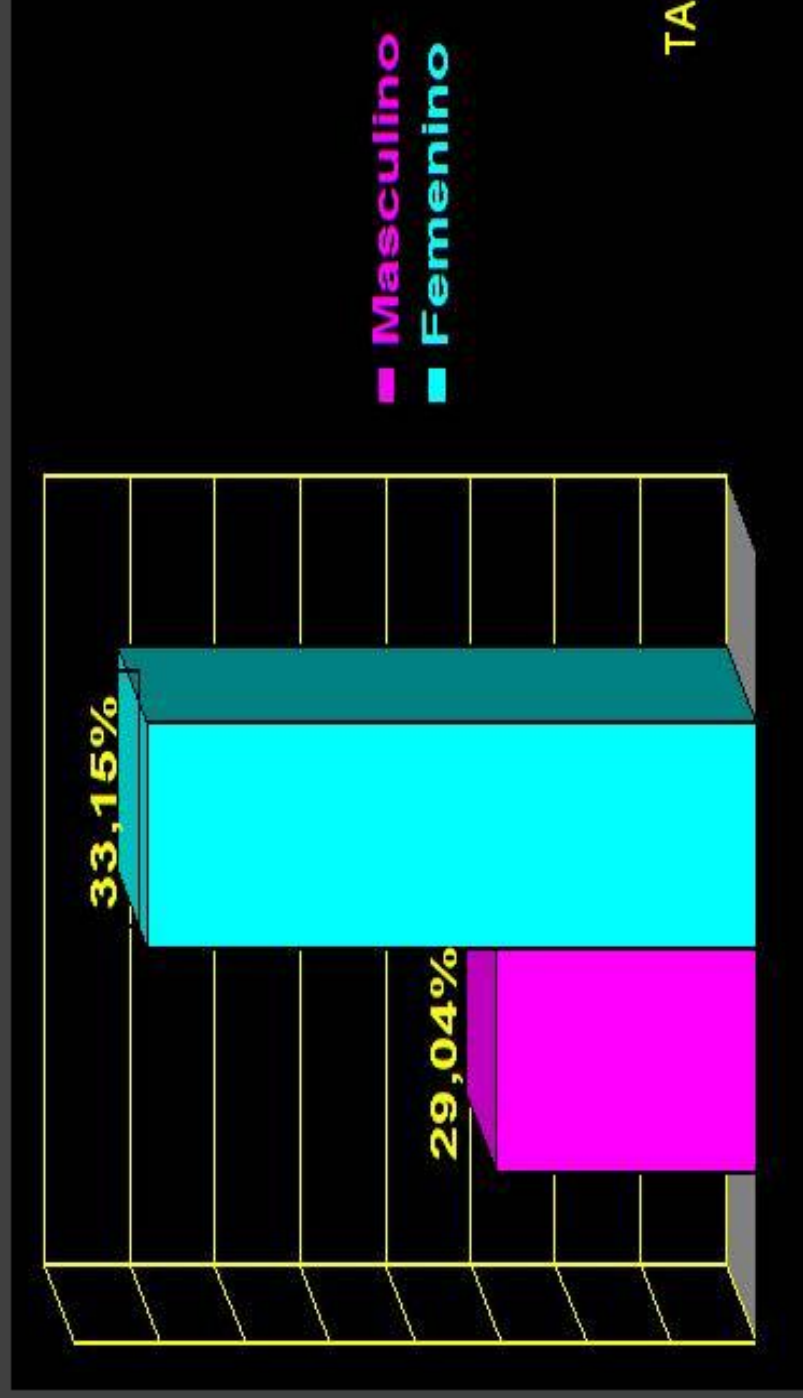


TABLA4

# Portadores según estado vacunal

	Vacunados (964)	%	No Vacunados (598)	%	P
Portadores	283	29,35	205	34,28	0,041

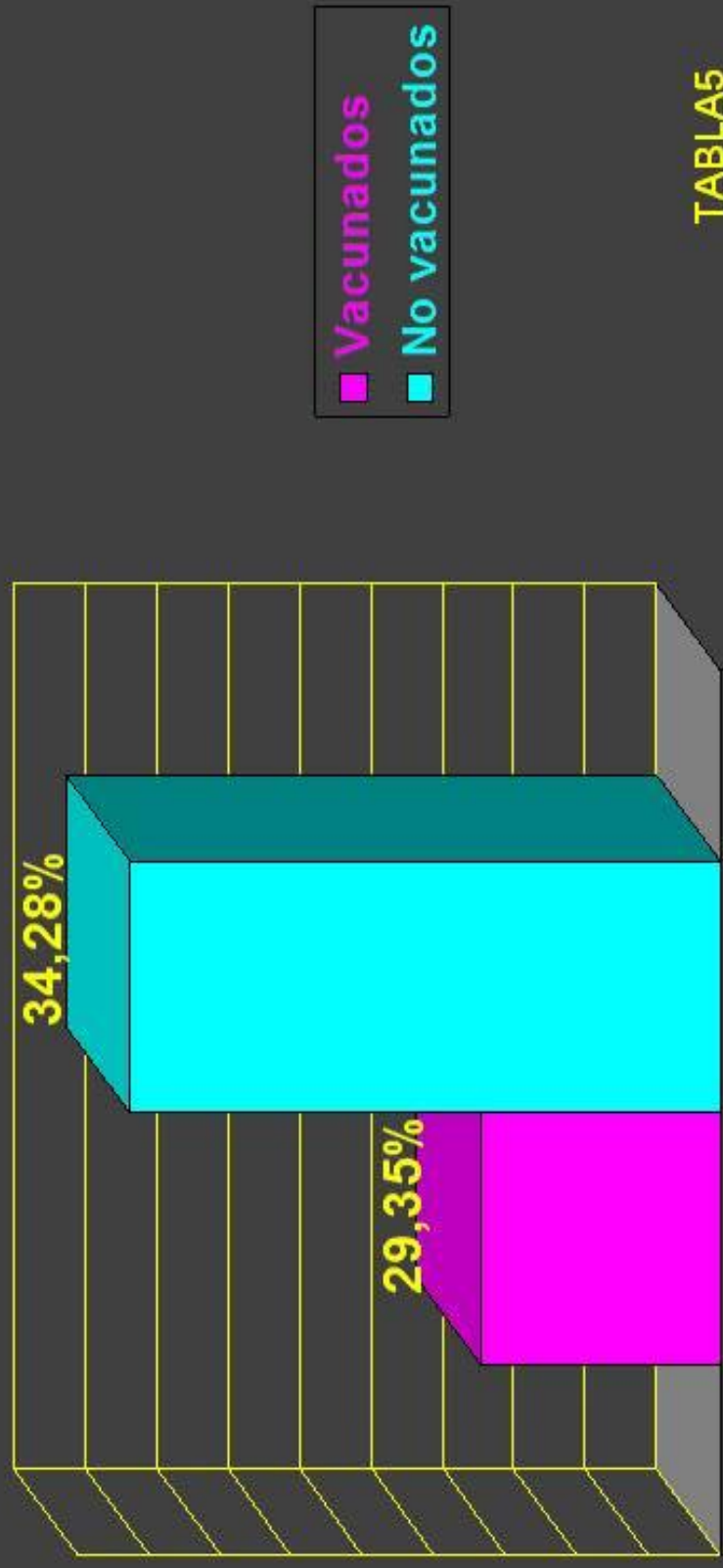


TABLA5



# Serotipos en portadores (I)

<b>Orden</b>	<b>Serotipo</b>	<b>Nº de cepas</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
1º	<b>6 A</b>	<b>36</b>	<b>10,49</b>
2º	<b>19 A</b>	<b>31</b>	<b>9,03</b>
3º	<b>15 A</b>	<b>25</b>	<b>7,28</b>
4º	<b>23 B</b>	<b>25</b>	<b>7,28</b>
5º	<b>11 A</b>	<b>21</b>	<b>6,12</b>
6º	<b>6 C</b>	<b>16</b>	<b>4,66</b>
7º	<b>15 B</b>	<b>16</b>	<b>4,66</b>
8º	<b>14</b>	<b>16</b>	<b>4,66</b>
9º	<b>23 F</b>	<b>16</b>	<b>4,66</b>
10º	<b>23 A</b>	<b>14</b>	<b>4,08</b>
11º	<b>35 B</b>	<b>14</b>	<b>4,08</b>
12º	<b>3</b>	<b>14</b>	<b>4,08</b>

TABLA7A

# Serotipos en portadores (II)

Serotipo	Nº de cepas	Serotipo	Nº de cepas
19F	10	21	3
15C	9	6B	2
10A	8	9N	2
22F	8	7F	2
33F	7	31	2
35F	6	29	1
17F	4	12F	1
24F	4	17A	1
38	3	24A	1
16F	3	8	1
34	3	11F	1

TABLA7B



# Serotipos de portadores cobertura vacunal

PCV-7 cepas 44 12,82%

6 PCV-13 cepas 83 24,19%

Cobertura PCV-13 37,01%

NV 62,99%



■ PCV7 ■ 6PCV13 ■ NV

TABLA8

# Serotipos Portadores según estado vacunal

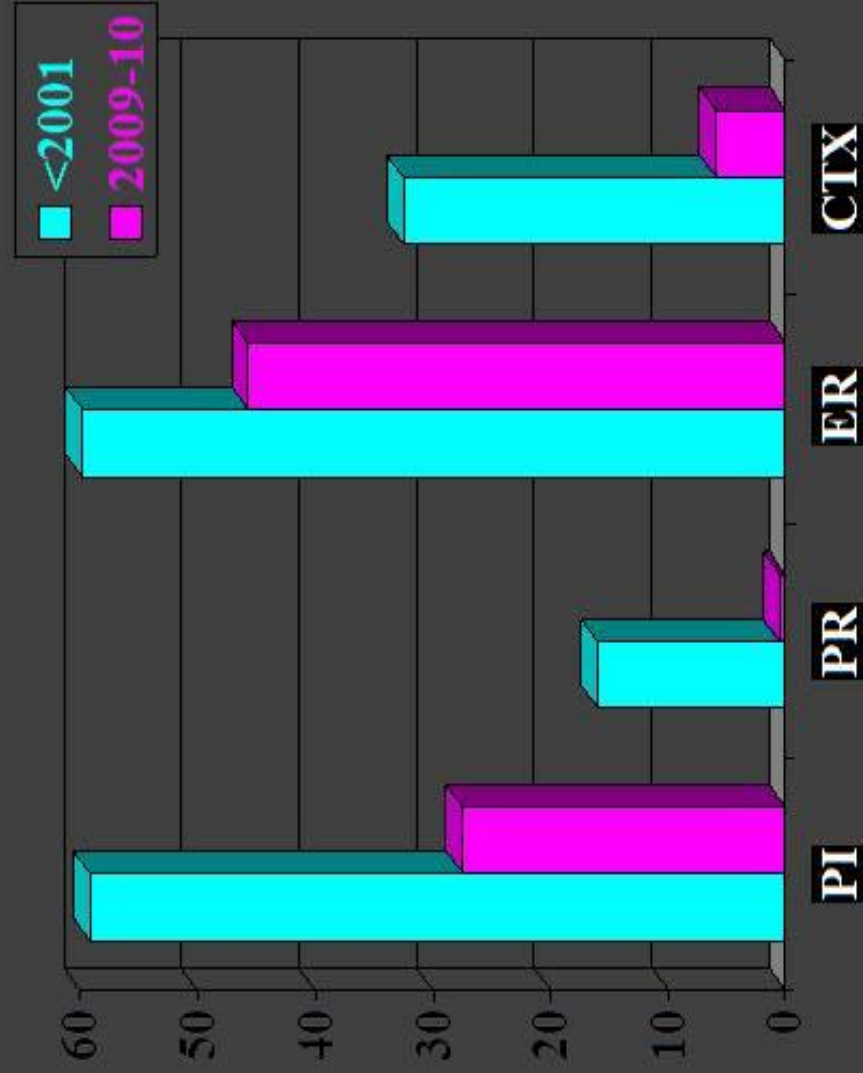
Serotipos	Vacunados (198)		No Vacunados (145)		P
	Nº cepas	%	Nº cepas	%	
14	5	2,52	11	7,58	0,028
19F	5	2,52	5	3,44	0,748
23F	9	4,54	7	4,82	0,903
6B	0	0	2	-	
PCV7	19	9,59	25	17,24	0,036
19A	18	9,09	13	8,96	0,968
6A	14	7,07	22	15,17	0,016
23B	15	7,57	10	6,89	0,811
15A	17	8,58	8	5,51	0,28
11A	16	8,08	5	3,44	0,124

TABLA9

# Distribución Serotipos

	Portadores 2009-2010		Invasores 2007-2010		P
	343 cepas	%	128 cepas	%	
6 A	36	10,49	8	6,25	0,159
19 A	31	9,03	30	23,43	<0,0001
15 A	25	7,28	1	0,78	0,006
23B	25	7,28	2	1,56	0,017
11 A	21	6,10	0	0	0,004
6C	16	4,66	1	0,78	0,05
15B	16	4,66	0	0	0,028
14	16	4,66	10	7,81	0,183
23F	16	4,66	2	1,56	0,175
23 A	14	4,08	2	1,56	0,256
35B	14	4,08	1	0,78	0,08
	<b>230</b>	<b>67,05%</b>	<b>57</b>	<b>44,53%</b>	

# Resistencias en portadores



<2001 2009-10

%

%

P

PI	59,09	27,52	<0,001
PR	15,90	0,54	<0,001
ER	59,84	45,77	<0,01
CTX	32,5	5,99	<0,001

# Resistencias

por serotipo en portadores 2009-10

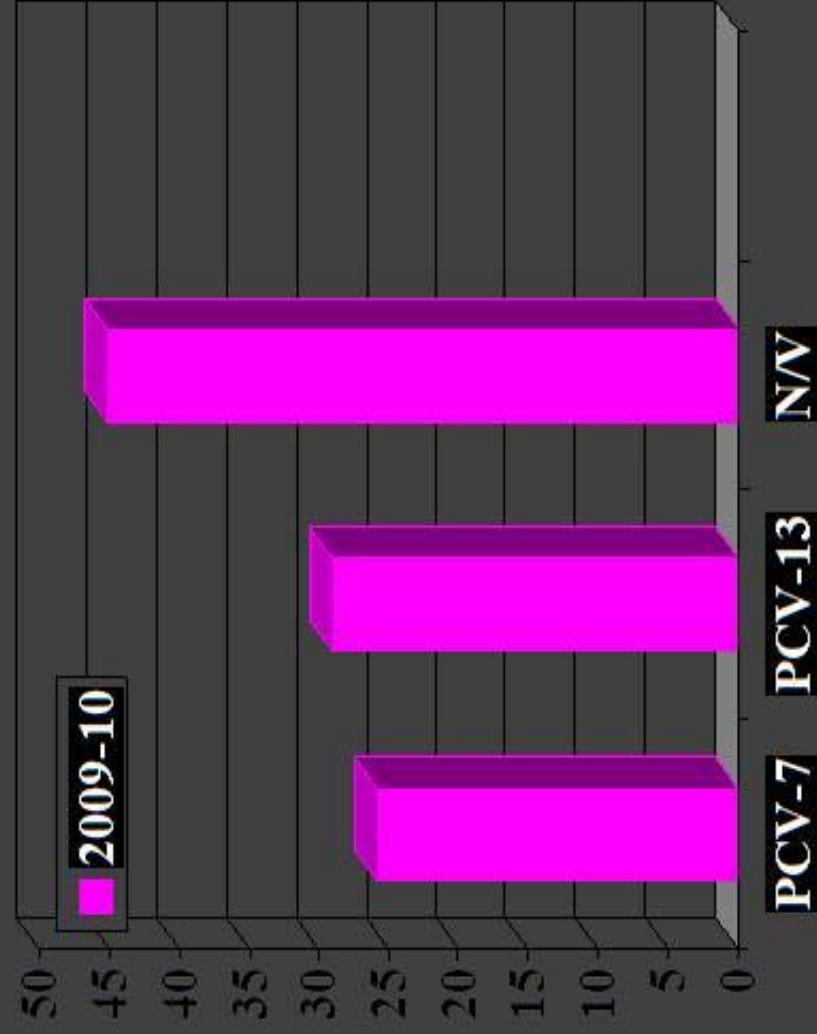
Serotipo	PI(%)	ER(%)
6A	25	41,6
19A	54,8	64,5
15A	44	84
11A	0	80,9
15B	0	31,25
6C	0	43,7

# Serotipos de portadores y resistencia

Serotipo	Cepas	PenI-R	Erl-R
14	16	14	12
23F	16	3	7
19F	10	6	10
19A	31	17	20
6A	36	9	15
15A	25	11	21
35B	14	10	1
15B	16	0	5
6C	16	0	7
23A	14	0	9
11A	21	0	17

TABLA13

# Resistencia a Penicilina por vacunas Portadores (93 cepas serotipadas)



% 2009-10

PCV-7	25,80
PCV-13	29,03
N/V	45,16

RUIZ, J.

TABLA14

# RESISTENCIAS

por serotipo en portadores <2001

**Serotipo**      **PI %**      **PR %**      **ER %**      **CTX %**

<b>14</b>	<b>78,5</b>	<b>21,4</b>	<b>21,4</b>	<b>57,14</b>
<b>19</b>	<b>65,7</b>	<b>13,1</b>	<b>57,8</b>	<b>26,31</b>
<b>23</b>	<b>66,6</b>	<b>33,5</b>	<b>61,1</b>	<b>72,2</b>
<b>6</b>	<b>73,3</b>	<b>13,3</b>	<b>70</b>	<b>43,3</b>



# Resistencias portadores según vacunación

	155 No Vacunados	210 Vacunados	P
Penicilina-R	42	61	0,682
Eritromicina-R	70	98	0,775
CTX(CMI>0,5)	13	9	0,104

# Resistencias portadores por estación

	(159) Verano	(207) Invierno	P
Penicilina-R	46	57	0,769
Eritromicina-R	79	89	0,203
CTX(CMI>0,5)	10	12	0,844

# Resistencias portadores por sexo

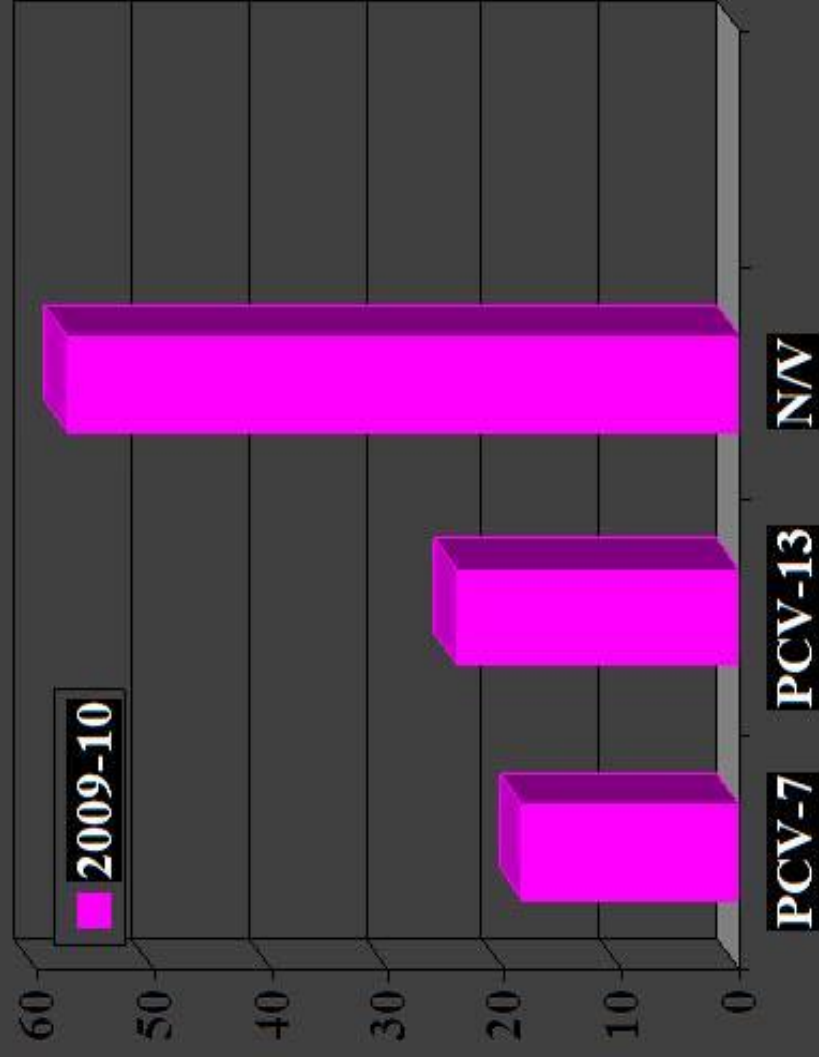
	(186) Niñas	(180) Niños	P
Penicilina-R	52	51	0,936
Eritromicina-R	98	70	0,008
CTX(cMI>0,5)	12	10	0,718

# Resistencias portadores por edad

	(160) 1 año	(206) 4 años	P
Penicilina-R	54	49	0,036
Eritromicina-R	73	95	0,925
CTX(CMI>0,5)	9	13	0,784

# Resistencia a Eritromicina

Portadores (168 cepas R) 152 Serotipados



% 2009-10

PCV-7	18,51
PCV-13	24,07
N/A	57,40

RUIZ, J.

TABLA20

# Resistencia Combinada

## Serotipos

Penicilina-Eritromicina(20,11%)

**69 cepas**      **Serotipo**

**12**              **19 A**

**11**              **14, 15 A**

**7**                **6 A, NT**

**6**                **19F**

**3**                **23F, 24F, NI**

**1**                **17 A, 15C, 24 A, 33F, 6B, 7F**

TABLA21

# Serotipos Portadores Peni S-Eritro R (21,25%)

<b>78 cepas</b>	<b>Serotipo</b>
<b>10</b>	<b>15 A</b>
<b>9</b>	<b>11 A</b>
<b>8</b>	<b>19 A</b>
<b>7</b>	<b>23 A, 6 A, 6C</b>
<b>4</b>	<b>19F, 23F</b>
<b>3</b>	<b>15B, 3, 6B, NT</b>
<b>2</b>	<b>10 A, 33F</b>
<b>1</b>	<b>Otros</b>

# Discusión

## Serotipos Portadores

Ocho años después de la introducción de la vacuna conjugada heptavalente en nuestra Comunidad el porcentaje de vacunación alcanzó al 61,6% de la población pediátrica estudiada. Con esa base obtuvimos un 31,2% de portadores, cifra similar a otros trabajos españoles realizados tras la vacunación, como el de García Vera en Zaragoza,(415), 30,7%, con una cobertura vacunal del 66%, Obando (416) en Sevilla, 33%, y Sánchez Tatay (417) en Barcelona, 31%, y también de otras zonas geográficas como el de Wroe, (418), en Massachussets, 29%. No obstante, las cifras de portadores están influenciadas por diversos factores como, variaciones geográficas, estacionales, como hemos comprobado en nuestro trabajo, edad, condiciones socioeconómicas y principalmente la metodología empleada. (61, 62,63,). Aislados con baja densidad pueden ser más fácilmente detectables usando técnicas de PCR (61, 62,63), que permiten además identificar co-colonizaciones. En nuestro caso no dispusimos de este método y también sufrimos el inconveniente de no centralizar las muestras inicialmente en un solo laboratorio conservándolas en medio líquido congelado como se recomienda internacionalmente (54), al carecer del presupuesto necesario.

Los resultados equívocos obtenidos con algunos aislamientos por látex-aglutinación, podrían estar relacionados con co-colonizaciones que en ese momento no detectamos puesto que los ensayos se



hicieron sobre muestras llegadas desde diversos laboratorios y debido al elevado coste de los reactivos la primera aglutinación obtenida con dos sueros polivalentes combinados se dio por buena. Posteriormente el envío al Centro Nacional de Microbiología de Majadahonda, si se hizo en placas obtenidas a partir de una colonia y el método de Quellung funcionó correctamente.

En cualquier caso la colonización y co-colonización son fenómenos dinámicos, variando en el mismo paciente el serotipo o serotipos de la nasofaringe en función del tiempo con relativa facilidad (47). Otro factor que puede interferir es la fase en que se encuentre la vacunación en el momento de realizar el estudio, como se ha visto en alguna publicación(419), en que más de la mitad de niños estaban todavía colonizados por serotipos de la PCV-7 debido a la precocidad en la recogida de muestras tras la vacunación.

Valente et al, (420) , han demostrado una disminución significativa de colonización asociada a la implantación de la PCV-7, entre niños vacunados,8%, y no vacunados 18,3%, y también respecto a los de la era prevacunal, 17,3%, sugiriendo además que se debe a una distribución asimétrica de los serotipos no vacunales encontrados entre muestras con una y varias cepas, proponiendo que en la era postvacunal, algunos serotipos prevalentes no vacunales son más competitivos que otros, dificultando su coexistencia en el mismo nicho. Este descenso según ellos, puede tener influencia en la transferencia horizontal de genes, por ejemplo de resistencia, que supondría un nuevo beneficio potencial de las vacunas conjugadas (420).

Los datos de colonización de nuestro estudio han variado también entre las diferentes áreas de salud (hospitales), alcanzándose en el nuestro las cifras más altas de portadores, por ejemplo, 34,6% en

invierno en Lorca, y 62% en la misma época en la zona cubierta por nuestro hospital, sin que encontremos una explicación lógica. En relación con el periodo de recogida encontramos diferencias significativas, incrementándose claramente los portadores en invierno tanto en la población de 1 año, 23,7% a 35,7%, como en la de cuatro años 25,3 a 41,4%, datos similares a los de Lacksman et al. (421).

Respecto al estado vacunal la tasa de colonizados osciló entre el 29,3% de los vacunados y el 34,2% de los no vacunados,  $p = 0.041$ . Si añadimos la edad, la población de un año vacunada presentó una colonización del 26,6% y la que no había recibido ninguna dosis del 34,5%  $p < 0,05$ . En la de 4 años la diferencia fue menor, 31,9% y 34,1%, sin significación estadística. Sánchez- Tatay et al, (417) no encontraron diferencias significativas en la tasa de portadores entre los niños que habían recibido al menos una dosis y los que no recibieron ninguna.

En cuanto a la edad y sexo el número de portadores fue mayor en los de 4 años y en niñas pero sin significación estadística. Ansaldi et al (422), empleando PCR en una población con el 97,8% de cobertura vacunal, encontraron mayores incrementos de colonización respecto a la edad, del 22% en los de 1 año al 48% en los de 2 y al 60% en los de 2 a 5. En otro estudio sobre un grupo con vacunación total, un 8% de niños de 11 meses estaba colonizado con serotipos de la PCV-7 frente al 4% de los de 24 meses. Sin embargo con los serotipos no vacunales la proporción de colonizados además de ser mucho mayor se invertía, 39% y 45% respectivamente (423).

De las 343 cepas serotipadas, 44 correspondían a componentes de la PCV-7 lo que supuso un 12,8% cifra ligeramente superior a la de García Vera et al. (415), 8,7%, con un porcentaje de vacunación similar e inferior a la de Sánchez-Tatay (417), 23%, respecto a estudios nacionales. La tendencia en la mayoría de publicaciones es hacia la desaparición de los serotipos vacunales a medida que la tasa de vacunación aumenta (418, 424, 425). En otro trabajo nacional el riesgo de ser portador de serotipos PCV-7 en vacunados fue del 7% frente 29% en los que no recibieron vacuna (416).

En nuestro caso 19 cepas de componentes de la PCV-7 se aislaron de 198 pacientes vacunados, 9,59%, y 25 de 145 sin vacunar, 17,2%.

Siguiendo la tónica general observamos un fenómeno de “reemplazamiento” en el que los serotipos no vacunales han ocupado el nicho dejado por los anteriores (425, 423, 348, 426). En un estudio de Hong Kong se comprobó la desaparición de serotipos PCV-7, afirmando que la vacunación fue la única causa asociada, después de un análisis multivariante (427).

Los serotipos más aislados en nuestra serie fueron en orden decreciente, 6A ,19A ,15A, 23B, 11A y 6C que sumaban más del 45% de los recuperados. En otras series los datos son similares (418, 427, 415, 425), aunque se aprecian diferencias puntuales en algunos casos debido probablemente a variaciones geográficas, clones circulantes, resistencias etc. Como ejemplo podemos citar la presencia destacada del serotipo 5 en un estudio del norte de Italia (422), que no aparece en nuestra serie y el predominio del 22F en el sur de Inglaterra y Canadá (348,297), que para nosotros ocupaba un lugar secundario.

El serotipo 6A que fue el más aislado, presentó diferencias significativas, respecto a su aislamiento a partir de niños vacunados, 7,07%, o no vacunados, 15,7%, indicando la existencia de inmunidad cruzada con el 6B como también se ha apuntado en otros trabajos (423, 428).

El serotipo 19A ocupó el segundo lugar y es igualmente destacado en prácticamente todas las series publicadas. Su incremento se ha relacionado con haber recibido 3 dosis de vacuna frente a ninguna (429) y con la diseminación de determinados clones (430).

Los cambios ocurridos en la prevalencia de serotipos pueden no ser debidos totalmente al azar, sino relacionados con la cápsula y su tamaño, lo cual está asociado a su coste metabólico (431). Neumococos con grandes cápsulas tales como 19A,11A,10A y 35F colonizan más frecuentemente a niños jóvenes (431). Estos serotipos altamente encapsulados y que colonizan con frecuencia presentan tasas más altas de mortalidad en personas sanas mayores de 5 años, comparables a los antiguos, tales como 19F y 6B (109). Por ello el “reemplazamiento” en portadores podría causar igualmente enfermedad severa y reducir el beneficio de la vacuna, especialmente en los ancianos y enfermos crónicos (432), aunque otras causas, como genética, presencia de clones resistentes y características de la población también contribuyan (433,185).

De los seis serotipos complementarios de la PCV-13 aislamos 83 cepas, 24,19%, de las que la mayoría, 67, se repartieron entre 6A y 19A. Sumando estas a las que cubre la PCV-7, 12,8%, obtenemos un 37,01% de cobertura de la nueva vacuna, cifra similar,33,3%, a la recogida en un ensayo de Reino Unido (348), e inferior a otro de Canadá (297), 46,4% de cobertura sobre los serotipos circulantes.

Una comparación entre los serotipos de portadores y los invasores del periodo final nos ilustra sobre la presencia destacada en ambos grupos del 19A, del que obtuvimos una relación superior a 1, 1,29, respecto del 14 que se usa como referencia (434), en cuanto a capacidad invasora, (datos no mostrados), coincidiendo con otros estudios en los que se pone de manifiesto su extensión por muchos países. Precisamente el 14 y también el 3 estuvieron bien representados en ambas poblaciones. El 6A ocupó el primer lugar en los portadores y aunque su capacidad invasora calculada fue baja, 0,16, teniendo en cuenta solo la población infantil, supuso el 6,2% de las infecciones invasoras.

Otros serotipos frecuentes en los portadores como 11A y 15B no produjeron ningún caso de infección invasora. El 11A se ha asociado con bajo poder invasor en otros trabajos (286, 435), pero también con alta mortalidad (109, 433). En las series actuales de infecciones graves no aparece o lo hace con baja frecuencia (436), aunque en alguna muy anterior a la vacuna, ocupaba el segundo lugar entre los productores de bacteriemia primaria en adultos (437).

Otros serotipos muy frecuentes en portadores como 15A, 23B y 6C apenas aparecieron entre los invasores y del 15B no recuperamos ninguna cepa entre estos últimos. Por el contrario el 1, estuvo ausente entre los portadores a pesar de estar produciendo infecciones en esa época en nuestra Comunidad, hecho por lo demás frecuente por su ya descrita rareza como colonizante (434). Esto contrasta no obstante, con lo publicado por Bokaeion et al. (438), que encuentra al 1 encabezando la lista de portadores de su estudio, aunque estos no eran niños sino adolescentes.

El serotipo 7F se comportó de modo parecido al 1, 22 cepas aisladas que causaban enfermedad invasora y solo dos colonizando. Ambos son reconocidos como los más invasores, aunque al mismo tiempo son causa de escasa o nula mortalidad (297,109, 433). Un serotipo que está emergiendo como portador y al mismo tiempo como invasor es el 22F (348, 286, 297). Sin embargo, nosotros solo obtuvimos un aislamiento, responsable de una meningitis en un niño y ocupó un lugar secundario entre los colonizadores, similar al obtenido en un estudio del norte de España (47). Otros autores consideran al 22F como poco colonizador pero con poder invasor elevado (439).

## Resistencias en portadores

Desde la aparición de la vacuna heptavalente en el año 2000, se han producido cambios epidemiológicos que han afectado sustancialmente a los serotipos circulantes en aquellos lugares donde se ha aplicado la vacunación. Como hemos visto en el apartado anterior, la sustitución de los serotipos frente a los cuales está dirigida la vacuna, por otros que no cubre, también ha tenido lugar en nuestro entorno. Este hecho ha influido sobre las resistencias, tanto en los neumococos aislados de portadores como de infecciones invasoras (440).

En USA tras la vacunación se observó una reducción en las tasas de no susceptibilidad a penicilina y eritromicina (441, 442), pero este efecto sobre la resistencia podía ser temporal a costa de los

serotipos no vacunales que han incrementado su resistencia (443,444).

Nosotros apreciamos una drástica reducción de la resistencia a penicilina entre las cepas anteriores a la vacuna y las recuperadas en este estudio, tanto en las de susceptibilidad intermedia, 59,8% antes y 27,5% después, como en las de resistencia alta, 15,9% y 0,5% respectivamente. Los datos previos a 2001 coinciden con uno de los pocos estudios de portadores en España de esa época, realizado por López et al. (414), que publicaron unos datos de resistencia a penicilina del 64%. En otro trabajo, del sureste de Francia, también encuentran una reducción de la resistencia del 31% al 19% antes y después del empleo de la vacuna (425). En Portugal igualmente, se han observado cifras muy bajas de resistencia a penicilina, 15,7%, con un 66% de población pediátrica vacunada (445).

En Corea del Sur comparando dos cohortes de niños situadas en áreas diferentes del país, una con tasas altas de vacunación (>60%) y otra con tasas bajas (<15%), encontraron diferencia de resistencias entre ambas, 45,2% en la primera frente a 71,4% en la segunda (446). En otro trabajo español reciente, la resistencia a penicilina, 34%, fue parecida a la nuestra con diferencias muy notables entre serotipos de PCV-7, 68%, y no PCV-7, 21% (417).

En contraste con el descenso generalizado de resistencia tras la vacunación, Vasoo et al. (446), constataron un incremento generalizado de la resistencia antibiótica entre 1997 y 2008, en una población de niños con baja colonización, 14%, a los que se les tomó muestra nasofaríngea después del comienzo de la vacunación. No obstante este hecho debe estar relacionado con una baja tasa de vacunación, ya que los serotipos 6B, 23F y 19F

estaban entre los más aislados. Según ellos la resistencia a penicilina aumentó desde el 27,4 % de 1997 al 67,8% de 2008. También en Taiwán en los tres años siguientes a la vacunación la resistencia era muy alta 92,8%, (419).

Los serotipos causantes de resistencia a penicilina fueron en primer lugar los incluidos en la vacuna PCV-7, 14 y 19F principalmente y alguno del 23F y 6B que sumaban 34 de las 44 cepas aisladas, 54%. En segundo lugar 19A y 6A que representaban 26 de las 27 cepas con resistencia de la 83 recuperadas de este grupo (29%), datos similares a los de Grivea et al. (426). En tercer lugar 42 aislados de los 216, 19,4%, que no cubren ninguna de las dos vacunas, destacando en este grupo el 35B con 10 de 14 cepas resistentes, 15A, 11 de 25 y 24F, 3 de 4. Los dos últimos aparecen también en la serie anterior citada, pero no el 35B, del que se ha publicado resistencia en invasores (338,185). Sumando las resistencias de los dos últimos grupos se puede concluir que la resistencia de los llamados no vacunales, en referencia a la PCV-7, fue del 23,5%, mostrando una diferencia estadísticamente significativa frente a los de la primera vacuna, en concordancia con otros datos españoles (417).

De las 93 cepas serotipadas resistentes, 25,8% pertenecían a la PCV-7, 29,0% a los seis complementarios de la PCV-13, lo que totalizaba un 54,8% de resistencias cubiertas por la nueva vacuna, cifra muy inferior a la informada en Canadá (297). Esto en definitiva significa que cuando se comenzó a aplicar la vacuna trecevalente, aproximadamente un 45% de las cepas circulantes no cubiertas, presentaban algún grado de resistencia a penicilina. La repercusión futura de estas cepas tendrá que ser monitorizada para poder aplicar las medidas correctoras necesarias. La vacuna experimental



PCV-15 tampoco cubre los serotipos 25B, 15A y 24F que como hemos visto son causa actual de resistencia (285).

En este estudio no encontramos diferencias significativas en la resistencia de los diversos grupos que comparamos, por vacunación, periodo estacional o sexo. Sin embargo sí que encontramos mayor resistencia en los niños de 1 año, 33,7%, que en los de 4, 23,7%, probablemente por la distribución de serotipos.

### Resistencia a Eritromicina

La resistencia eritromicina también disminuyó de forma significativa del 59,8% en la era prevacunal al 45,7% en el estudio actual,  $p < 0.01$ , con tasas muy superiores a las de penicilina por el aumento de serotipos no vacunales con este tipo de resistencia. Cifras también altas se han publicado en un estudio francés realizado entre 2006-2007 (448), y más bajas en Grecia, 31% (449), o Australia, 5% (450). Incrementos muy notables entre el periodo prevacunal 33,4% y el potvacunal, 78%, se han producido en Singapur (447), al poco tiempo de comenzar la vacunación.

Entre los serotipos vacunales la resistencia alcanzó el 68%, de los 6 complementarios el 46,9% y entre los no vacunales 93 cepas de 216, lo que representaba un 43,05%, cifra que dobla sobradamente la de resistencia ofrecida frente a penicilina por los miembros de este grupo.

De las 162 cepas serotipadas resistentes a eritromicina, 18,5% pertenecían a la vacuna PCV-7, y 24,07% a los 6 serotipos complementarios, lo que supone una cobertura de 42,5%, o lo que es igual, el 57,5% de los neumococos colonizadores en 2010 no

susceptibles a eritromicina no estaban cubiertos por la nueva vacuna que se estaba aplicando en ese momento. Este hecho nos debe alertar ante el probable aumento que pueda producirse en estos serotipos a consecuencia precisamente de la vacunación.

La inmunización con PCV-7 se ha asociado a un incremento de resistencia a eritromicina debido a serotipos no vacunales compensado por la paulatina desaparición de los anteriores (451, 449).

Entre los serotipos no vacunales, la resistencia a eritromicina de 15A ,11A ,19A ,23A y no tipables superaron el 60%, mientras que las once cepas que sumaron 33F y 24F alcanzaron el 100%. En el estudio de Leach (450), las tres primeras posiciones las ocuparon 23B, 17F y 9N, contrastando los resultados con los nuestros, especialmente en 23B, solo 2 resistencias de 25 aislamientos, poniendo de manifiesto una vez más las diferencias geográficas.

### Resistencia a Cefotaxima

La resistencia a cefotaxima disminuyó significativamente entre los dos periodos, del 32,5% al 5,9%, al disminuir drásticamente los serotipos PCV-7, principales responsables en la primera época. Estas cifras tan bajas son alentadoras en lo que se refiere al tratamiento de meningitis, puesto que como se sabe, las infecciones invasoras van precedidas por la colonización nasofaríngea. En otro tipo de infecciones también las perspectivas son excelentes ya que solo 3 cepas presentaron una CMI>1.

## Resistencia Combinada

Hemos encontrado 69 cepas con resistencia combinada penicilina-eritromicina, especialmente representadas en los serotipos 14, 19F, 19A y 6A entre los que cubre la nueva vacuna trecevalente y 15A y 24F de los que escapan a su cobertura. De este grupo de aislados, 17 presentaban una CMI > 0,5 a cefotaxima, destacando aparte de los de la primera vacuna, el 15A. Ho et al (427), publicaron altas tasas de resistencia combinada penicilina-eritromicina en serotipos vacunales como 14, 19F y 23F y no vacunales, 6A ,23A, 19A y 6C que oscilaban entre el 87,7% y 59,7%, pero sin hacer referencia al 15A.

También encontramos entre los 254 neumococos sensibles a penicilina, 78 con resistencia a eritromicina, distribuidos en 20 serotipos, destacando 15A 11A ,19A ,23A ,6A y 6C que como puede verse no pertenecen a los vacunales y son los responsables del nivel de resistencia superior al de penicilina.

## Resistencia a otros antibióticos

Entre el resto de antibióticos ensayados no encontramos ninguna cepa resistente, lo que no sorprende en el caso de linezolid, vancomicina o rifampicina, pero resulta más llamativo respecto a levofloxacino, frente al que se han detectado resistencias en otras regiones españolas cercanas (404,403), o en zonas más lejanas (452).

# Conclusiones

## Serotipos invasores

Hemos observado un fenómeno de “reemplazamiento” o sustitución de los serotipos que cubre la vacuna PCV-7, tras la aplicación de esta a la población infantil, por otros distintos, destacando especialmente la mayoría de los complementarios incluidos en la nueva vacuna PC-V13, que aumentaron de forma significativa.

2.- Los serotipos 19A y 7F experimentaron un incremento estadísticamente significativo entre los neumococos causantes de infecciones graves, al comparar el periodo prevacunal con el postvacunal.

3.- Algunos serotipos como 4, 6B y 9V incluidos en la vacuna heptavalente, han desaparecido.

4.- De las infecciones invasoras del tramo final del estudio, la PCV-7 solo cubría el 12,5% de los casos.

## Resistencia serotipos invasores

1.-La resistencia a penicilina, cefotaxima y eritromicina globalmente no varió entre los dos periodos. Si descendió en el caso de tetraciclina y cloranfenicol con significación estadística.

2.-La resistencia a eritromicina en niños descendió de una época otra y superó a la de adultos al compararlos globalmente, en ambos casos de forma estadísticamente significativa.

3.-La proporción de cepas resistentes a penicilina entre los serotipos complementarios y la proporción de no vacunales frente a eritromicina se incrementó significativamente entre las dos fases de estudio.

4.-Los serotipos invasores más resistentes fueron los vacunales y entre los no vacunales 19A y el serogrupo 15.

## Portadores, serotipos

1.- Un 31,2% de los niños que participaron en el estudio estaban colonizados por *S. pneumoniae*.

2.- Se ha apreciado un claro fenómeno de “reemplazamiento” o sustitución de los serotipos de la vacuna PCV-7 por otros como 6A , 19A ,15A ,15B y 11A en orden decreciente, que han ocupado su nicho ecológico.

3.-El serotipo 19A era más frecuente entre las cepas invasoras que entre los portadores, mientras que a otros como 6A ,15A, 23B, 11A, 6C y 15B les ocurría lo contrario, en todos los casos con significación estadística comprobada.

## Portadores, resistencias

1.-La resistencia a penicilina disminuyó significativamente entre los dos periodos, quedando en una tasa más baja que la de las cepas invasoras (28% y 42% respectivamente). El serotipo 19A fue el responsable de la mayoría de resistencias además de los serotipos de la vacuna antigua.

2.-La resistencia a eritromicina también disminuyó significativamente, aunque quedó en tasas bastante superiores a la de penicilina, 45%. La razón se debe a la aparición de serotipos nuevos resistentes que sin embargo no afectan a la penicilina. Destacan el 15A, 11A y 6A que afortunadamente apenas se encontraron en infecciones invasoras, aunque desconocemos su implicación en cuadros como otitis o sinusitis.

3.- La resistencia a cefotaxima disminuyó drásticamente, en paralelo a la casi desaparición de los serotipos de la vacuna PCV-7, quedándose en el 6%. El serotipo 14 fue el causante de más de la mitad de las resistencias.

# Cobertura vacunal.

## Serotipos invasores

1.-La nueva vacuna PCV-13 cubría al comienzo de su uso, 2010, un 78,12% de las cepas causantes de infección invasora.

2.- En el caso de los portadores la cifra se reducía notablemente a un 37,01%, lo que significa una gran mayoría de serotipos no vacunales circulantes.

3.- Esta nueva vacuna abarca el 90%, 80%, y 100% de las resistencias a penicilina, eritromicina y cefotaxima respectivamente, de los serotipos invasores.

4.- En cuanto a los portadores cubría algo más de la mitad de las cepas resistentes a penicilina, la casi totalidad de las resistentes a cefotaxima y dejaría sin cubrir más del 50% de los neumococos aislados de portadores resistentes a eritromicina.

# ***Bibliografía***



1. Pasteur L. Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. Bulletin de l'Académie de Médecine (Paris) (series 2) 1881; 10:94-103.
2. Sternberg G.M. A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by subcutaneous injection of human saliva. An experimental research. National Board of Health Bulletin 1881; 2:781-783.
3. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Peter H. A. Sneath, (Ed.) .1986; 2: 1052.
4. Günther C. Discussion of Leyden's report. Verhandlungen des Vereins für Innere Medizin zu Berlin 1882; 2: 123-125.
5. Leyden E. Ueber infectiöse Pneumonie. Verhandlungen des Vereins für Innere Medizin zu Berlin 1882; 2: 121-123.
6. Talamon. Coccus de la pneumonie. Bulletins de la Société Anatomique de Paris 1883; 58: 475-481.
7. Austrian R. Pneumococcal infections. En Bacterial vaccines. R. Germanier (Ed). Academic Press, Inc. Londres. 1984 257-288.
8. Austrian R. Pneumococcus; the first one hundred years. Rev. Infect. Dis. 1981; 3 (suppl): S183-189.
9. Allen K.D. Penicillin-resistant pneumococci. H Hosp Infect. 1991; 17: 3-13.
10. Zaufel E. Mikroorganismen im Secrete der Otitis media acuta. Prager Medicinische Wochenschrift 1887; 12: 225-227.
11. Weichselbaum A. Ueber seltener Localisationen des pneumonischen Virus (*Diplococcus pneumoniae*). Wiener Klinische Wochenschrift 1888; 1: 659-661.
12. Klemperer G., Klemperer F. Versuche über immunisierung und heilung bei der pneumokokkeninfektion. Berliner Klinische Wochenschrift. 1891; 28: 833-5, 869-75.
13. Neufeld F., Haendel. Weitere untersuchungen über vorkommen und bedeutung atypischer varietäten des pneumokokkus. Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte. 1910; 34: 293-304.

14. Neufeld F. Ueber die Agglutination der Pneumokokken und über die Theorieen der Agglutination. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten. 1902; 40: 54-72.
15. Wright A.E., Parry Morgan W., Colebrook L., Dogson R.W. Observations on prophylactic inoculation against pneumococcus infections, and on the results which have been achieved by it. Lancet. 1914; 1: 1-10.
16. MacLeod C.M., Hodges R.G., Heilderberger M., Bernhanrd W.G. Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides. J Exp Med. 1975; 82: 445-465.
17. Austrian R. The development of pneumococcal vaccine. Proc Am Philosoph Soc. 1981; 125: 46-51.
18. Deibel R.H., Seeley H.W. Jr. Streptococcaceae. En R.E. Buchanan y R.E. Gibbons (eds), Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8<sup>th</sup> ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1974; 490-509.
19. Mouton Y., Brion M. Infections à pneumocoques. En: Encyclopédie Médico-Chirurgicale. Éditions Techniques, París. Mayo 1979; 8012(A10): 1-14.
20. Mosser J., Tomasz A. Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. J Biol Chem. 1975; 245: 287-298.
21. Aguiar S.I., Frias M.J., Santos L., Melo-Cristino J., Ramirez M.; Portuguese Surveillance Group For Study of Respiratory Pathogens. Emergence of optochin resistance among *Streptococcus pneumoniae* in Portugal. Microb Drug Resist. 2006 winter; 12(4): 239-245.
22. Muñoz R., Fenoll A., Vicioso D., Casal J. Optochin-resistant variants of *Streptococcus pneumoniae*. Diagn Microbiol Infect Dis. 1990 Jan-Feb; 13(1):63-6.
23. Phillips G., Barker R. Brogan O. Optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Lancet. 1988; 2: 281.
24. Ronde C., Lopez R., Tapia A. Role of the pneumococcal autolysin (murein hydrolase) in the release of progeny

- bacteriophage and in the bacteriophage-induced lysis of host cells. *J Virol.* 1977; 21: 366-74.
25. Garcia E. Neumococo (*Streptococcus pneumoniae*), un clásico en la microbiología contemporánea. Conferencia inaugural. XII Congreso de la SEM. Pamplona. Libro de resúmenes. 1982; 1: 7-12.
  26. Lopez R. Ronda C. Garcia E. Autolysins are directed involved in the bactericidal effect caused by penicillin in wild type and in tolerant pneumococci. *FEMS Microbiology Letters.* 1990; 66: 317-22.
  27. Musher D. M. *Streptococcus pneumoniae*. En: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. (Eds). *Enfermedades Infecciosas. Principios y práctica.* (6ª Ed.). Elsevier España, S.A. 2006; Volumen 2; 197; 2392-2407.
  28. Holloway Y, Boersma W.G., Kuttischütter H., Snijder J.A.M. Minimum number of pneumococci required for capsular antigen to be detectable by latex agglutination. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 517-519
  29. Friedman A.D. Urine latex particle agglutination. *Pediatrics.* 1988; 81: 470.
  30. Charkaluk M.L., Kalach N., Mvogo H., Dehecqu E., Magentie H., Raymond J., Gendrel D., Kremp O., Decoster A. Assessment of a rapid urinary antigen detection by an immunochromatographic test for diagnosis of pneumococcal infection in children. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006 Jun; 55(2): 89-94.
  31. Samra Z., Shmueli H., Nahum E., Paghis D., Ben-Ari J. Use of the NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in cerebrospinal fluid for rapid diagnosis of pneumococcal meningitis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003 Apr; 45(4): 237-40.
  32. Dominguez J., Galí N., Blanco S., Pedrosa P., Prat C., Matas L., Ausina V. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen by a rapid immunochromatographic assay in urine samples. *Chest.* 2001 Jan; 119(1): 243-9.

33. Blaschke A.J., Heyrend C., Byington C.L., Obando I., Vazquez-Barba I., Doby E.H., Korgenski E.K. Sheng X., Poritz M.A., Daly J.A., Mason E.O., Pavia A.T., Ampofo K. Molecular analysis improves pathogen identification and epidemiologic study of pediatric parapneumonic empyema. *Pediatr Infect Dis J.* 2011 Apr; 30(4): 289-94.
34. Resti M., Moriondo M., Cortimiglia M., Infoli G., Canessa C., Becciolini L., Bartolini E., de Benedictis F.M., de Martino M., Azzari C; Italian Group for the Study of Invasive Pneumococcal Disease. Community-acquired bacteremic pneumococcal pneumonia in children: diagnosis and serotyping by real-time polymerase chain reaction using blood samples. *Clin Infect Dis.* 2010 Nov 1;51(9):1042-9
35. 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 Oct; 57 (Pt 10): 1205-12.
36. Mufson M.A. *Streptococcus pneumoniae*. En: Mandell G.L., Douglas R.D., Bennett J.E. (Eds). Principles and practice of infectious diseases (3<sup>a</sup> Ed.). Churchill Livingstone Inc. New York. 1990; 1539-4.
37. Tomazs A. Surface components of *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Infect Dis.* 1981; 3:190-211.
38. Lee C.J., Fraser B.A., Szu S. et al. Chemical structure of and immune response to polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Infect Dis.* 1981; 3: 323-331.
39. Calix J.J., Nahm M.H. A pneumococcal serotype. 11 E. has a variably inactivated *wcjE* gene. *J Infect Dis.* 2010 Jul 1; 202 (1): 29-38.
40. Henrichsen J. The pneumococcal typing system and pneumococcal surveillance. *J Infect.* 1979; 2(suppl):31-37.
41. Peterson S., Cline R.T., Tettelin H, et al. Gene expression analysis of *Streptococcus pneumoniae* competence reulons by use of DNA microarrays. *J Bacteriol.* 2000; 182: 6192-6202.

42. Nesin M., Ramirez M., Tomás A. Capsular transformation of a multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in vivo. J Infect Dis. 1998; 177:707-713.
43. Griffith F. The significance of pneumococcal types. J Hyg. 1928; 27: 113-159.
44. Avery O.T. Macleod D., McCarty M. Studies on chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. J Exp Med 1944; 79: 137-157.
45. Greenberg D. The shifting dynamics of pneumococcal invasive disease after the introduction of the pneumococcal 7-valent conjugated vaccine: toward the new pneumococcal conjugated vaccines. Clin Infect Dis. 2009; 49: 213-215.
46. Gray B.M., Dillon H.C. 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; 158:948-955.
47. Ericibengoa M., Arostegi N., Marimon J.M., Alonso M., Perez-Trallero E. Dynamics of pneumococcal nasopharyngeal carriage in healthy children attending a day care center in northern Spain. Influence of detection techniques on the results. BMC Infectious Diseases. 2012; 12; 69.
48. Baltimore R.S., Shapiro E.D. Pneumococcal infections. En "bacterial infections of humans. Epidemiology and control". 2<sup>a</sup> ed. A.S. Evans y P.S. Brachman (eds), Plenum Medical Book Company. Nueva York & Londres. 1991; 525-546.
49. Heffron R. Pneumonia with special reference to pneumococcus lobar pneumonia, 2<sup>nd</sup> printing. Cambridge: Harvard University Press. 1979; 549-560.
50. Hammitt L.L., Bruden D.L., Butler J.C., Baggett H.C., Hurlburt D.A., Reasonover A., et al. Indirect effect of conjugate vaccine on adult carriage of *Streptococcus pneumoniae*; an explanation of trends in invasive pneumococcal disease. J Infect Dis. 2006; 193:1487-94. DOI: 10.1086/503805.
51. Lynch J.P. 3<sup>rd</sup>, Zhanel G.G. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology, risk factors, and strategies for prevention. Semin Respir Crit Care Med. 2009; 30: 189-209.

52. Hendley J.O., Sande M.A., Stewart P.M., Gwaltney J.M. Spread of *Streptococcus pneumoniae* in families. I. Carriage rates and distribution of types. J Infect Dis. 1975; 132:55-61.
53. Bimblecombe F. S. W., Cruickshank R., Masters P.L., Reid D. D., Stewart G.T. Family studies of respiratory infections. Br Med J. 1958; 1:119-28.
54. O'Brien K.L., Nohynek H.; World Health Organization Pneumococcal Vaccine Trials Carriage Working Group. Report from a WHO working group: Standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*. Pediatr Infect Dis J. 2003 Feb; 22(2):133-40.
55. Ang J.Y., Lua J.L., Asmar B.I., Shankaran S., Heyne R.J., Shelonka R.L., Das A., Li L., Jackson D.M., Higgins R.D., D'Angio C. T.; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Arch Pediatr Adolesc Med. 2010 Dec; 164(12): 1173-5.
56. Faust K., Demmert M., Bendiks M. Göpel W., Herting E., Härter C. Intrapartum colonization with *Streptococcus pneumoniae*, early-onset sepsis and deficient specific neonatal immune responses. Arch Gynecol Obstet. 2011 Jul 30.
57. Aniansson G., Alm B., Andersson B. et al. Nasopharyngeal colonization during the first year of life. J Infect Dis. 1992; 165(suppl 1): S38-S42.
58. Dowling J.N., Sheehe P.R., Feldman H.A. Pharyngeal pneumococcal acquisitions in "normal" families; a longitudinal study. J Infect Dis. 1971; 124:9-16.
59. Gwaltney J.M., Sande M.A., Austrian M., Hendley J.O. Spread of *Streptococcus pneumoniae* in families. II. Relation of transfer of *S. pneumoniae* to incidence of colds and serum antibody. J Infect Dis. 1975; 132: 62-8.
60. Klein J.O. The epidemiology of pneumococcal disease in infants and children. Rev Infect Dis. 1981; 3: 246-253.
61. Antonio M., Hakeem I., Sankareh K., Cheung Y.B., Adegbola R.A. Evaluation of sequential multiplex PCR for direct detection of multiple serotypes of *Streptococcus*

- pneumoniae* from nasopharyngeal secretions. J Med Microbiol. 2009; 58: 296-302.
62. Moreno J., Hernandez E., Sanabrio O., Castañada E. Detection and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal samples by PCR-based multiplex assay. J Clin Microbiol. 2005; 43: 6152-6154.
  63. Rivera-Olivero I.A., Blommaert M., Bogaert D., Hermans P.W., de Ward J.H. Multiplex PCR reveals a high rate of nasopharyngeal pneumococcal 7-valent conjugate vaccine serotypes colonizing indigenous Warao children in Venezuela. J. Med Microbiol. 2009; 58: 584-587.
  64. Turner P., Hinds J., Turner C., Jankhot A., Gould K., Bentley S.D., Nosten F., Goldblatt D. Improved detection of nasopharyngeal colonization by multiple pneumococcal serotypes by use of latex agglutination or molecular serotyping by microarray. J Clin Microbiol. 2011; 49: 1784-1789.
  65. Chaisson R.E. Bacterial pneumonia in patients with human immunodeficiency virus infection. Semin Respir Infect. 1989; 4: 133-8.
  66. Bogaert D., De Groot R., Hermans P.W. *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. Lancet Infect Dis. 2004; 4: 144-154.
  67. Garcia-Rodriguez J.A., Fresnadillo Martinez M.J. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. J Antimicrob Chemother. 2002; 50(Suppl S2): 59-73.
  68. Nelson, A.L., et al. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. Infect Immun. 2007; 75: 83-90.
  69. Cundell D.R., Weiser J.N., Shen J.J., Young A., and Tuomanen E.I. Relationship between colonial morphology and adherence of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 1995; 63: 757-761.
  70. Arai J., Hotomi M., Hollingshead S.K., Ueno Y., Briles D.E., Yamanaka N. *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Middle Ear Fluid and Nasopharynx of Children with Acute

- Otitis Media Exhibit Phase Variation. *Journal of Clinical Microbiology*, Apr. 2011; 1646-1649.doi:10.1128/JCM.01990-10.
71. Cundell D.R., Pearce B.J., Sandros J., et al. Peptide permeases from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eukaryotic cells. *Infect Immun*. 1995;63:2493-2498.
  72. Weiser J.N., Markiewicz Z., Tuomanen E.I., Wani J.H. Relationship between phase variation in colony morphology, intrastrain variation in cell wall physiology, and nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 1996; 64:2240-2245.
  73. Brock S.C., McGraw P.A., Wright P.F. Crowe J.E. Jr. The human polymeric immunoglobulin receptor facilitates invasion of epithelial cells by *Streptococcus pneumoniae* in a strain-specific and cell type-specific manner. *Infect Immun*. 2002; 70: 5091-5095.
  74. Rubins J.B., Charboneau D., Paton J.C., et al. Dual function of pneumolysin in the early pathogenesis of murine pneumococcal pneumonia. *J Clin Invest*. 1995; 95:142-150.
  75. Rubins J.B., Janoff E.N. Pneumolysin: A multifunctional pneumococcal virulence factor. *J Lab Clin Med*. 1998; 131:21-27.
  76. Musher D.M., Chapman A.J., Goree A, Et al. Natural and vaccine-related immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*.1986; 154: 245-256.
  77. Romero-Steiner S., Libutti D. Pais L.B., et al. Standardization of an opsonophagocytic assay for the measurement of functional antibody activity against *Streptococcus pneumoniae* using differentiated HL-60 cells. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1997; 4: 415-422.
  78. Musher D.M. Groover J.E., Rowland J.M., et al. Antibody to capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*: Prevalence, persistence, and response to revaccination. *Clin Infect Dis*. 1993; 17:66-73.
  79. Finland M., Tilghman R.C. Bacteriological and immunological studies in families with pneumococci infections:



- The development of type-specific antibodies in healthy contact carriers. *J Clin Invest.* 1936; 15: 500-508.
80. Wara D.W. Host defense against *Streptococcus pneumoniae*: The role of the spleen. *Rev Infect Dis.* 1981; 3: 299-309.
  81. Bisno A.L. Hyposplenismo and overwhelming pneumococcal infection; a reappraisal. *AM J Med Scien.* 1971; 262: 101-107.
  82. Torres J., Bisno A.L. Hyposplenismo and pneumococemia. Visualization of *Diplococcus pneumoniae* in the peripheral blood smear. *Am J Med.* 1973; 55: 851-855.
  83. Cunningham-Rundles C. Clinical and immunologic analyses of 103 patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 1989; 9: 22-23.
  84. Wald E.R., Byers C., Guerra N. et al. Subacute sinusitis in children. *J Pediatr.* 1989; 115: 28-32.
  85. Styrt B. Infection associated with asplenia; risk, mechanisms, and prevention. *Am J Med:* 1990; 88(suppl 5N): 33N-42N.
  86. Austrian R., Gold J. Pneumococcal bacteremia with especial reference to bacteremic pneumococcal pneumonia. *Ann Intern Med.* 1964; 60: 759-776.
  87. Burman L.A., Norrby R., Trollfors B. Invasive pneumococcal infections; incidence, predisposing factors, and prognosis. *Rev Infect Dis.* 1985; 7: 133-141.
  88. Wong W.Y., Overturf G.D., Powars D.R. Infection caused by *Streptococcus pneumoniae* in children with sickle cell disease: Epidemiology, immunologic mechanisms, prophylaxis, and vaccination. *Clin Infect Dis.* 1992; 14: 1124-1136.
  89. Gluckman S.J., Dvorak V.C., MacGregor R.R. Host defenses during prolonged alcohol consumption in a controlled environment. *Arch Intern Med.* 1977; 137: 1539-1543.
  90. Kim P.E., Musher D.M., Glezen W.P., et al. Association of invasive pneumococcal disease with season, atmospheric

- conditions, air pollution, and the isolation of respiratory viruses. *Clin Infect Dis.* 1996; 22: 100-106.
91. Smith M.D., Sheppard C.L., Hogan A., Harrison T.G., Dance D.A.B., Derrington P. George R.C. on behalf of the South West Pneumococcus Study Group. *Journal of Clinical Microbiology.* Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* Infections in Adults with Bacteremia and Community-Acquired Pneumonia: Clinical Comparison of Pneumococcal PCR and Urinary Antigen Detection. 2009 Apr; 1046-1049.
  92. Murdoch D.R. Nucleic acid amplication test for the diagnosis of pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 2003; 36: 1162-1170.
  93. Stralin, K., Tornqvist E., Kalsoft M.S., Olcen P., Holmberg H. Etiologic diagnosis of adult bacterial pneumonia by culture and PCR applied to respiratory tract samples. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 643-645.
  94. Dominguez J., Gali N., Matas L., Pedroso P., Blanco S., Gimenez M., Prat C., Sopena N., Sabria M, Ausina V. PCR detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in serum samples for pneumococcal pneumonia diagnosis. *Clin Microbiol Infect.* 2001; 7: 164-166.
  95. O'Brien K.L., Wolfson L.J., Watt J.P, Henkle E., Deloria-Knoll M., McCall N., et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet.* 2009; 374: 893-902.
  96. Centers for Disease Control. Update; pneumococcal polysaccharide vaccine usage-United States. *Morbid Mortal Weekly Rep.* 1984; 33: 273-281.
  97. Mufson M.A. Pneumococcal infection. *JAMA.* 1981; 246: 1942-1948.
  98. Ortqvist A. Prognosis in community-acquired pneumonia requiring treatment in hospital. *Scand J Infect Dis.* 1990; (suppl 65): 7-62.
  99. Siegman-Igra Y., Schwartz D., Alperin H., Konforti N. Invasive pneumococcal infection in Israel. *Scand J Infect Dis.* 1986; 18: 511-7.

100. Fedson D.S. Pneumococcal vaccine. En Vaccines. Plotkin S.A., Mortimer E.A. Jr. (eds). W.B. Saunders Co. Philadelphia. 1988; 271-299.
101. Naheed A., Saha D.K., Breiman R.F., et al. Multihospital surveillance of pneumonia burden among children aged <5 years hospitalized for pneumonia in Bangladesh. Clin Infect Dis. 2009; 48(suppl 2): S82-S89.
102. Grandsen W.R. Eykyn S.J., Phillips I. Pneumococcal bacteraemia: 325 episodes diagnosed at St Thomas' Hospital. Br Med J. 1985; 290: 505-508.
103. Jetté L.P. Lamthe F. and the Pneumococcus Study Group. Surveillance of invasive *Streptococcus pneumoniae* infection in Quebec, Canada, from 1984 to 1986; serotype distribution, antimicrobial susceptibility, and clinical characteristics. J Clin Microbiol 1989; 27: 1-5.
104. Bratton L., Teele D., Kein J.O. Outcome of unsuspected pneumococemia in children not initially admitted to the hospital. J Pediatrics. 1977; 90: 703-706.
105. Carroll W.L., Farrell M.K., Singer J.I. et al. Treatment of occult bacteremia; a prospective randomized clinical trial. Pediatrics. 1983; 72: 190-198.
106. Finland M. Conference on the pneumococcus: summary and comments. Rev Infect Dis. 1981; 3: 1981.
107. Hausdorff W. P., Siber G., Paradiso P.R. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. Lancet. 2001; 357: 950-2.
108. Greenwood B. The epidemiology of pneumococcal infection in children in the developing world. Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1999; 354: 777-85.
109. Harboe Z.B., Thomsen R.W., Riis A, et al. Pneumococcal serotypes and mortality following invasive pneumococcal disease: a population-based cohort study. PLoS Med. 2009; 6:e1000081.1
110. Quagliarello V.J. Scheld W.M., Treatment of bacterial meningitis. N Engl J Med. 1997; 336: 708-716.

111. Thigpen M.C., Whitney C.G. Messonnier N.E., Zell E.R. Stat M., Lynfield R., Hadler J.L., Harrison L.H., Farley M.M., Reingold A., Bennet N.M., Craig A.S., Shaffner W., Thomas A., Lewis M.M., Scallan E. Shuchat A. for the Emerging Infections Programs Network. Bacterial Meningitis in the United States, 1998-2007. *N Engl J Med.* 2011; 21; 364.
112. Koedel U., Scheld W.M., Pfister H.W. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2: 721-736.
113. Eavey R.D., Gao Y., Shuknecht H.F., Gonzalez-Pineda M. Otologic features of bacterial meningitis of childhood. *J Pediatr.* 1985; 136: 2025-2029.
114. Moisi J.C., Saha S.K., Falade A.G., et al. Enhanced diagnosis of pneumococcal meningitis with use of the Binax NOW immunochromatographic test of *Streptococcus pneumoniae* antigen: a multisite study. *Clin Infect Dis* 2009; 48(suppl 2): S49-S56.
115. Henneberger P.K., Galaid E.I., Marr J.S. The descriptive epidemiology of pneumococcal meningitis in New York City. *Am J Epidemiol.* 1983; 117: 484-491.
116. Lynch J.P. 3<sup>rd</sup>, Zhanel G.G. *Streptococcus pneumoniae*: Epidemiology and Risk Factors, Evolution of Antimicrobial Resistance, and Impact of Vaccines. *Curr Opin Pulm Med.* 2010; 16(3): 217-225.
117. McCracken G.H., Nelson J.D., Klaplan S.L., et al. Consensus report: antimicrobial therapy for bacterial meningitis in infants and children. *Pediatr Infect Dis.* 1987; 6: 501-505.
118. Dowel S.F., Butler J.C., Giebink G.S., et al. Acute otitis media: Management and surveillance in an era of pneumococcal resistance-a report from the drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* Therapeutic Working Group *Pediatr Infect Dis J.* 1999; 18: 1-9.
119. Schwartz L.E., Brown R.B. Purulent otitis media in adults. *Arch Intern Med.* 1992; 152: 2301-2304.

120. Klein J.O. Otitis externa, otitis media, mastoiditis. En Mandell GL., Douglas R.D., Bennett J.E. (Eds). Principles and practice of infectious diseases (3<sup>a</sup> ed.) Churchill Livingstone Inc. New York. 1990; 505-10.
121. Bluestone C.D., Klein J.O. (Eds). Otitis media in infants and children. Philadelphia: W.B. Saunders, 1987.
122. Short K.R., Diavatpoulos D.A., Thornton R., Pedersen J., Strungnell R.A., Wise A.K., Reading P.C., Wijburg O.L. Influenza virus induces bacterial and nonbacterial otitis media. J Infect Dis. 2001; 204 (12): 1857-65.
123. Faden H., Duffy L., Wasielewski R., et al. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. J Infect Dis. 1997; 175: 1440-1445.
124. Rodgers G.L., Arguedas A., Cohen R. Dagan R: Global serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates causing otitis media in children: potential implications for pneumococcal conjugate vaccines. Vaccine. 2009; 27: 3802-3810.
125. Dupont D., Mahjoub-Messai F., François M., Doit C., Mariani-Kurkdjian P., Bidet P., Bonacorsi S., Carol A., Bingen E. Evolving microbiology of complicated acute otitis media before and after introduction of the pneumococcal conjugate vaccine in France. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010; 68: 89-92.
126. American Academy of Pediatrics Subcommittee on Management of Acute Otitis Media: Diagnosis and management of acute otitis media. Pediatrics. 2004; 113: 1451-1465.
127. Wen R., Deng Q., Sun C., Gao S., Tao J., Luo R. Pathogenic bacteria distribution and drug susceptibility in children with acute otitis media in Pearl River Delta. Journal of Clinical Otorhinolaryngology. 2011; 15(19):884-7.
128. Couloigner V., Levy C., François M., Bidet P., Hausdorff W.P., Pascal T., Boucherat M., Bingen E., Mariani P., Pierrot S., Bille E., Carbonnelle E., Varon E., Cohen R. Pathogens implicated in acute otitis media failures after 7-valent pneumococcal conjugate vaccine implementation in France:

- distribution, serotypes, and resistance levels. *Pediatr Infect Dis J.* 2012; 31(2); 154-8.
129. Pérez-Trallero E., Marimón J.M., Alonso M., Ercibengoa M, Garcia-Arenzana J.M. Decline and rise of the antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated from middle ear fluid in children. Influence of changes in circulating serotypes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 April 30; doi: 10.1128/AAC.00501-12.
  130. Fenoll A., Aguilar L., Vicioso M.D., Giménez M.J., Robledo O., Granizo J.J. Increase in serotype 19A prevalence and amoxicillin non-susceptibility among paediatric *Streptococcus pneumoniae* isolates from middle ear fluid in a passive laboratory-based surveillance in Spain, 1997-2009. *BMC Infectious Diseases.* 2011; 11: 239.
  131. Hotomi M., Togawa A., Takei S., Sugita G., Sugita R., Kono M., Fujimaki Y., Kamide Y., Uchizono A., Kanesada K., Sawada S., Okitsu N., Tanaka Y., Sawada S., Okitsu N., Tanaka Y., Saijo Y., Yamanaka N. Evaluation of a rapid immunochromatographic ODK-0901 test for detection of pneumococcal antigen in middle ear fluids and nasopharyngeal secretions. *PLoS One.* 2012; 7(3): e33620. Epub 2012 Mar 20.
  132. Gwaltney J.M.Jr. Sinusitis. En Mandell G.L., Douglas R.D., Bennett J.E. (Eds). *Principles and practice of infectious diseases (3<sup>a</sup> Ed.)*. Churchill Livingstone Inc. New York, 1990; 510-514.
  133. Gwaltney J.M.Jr., Scheld W.M., Sande M.A., Sydnor A. The microbial etiology and antimicrobial therapy of adults with acute community-acquired sinusitis: A fifteen-year experience at the University of Virginia and review of other selected studies. *J Allergy Clin Immunol.* 1992; 90: 457-462.
  134. Dingle J.H., Badger F.F., Jordan W.F.Jr. *Illnes in the home. A study of 25.000 illnesses in a group of Cleveland families.* Cleveland: The Press of Western Reserve University. 1964; 292.
  135. Ohe Y., Maruyama H., Deguchi I., Fukuoka T., Kato Y., Nagoya H., Dembo T., Tnahashi N. An adult case of

- pneumocephalus and pneumococcal meningitis associated with the sphenoid sinusitis. Intern Med. 2012; 51(9): 1129-31.
136. Straus A.L., Hamburguer M. Pneumococcal endocarditis in the penicillin era. Arch Intern Med. 1966; 118: 190-198.
137. Ugolini V., Pacifico A., Smitherman T.C. et al. Pneumococcal endocarditis update: analysis of 10 cases diagnosed between 1974 and 1984. Am Heart J. 1986; 112: 813-819.
138. Madsen R.G. Ladefoged K., Kjaergaard J.J., Andersen P.S., Clemmensen C. Endocarditis in Greenland with special reference to endocarditis caused by *Streptococcus pneumoniae*. Int J Circumpolar Health. 2009 Sep; 68(4); 347-53.
139. Finley J.C., Davidson M., Parkinson A.J., Sullivan R.W. Pneumococcal endocarditis in Alaska native. Arch Intern Med. 1992; 152: 1641-1645.
140. Aronin S.I., Mukherjee S.K., West J.C., Cooney E.L. Review of pneumococcal endocarditis in adults in the penicillin era. Clin Infect Dis. 1998; 26(1): 165-171.
141. Karchmer A.W. Infective endocarditis. In: Braunwald E. Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1997; 1077-1104.
142. Estevao Midon M., Godoni F., Rocha Souza S.G., Schiemann Miyasato J.N. Austrian Syndrome. Arq Bras Cardiol. 2011; 97(3): e50-e52.
143. Rubio J.R.S., Sánchez M.A., Domingues J.C.C., Moreno A.R., Pavlovic D., Cortés F.B. et al. Síndrome de Austrian (Endocarditis, meningitis y neumonía por *Streptococcus pneumoniae*): a propósito de un caso poco frecuente. Rev Esp Cardiol. 1998; 51(12): 1006-8.
144. White B., Diggle M., Todd A., Dundas S., Inverarity D. A novel pneumococcus with a new association. Travel Med Infect Dis. 2011 Mar; 9(2): 84-7. Epub 2011 Mar 21.
145. Le Frock J.L., Kannangara D.N. Bacterial arthritis. En: Kass Edward H., Platt R., eds. Current Therapy in Infectious Disease-2. 1986; 313-315.

146. Morris I.M. Pneumococcal septic arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1987; 46: 943-948.
147. Habelt S., Schwaller A., Hollinger A., Mica L. Septic polyarthritis caused by *Streptococcus pneumoniae*: primary pneumococcal pneumonia as a risk factor in older patients? A case report. *BMJ Cas Rep.* 2009; 2009. pii: bcr02.2009.1604.
148. Adell M.T., Llibre J.M., Tena C., Faura A. Neumonía y artritis de rodilla. Diagnóstico a primera vista. *Enf Infec y Microbiol Clin.* 1990; 8: 390-391.
149. Lamaître C., Ferroni A., Doit C., Vu-Thien H., Glorion C., Raymond J., Mary P., Wicart P., Bingen E., Ilharreborde B., Lorrot M. Pediatric osteoarticular infections caused by *Streptococcus pneumoniae* before and after the introduction of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 May.
150. Limaiem R., Merdassi A., Lahdhiri I., Mghaieth F., Fendri M., El Matri L. Orbital cellulitis and endophthalmitis after cataract surgery. *Bull Soc Blge Ophtalmol.* 2008; (309-310): 27-30.
151. Moore P.J., Linnemann C.C. Jr., Sanitato J.J., Binnion B. Pneumococcal endophthalmitis corneal transplantation: control by modification o harvesting techniques. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1989; 10: 102-105.
152. Farber B.P., Weinbaum D.L., Dummer J.S. Metastatic bacterial endophthalmitis. *Arch Intern Med.* 1985; 145: 62-64.
153. Torii H., Miyata H., Sugisaka E., Ichikawa Y., Shinoda K., Inoue M., Bilateral endophthalmitis in a patient with bacterial meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Ophthalmologia.* 2008; 222(5): 257-9.
154. Shankar K., Gyanendra L., Hari S., Narayan S.D., Culture proven endogenous bacterial endophthalmitis in apparently healthy individuals. *Ocul Immunol Inflamm.* 2009 Nov-Dec; 17(6): 396-9.
155. Chandesris M.O., Hot A., Join-Lambert O., Loulergue P., Ferroni A., Lorthalary O., Viard J.P. Contribution of molecular tools for the diagnosis of endogenous pneumococcal



- endophthalmitis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. *Scand J. Infect Dis.* 2007; 39(11-12): 1080-1.
156. Miller J.J., Scott I.U., Flynn H.W. Jr., Smiddy W.E., Corey R.P., Miller D. Endophthalmitis caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Am J Ophthalmol.* 2004 Aug; 138(2): 231-6.
157. Soriano F., Pérez-Trallero E., Pallarés R., Meseguer M.A., Fleites A., Gené A., González A., Liñares J., Estebanj., Baquero F., Váldez E., Muñoz-Almagro C. Spanish Pneumococcal Infection Study Network. *Clin Microbiol Inect.* 2006 Jun; 12(6): 519-26.
158. Cheong H.S., Joung M.K., Kang C.I., Ko K.S., Chung D.R., Peck K.R., Lee N.Y., Song J.H. Spontaneous bacterial peritonitis caused by *Streptococcus pneumoniae* in patients with liver cirrhosis. *J Infect.* 2009 Sep; 59(3): 219-9.
159. Corredera L.V., Daruich M.L., Diaz J.I., Cuestas E. E. Emergent pneumococcus primary peritonitis in children: presentation of two cases. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba.* 2007; 64(4): 127-31.
160. Garcia-Gil D., Dominguez Fuentes B., Brun Romero F.M. *S. pneumoniae* induced peritonitis and bilateral tubo-ovarian abscess. *Rev Clin Esp.* 2009 Feb; 209(2): 130-4.
161. Pasticci M.B., Donnini A., Mencacci A, Lapalorcía L.M., Cavazzoni E., Bladelli F. A diagnosis of pneumococcal peritonitis secondary to pyosalpinx in a Young healthy female by culturing peritoneal pus. *New Microbiol.* 2008 Apr; 31(2): 295-8.
162. Vilà de Muga M., Pineda Solas V., Loverdos Eserverri I., Pérez Sánchez J., San Vicente Vela B., Argemí Renom S. *Streptococcus pneumoniae*-induced recurrent vaginitis and peritonitis in a prepubertal child. *An Pediatr (Barc).* 2008 Jun; 68(6): 627-8.
163. Lagos R., Muñoz A., San Martín O., Maldonado A., Hormazabal J.C., Blackwelder W.C., Levine M.M. Age- and serotype-specific pediatric invasive pneumococcal disease:

- insights from systematic surveillance in Santiago. Chile. 1994-2007. *J Infect Dis.* 2008 Dec 15; 198(12): 1809-17.
164. Capdevila O., Pallarés R., Grau I., Tubau F., Liñares J., Gudiol F. Pneumococcal peritonitis in adult patients: report of 64 cases with special reference to emergence of antibiotic resistance. *Arch Intern Med.* 2001 Jul; 161(14): 1742-8.
165. Quiviger S., Fléchelles O., Cécile W., Hatchuel Y. *Streptococcus pneumoniae*-induced hemolytic uremic syndrome: A serotype- 3- associated case. *Arch Pediatr.* 2012 Jun; 19(6): 599-602.
166. Lee C.S., Chen J.J., Chiou Y.H., Shen C.F., Wu C.Y., Chiou Y.Y. Invasive pneumococcal pneumonia is the major cause of pediatric haemolytic-uraemic syndrome in Taiwan. *Nephrology (Carlton).* 2012 Jan; 17(1): 48-52.
167. Bender J.M., Ampofo K., Byington C.L., Grinsell M., Korgenski K., Daly J.A., Mason E.O., Pavia A.T. Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*-induced hemolytic uremic syndrome in Utah children. *Pediatr Infect Dis J.* 2010 Aug; 29(8):712-6.
168. Banerjee R., Hersh A.L., Newland J., Beekmann S.E., Polgreen P.M., Bender J., Shaw J., Copelovitch L., Kaplan B.S., Shah S.S.; Emerging Infections Network Hemolytic-Uremic Syndrome Study Group. *Pediatr Infect Dis J.* 2011 Sep; 30(9): 736-9.
169. Copelovitch L., Kaplan B.S. *Streptococcus pneumoniae*—associated hemolytic uremic syndrome: classification and the emergence of serotype 19A *Pediatric.* 2010 Jan; 125(1): e174-82.
170. Hansman D., Bullen M.M. A Resistant pneumococcus. *Lancet.* 1967; 277: 264-265.
171. Hansman D., Glasgow H., Sturt J., Devitt L., Douglas R. Increased resistance to penicillin of pneumococci isolated from man. *N Eng J Med.* 1971; 284: 175-177.
172. Appelbaum P.C., Bhamjee A., Scragg J.N., Hallett A.F., Bowen A.J., Cooper R.C. *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin an chloramphenicol. *Lancet.* 1977; 2: 995-997.

173. Jacobs M.R., Koornhof H.J., Robins-Browne R.M., Stevenson C.M., Vermaak Z.A., Freiman I., Miller G.B., Witcomb M.A., Isaacson M., Ward J., Austrian R. Emergence of multiply resistant pneumococci. *N Engl J Med.* 1978; 299: 735-740.
174. Acar J.F., Buu-Hoi A.Y. Resistance patterns of important Gram-positive pathogens. *J Antimicrob Chemother.* 1988; 21(suppl C): 41-47.
175. Heffernan H. Antimicrobial susceptibility of clinically significant *Streptococcus pneumoniae* isolates. *N Z Med J.* 1987; 100: 327.
176. Appelbaum P.C. World-wide development of antibiotic resistance in pneumococci. *Eur J Clin Microbiol.* 1987; 6: 367-377.
177. Fenoll A., Martin Bourgon C., Muñoz R., Vicioso D., Casal J. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Spain, 1979-1989. *Rev Infect Dis.* 1997; 13: 56-60.
178. Marton A., Gulyas M., Munoz R., Tomasz A. Extremely high incidence of antibiotic resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary. *J Infect Dis.* 1991; 163: 542-8.
179. Cruz M.T., Jimenez de Anta M.T., Mauri E. Resistencia a la penicilina del *Streptococcus pneumoniae*. *Arch Pediat.* 1981; 32: 15-18.
180. Casal J. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*: serotype distribution of penicillin-resistant strains in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982 Aug; 22(2):222-5
181. Latorre C., Juncosa T., Sanfeliu L. Antibiotic resistance and serotypes of 100 *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in a children's hospital in Barcelona, Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985; 28: 357-359.
182. Pérez del Molino M.L., López J.M., Garea M.T., Pardo F. Resistencias de *Streptococcus pneumoniae* en Galicia. *Enf Infecc y Microbiol Clin.* 1991; 9: 495-497.

183. Liñares J., Pallarés R., Alonso T. et al. Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Bellvitge Hospital, Barcelona, Spain (1979-1990). Clin Infect Dis. 1992; 15: 99-105.
184. Fenoll A., Granizo J.J., Aguilar L., Giménez M.J., Aragoneses-Fenoll L., Hanquet G., Casal J., Tarragó D. Temporal Trends of Invasive *Streptococcus pneumoniae* Serotypes and Antimicrobial Resistance Patterns in Spain from 1979 to 2007. Journal of Clinical Microbiology, 2009 Apr; 1012-1020.
185. Richter S.S., Heilmann K.P., Dohrn C.L., et al. Changing epidemiology of antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 2004-2005. Clin Infect Dis. 2009; 48: e23-e33.
186. Lynch J.P. 3<sup>rd</sup>, Zhanel G.G. *Streptococcus pneumoniae*: does antimicrobial resistance matter? Semin Respir Crit Care Med. 2009; 30: 210-238.
187. Chiu C.H., Su L.H., Huang Y. C, Lai J.C., Chen H.L. Wu T.L., Lin T.Y. Increasing Ceftriaxone Resistance and Multiple Alterations of Penicillin-Binding Proteins among Penicillin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Taiwan. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Sept 2007; 3404-3406.
188. Siira L., Rantala M, Jalava J, et al. Temporal trends of antimicrobial resistance and clonality of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Finland, 2002 to 2006. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53: 2066-2073.
189. Tyrrell G.J., Lovgren M., Chui N., et al. Serotypes and antimicrobial susceptibilities of invasive *Streptococcus pneumoniae* pre and postseven valent pneumococcal conjugate vaccine introduction in Alberta, Canada, 2000-2006. Vaccine. 2009; 27: 3553-3560.
190. Barcus, V.A., Ghanckar K., Yeo M., Coffey T.J., Dowson C.G. Genetics of high level penicillin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. FEMS Microbio Lett. 1995; 126: 299-303.

191. Du Plessis M., Bingen E., Klugman K.P. Analysis of penicillin-binding protein genes of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with reduced susceptibility to amoxicillin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 2349-2357.
192. Karlowsky J.A., Jones M.E., Draghi D.C. Sahm D.F. Clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with different susceptibilities to ceftriaxone and cefotaxime. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 3155-3160.
193. Cafini F., del Campo R., Alou L., Sevillano D., Morosini M.I., Baquero F., Prieto J. on behalf of the Spanish Pneumococcal Network (G03-103). Alterations of the penicillin-binding proteins and *murm* alleles of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates with high-level resistance to amoxicillin in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2006; 57: 224-229.
194. Kosowska K., Jacobs M.R., Bajaksouzian S., Koeth L., Appelbaum P.C. Alterations of Penicillin-Binding Proteins 1A, 2X, and 2B in *Streptococcus pneumoniae* Isolates for Which Amoxicillin MICs Are Higher than Penicillin MICs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* Oct 2004; 4020-4022.
195. Nagai K, Davies T.A., Jacobs M.R. et al. Effects of amino acid alterations in penicillin-binding proteins (PBPs) 1a, 2b, and 2x on PBP affinities of penicillin, ampicillin, amoxicillin, cefditoren, cefuroxime, cefprozil, and cefaclor in 18 clinical isolates of penicillin-susceptible, intermediate, and -resistant pneumococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 1273-80.
196. Soriano F, Cafini F., Aguilar L., Tarragó D., Alou L., Giménez M.J., Gracia M., Ponte M.C., Leu D., Pana M., Letowska I., Fenoll A. Breakthrough in penicillin resistance? *Streptococcus pneumoniae* isolates with penicillin/cefotaxime MICs of 16mg/L and their genotypic and geographical relatedness. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2008; 62: 1234-1240.
197. Mignon du Plessis, Bingen E, Klugman K.P. Analysis of Penicillin-Binding Protein Genes of Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae* with Reduced Susceptibility to

- Amoxicillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Aug 2002; 2349-2357.
198. Liñares J., Alonso T., Pérez J.L., Ayats J., Dominguez M.A., Pallares R., Martín R., Decreased susceptibility of penicillin-resistant pneumococci to twenty-four beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 1992 Sep; 30(3): 279-88.
  199. Figueiredo A.M., Connor J.D., Severin A., Vaz Pato M.V., Tomasz A., A pneumococcal clinical isolate with high-level resistance to cefotaxime and ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992 Apr; 36(4); 886-9.
  200. Ruiz J., Sempere M., Simarro E., Fenoll A. Description of two new isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Spain that are highly resistant to cefotaxime. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(10): 2768-9.
  201. Bradley J.S., Connor J.D. Ceftriaxone failure in meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* with reduced susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Pediatr Infect Dis J*. 1991; 10(11): 871-3.
  202. O'Keeffe P.T., Bayston R. Pneumococcal meningitis in a child with a ventriculo-peritoneal shunt. *J. Infect*. 1991; 22: 77-79.
  203. Cantón E. Cefotaxime Breakpoint for *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1993; 616-7.
  204. Ellmén J.K, Renkonen O.V., Anttila M.A., Peltola H.O. Antibiotic concentrations in liquor compared to the minimal inhibitory concentrations of isolates in paediatric bacterial meningitis. *Chemotherapy (Basel)* 1991; 37: 1-5.
  205. Catalán M.J., Fernández J.M., Vázquez A., Varela de Seijas E., Suárez A., Bernaldo de Quirós J.C. Failure of cefotaxime in the treatment of meningitis due to relatively resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis*. 1994; 18(5):766-9.
  206. Friedland I. R., Shelton S., Paris M., Rinderknecht S., Ehrett S., Krisher K., McCracken G.H. Jr. Dilemmas in diagnosis and management of cephalosporin-resistant

- Streptococcus pneumoniae* meningitis. *Pediatr Infect Dis J*. 1993; 12(3): 196-200.
207. Friedland I.R., Paris M., Ehrett S., Hickey S., Olsen K., McCracken G.H. Jr. Evaluation of antimicrobial regimens for treatment of experimental penicillin- and cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993; 37(8): 1630-6.
208. John C.C. Treatment failure with use of a third-generation cephalosporin for penicillin-resistant pneumococcal meningitis: case report and review. *Clin Infect Dis*. 1994; 18(2): 188-93.
209. Viladrich P.F., Gudiol F., Liñares J., Rufi G., Ariza J., Pallares R. Characteristics and antibiotic therapy of adult meningitis due to penicillin-resistant pneumococci. *Am J Med*. 1998 May; 84(5): 839-46.
210. Friedland I.R., Shelton S., Paris M., Rinderknecht S., Ehrett S., Krisher K., McCracken G.H. Jr. Dilemmas in diagnosis and management of cephalosporin resistant *Streptococcus pneumoniae* meningitis. Department of Pediatrics, University of Texas Southwestern Medical School, Dallas. *Pediatr Infect Dis J*. 1993 Mar; 12(3): 196-200.
211. Fenoll A., Jado I., Vicioso D., ere A., Casal J. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain: update (1990 to 1996). *J Clin Microbiol*. 1998 Dec; 36(12): 3447-54.
212. Doern G.V., Brueggemann A., Holley H.P. Jr., Rauch A.M. Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* recovered from outpatients in the United States during the winter months of 1994 to 1995: results of a 30-center national surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 May; 40(5): 1208-1213.
213. Li C.F., Liu M.F., Shi Z.Y., Hsueh P.R. Liao C.H., Jang T.N., Tsao S.M., Kung H.C. Hsu G.J., Cheng Y.J., Lin H.C., Liu Y.C., Chuang Y.C., Wang L.S., Chen C.M. Changing trends in antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Taiwan, 2006-2007.

214. Imöhl M., Reinert R.R., van der Linden M. Adult invasive pneumococcal disease between 2003 and 2006 in North.Rhine Westphalia, Germany: serotype distribution before recommendation for general pneumococcal conjugate vaccination for children <2 years of age. Clin Microbiol Infect. 2009 Nov; 15(11): 1008-12.
215. Dixon J.M. Pneumococcus resistant to erythromycin and lincomycin. Lancet. 1967; 1: 573.
216. Kislak J.W. Type 6 pneumococcus resistant to erythromycin and lincomycin. N Eng J Med. 1967; 276: 852.
217. Parker R.H., Davison R., Paterson P.Y., Madden G. Erythromycin-resistant pneumococcal osteomyelitis. Am J Med. 1970; 48: 132-136.
218. Geslin P., Bou-Hoi A. Frémaux A., Acar F. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an epidemiological survey in France, 1970-1990. Clin Infect Dis. 1992; 15: 95-98.
219. Marton A. Pneumococcal antimicrobial resistance: the problem in Hungary. Clin Infect Dis. 1992; 15: 106-111.
220. Sempere M.A., Gómez J., Ruiz J. Resistance of *Streptococcus pneumoniae* to erythromycin in adults and children. J Antimicrob Chemother. 1992; 29: 348-349.
221. Marchese A., Tonoli E., Debbia E.A., Schito G.C., Macrolide resistance mechanisms and expression of phenotypes among *Streptococcus pneumoniae* circulating in Italy. J Antimicrob Chemother. 1999; 44(4): 461-464.
222. Shortridge V.D., Doern G.V., Brueggemann A.B., Beyer J.M., Flamm R.K. Prevalence of macrolide resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* isolates from a multicenter antibiotic resistance surveillance study conducted in the United States in 1994-1995. Clin Infect Dis 1999; 29(5): 1186-1188.
223. Wierzbowski A.K., Nichol K., Laing N., Hisanaga T., Nikulin A., Karlowsky J.A., Hoban D.J. Zhanel G.G., Macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* isolated over 6 years of Canadian Respiratory Organism



- Susceptibility Study (CROSS) (1998-2004). *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60(4): 733-740.
224. Ferrell D.J., Jenkins S.G., Brown S.D., Patel M., Lavin B.S., Klugman K.P. Emergence and spread of *Streptococcus pneumoniae* with erm(B9 and mef(A) resistance. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11: 851-858.
225. Isozumi R., Ito Y., Ishida T., Osawa M., Hirai T., Ito I., Maniwa K., Hayashi M., Kagioka H., Hirabayashi M., Onari K., Tomioka H., Tomii K., Ghoma I., Imai S., Takakura S., Inuma Y., Ichiyama Y., Mishima M., the Kansai Community Acquired Pneumococcal Pneumonia Study Group. Genotypes and related factors reflecting macrolide resistance in pneumococcal pneumonia infections in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45: 1440-1446.
226. Evans W., Hansman D. Tetracycline-resistant pneumococcus. *Lancet* 1963; 1: 451.
227. Turner G.C. Tetracycline-resistant pneumococci in a general hospital. *Lancet* 1963; 2: 1292-1295.
228. Schaedler R.W., Choppin PW, Zabriskie J H. Pneumonia caused by tetracycline-resistant pneumococci. *N Eng J Med.* 1964; 270: 127-129.
229. Mera R.M., Miller L.A., Amrine-Madsen H., Sahm D.F. The impact of the pneumococcal conjugate vaccine on antimicrobial resistance in the United States since 1996: evidence for a significant rebound by 2007 in many classes of antibiotics. *Microb Drug Resist.* 2009 Dec; 15(4): 261-8.
230. Casal J. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*. Serotype distribution of penicillin resistant strains in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982; 22: 222-225.
231. Pérez J.L., Liñares J., Bosch J., López de Goicoechea M.J., Martín R. Antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* in childhood carriers. *J Antimicrob Chemother* 1987; 19: 278-280.
232. Latorre Otín C., Juncosa Morros T., Sanfeliu Sala I. Antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolates

- from paediatric patients. *J Antimicrob Chemother.* 1998; 22: 659-665.
233. Casal J., Echeita A. Serotipos y sensibilidad a los antibióticos de los neumococos aislados en España durante un estudio multicéntrico sobre neumonías. *Med Clin (Bar).* 1983; 80: 27-29.
234. Rios Dueñas E., Rodríguez-Avial I., Picazo J.J., In vitro activity of ceftobiprole and seven other antimicrobial agents against invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Spain. *Eur J Clin Microbial Infect Dis.* 2011Dec; 30(12): 1621-5.
235. Easow J.M., Joseph N.M., Shankar P.R., Rajamony A.P., Dhungel B.A., Shivananda P.G. *Streptococcus pneumoniae* infections in western Nepal. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2011 Jul; 42(4): 912-9.
236. Aguilera R.C., González R.G., Bello T.H., Mella M.S., Blaney D.R., Chabouty G.H., Hormazábal O J.C., Maldonado B.A., Rojas U.B., Seoane M.M., Dominguez Y.M. Antimicrobial susceptibility, capsular serotypes and clonal relationship of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in adult population of the Bio-Bio region, Chile. 2005-2006. *Rev Chilena Infectol.* 2010 Oct; 27(5): 392-7.
237. Hoeningl M., Fussi P., Feierl G., Wagner-Eibel U., Leitner E., Masoud L, Zarfel G., Marth E., Grisold A.J.. Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Sotheast Austria, 1997-2008. *Int J Antimicrob Agents.* 2010 Jul; 36(1): 24-7.
238. Johnny M., Babelly M., Al-Obaid I., Al-Benwan K., Udo E.E., Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in a tertiary hospital in Kuwait, 1997-2007: implications for empiric therapy. *J Infect Public Health.* 2010; 3(2): 60-6.
239. Calatayud L., Ardanuy C., Cercenado E., Fenoll A., Bouza E., Pallarés R., Martín R., Liñares J. Abstr. 16<sup>th</sup> Eur. Cong. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Nice, France, 2006 1 to 4 April, abstr. P1815.
240. Hansman D., Bullen M.M. A resistant pneumococcus. *Lancet.* 1967: ii: 264-265.

241. Cybulska J., Jeljaszewic J., Lund E., Munksgaard A., Prevalence of types of *Diplococcus pneumoniae* and their susceptibility to 30 antibiotics. *Chemotherapy (Basel)*. 1970; 15: 340-316.
242. Liñares J., Garau J., Domínguez D., Perez J.L. Antibiotic resistance and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* from patients with community-acquired pneumococcal disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 1983; 23: 545-547.
243. Percival A., Armstrong E.C., Turner G.C., Increased incidence of tetracycline-resistant pneumococci in Liverpool in 1968. *Lancet*. 1969; 1: 998-1000.
244. Moyo S.J., Steinbakk M., Aboud S., Mkopi N., Kasubi M., Blomberg B., Manji K., Lyamuya E.F., Maselle S.Y., Langeland N. Penicillin resistance and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal carrier children under-5 years in Dar es Salaam, Tanzania. *J Med Microbiol*. 2012 Mar.
245. Benbachir M., Elmdaghri N., Belabbes H., Haddioui G., Benzaid H., Zaki B. Eleven-year surveillance of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Casablanca (Morocco). *Microb Drug Resist*. 2012 Apr; 18(2): 157-60.
246. Cornick J.E., Everett D.B., Broughton C., Denis B.B., Banda D.L., Carrol E.D., Parry C.M., Invasive *Streptococcus pneumoniae* in children. Malawi. 2004-2006. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jun; 17(6): 1107-9.
247. Austrian R. Pneumococcal pneumonia. *Chest*. 1986; 90: 738-743.
248. Cecil R.L., Austin J.H. Results of prophylactic inoculation against pneumococcus in 12,519 men. *J Exp Med*. 1945; 28: 19-30.
249. McLeod C.M., Hodges R.G., Heidelberger M., Bernhard W.G., Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides. *J Exp Med*. 1945; 82:445-465.
250. Austrian R., Douglas R.M., Schiffman G., Coetzee A.M., Koornhof H.J., Hayden-Smith S., Reid R.D.W. Prevention of

- pneumococcal pneumonia by vaccination. *Trans Assoc Am Phys.* 1976; 89:184-92.
251. Robbins J.B., Austrian R., Lee L.-J., Restogi C., Schiffman G., Henrichsen J., Mäkela P.H., Broome C.V., Facklam R.R., Tiesjema R.H., Parke J.C.Jr. Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. *J Infect Dis.* 1983; 148: 1136-1159.
  252. Anónimo. An expanded pneumococcal vaccine. *Med Lett.* 1983; 25: 91.
  253. La Force F.M. Pneumococcal vaccine: an emerging consensus. *Ann Intern Med.* 1988; 108: 757-759.
  254. Lipera W., Zarrabi M.H., Rosner F. et al. Pneumococcal vaccine failure. *N Eng Med.* 1987; 1: 1272-1273.
  255. Hager H.L., Woolley T.W., Berk S.L. Review of recent pneumococcal infections with attention to vaccine and nonvaccine serotypes. *Rev Infect Dis.* 1990; 12: 267-272.
  256. Smith P. Oberholzer D., Hayden-Smith S., Koornhof H.J., Hilleman M.R. Protective efficacy of pneumococcal polysaccharide vaccines. *JAMA.* 1977; 238: 2613-2616.
  257. Riley I.D., Tarr P.L., Andrews M., Jennison G. Immunization with a polyvalent pneumococcal vaccine: reduction of adult respiratory mortality in a New Guinea highlands community. *Lancet.* 1977; 1: 1338-1341.
  258. Morbid Mortal Weekly Rep. CDC, Atlanta. Recommendations of the immunization practices Advisory Committee Pneumococcal Polysaccharide Vaccine. *JAMA.* 1989; 261: 1265-1267.;
  259. Broome C.U., Facklam R.R., Fraser D.W. Pneumococcal vaccination: an alternative method to estimate the efficacies of pneumococcal vaccine. *N Engl J Med.* 1980; 303: 549-552.
  260. Noah N.D. Vaccination against pneumococcal infection. *Br Med J.* 1988; 297: 1351-1352.
  261. Hilleman M.R., Carlson A.J., McLean A., Vella P.P., Weibel R.E., Woodhour A.F. *Streptococcus pneumoniae*

- polysaccharide vaccine: age, dose responses, safety, persistence of antibody, revaccination, and simultaneous administration of pneumococcal and influenza vaccines. *Rev Infect Dis.* 1981; 3(suppl): S31-S42.
262. Editorial. Pneumococcal vaccine: An emerging consensus. *Ann Intern Med.* 1988; 108: 757-759.
263. Stein K.E. Thymus-independent and thymus-dependent responses to polysaccharide antigens.
264. Mostow S.R., Cate T.R., Ruben F.L. Prevention of influenza and pneumonia. *Am Rev Respir Dis.* 1990; 142: 487-488.
265. Schwartz B., Breiman R.F. Pneumococcal immunization: from policy to practice. *JAMA.* 1990; 264: 1154-1155.
266. Joint Committee on Vaccination and Immunisation. Minutes of the Pneumococcal Subgroup on Tuesday 15<sup>th</sup> January. Department of Health. 2009..
267. Pavia M., Bianco A., Nobile C.G., et al. Efficacy of pneumococcal vaccination in children younger than 24 months: a meta-analysis. *Pediatrics.* 2009; 123: e1103-e1110.
268. Clarke S.C., Jefferies J.M., Smith A.J., McMenamin J., Mitchell T.J., Edwards G.F.S. Potential impact of conjugate vaccine on the incidence of invasive pneumococcal disease among children in Scotland. *J Clin Microbio.* 2006; 44: 1224-1228.
269. Hausdorff W.P., Bryant J., Paradiso P.R. Siber G.R. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis.* 2000; 30: 100-121.
270. Pneumonia hospitalizations among young children before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine –United States, 1997-2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009; 58: 1-4.
271. Gladstone R.A., Jefferies J.M., Faust S.N., Clarke S.C. Continued control of pneumococcal disease in the UK- the impact of vaccination. *Journal of Medical Microbiology.* 2011; 60:1-8.

272. Kaye P., Malkani R., Martin S., Slack M., Trotter C., Jit M., George R., Miller E. Invasive pneumococcal disease (IPD) in England & Wales after 7-valent conjugate vaccine (PCV7); potential impact of 10 and 13-valent vaccines.. Presented at The 27<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Pediatric Infectious Diseases, 9-13 June 2009, Brussels. 2009.
273. Carter, R.J.F. Infants too young to receive pneumococcal conjugate vaccine benefit from herd immunity. *Thorax* 2006; 61: 610.
274. 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; 54: 893-897.
275. Melegaro A., Edmunds W.J. Cost-effectiveness analysis of pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales. *Vaccine.* 2004; 22: 4203-4214.
276. Carvalho MdG. Pimenta F.C., Gertz R.E.Jr. et al. PCR-based quantitation and clonal diversity of the current prevalent invasive serogroup 6 pneumococcal serotype, 6C, in the United States in 1999 and 2006 to 2007. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 554-559.
277. Moore M.R., Gertz R.E. Jr., Woodbury R.L., et al. Population snapshot of emergent *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in the United States, 2005. *J Infect Dis.* 2008; 197: 1016-1027.
278. Huang S.S., Hirinchen V.L., Stevenson A.E., et al. Continued impact of pneumococcal conjugate vaccine on carriage in young children. *Pediatrics.* 2009; 124: e1-e11.
279. Hsu H.E., Shutt K.A., Moore M.R., et al. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. *N Engl J Med.* 2009; 360: 256.
280. Kellner J.D., Vanderkooi O.G., MacDonald J, et al. Changing epidemiology of invasive pneumococcal disease in Canada, 1998-2007: update from the Calgary-area *Streptococcus pneumoniae* research (CASPER) study. *Clin Infect Dis.* 2009; 49: 205-212.

281. Wysocki J., Tejedor J.C., Grunert D., Konior R., Garcia-Sicilia J., Knuf M., Bernard L., Dieussaert I, Schuerman L., Immunogenicity of the 10-valent pneumococcal on-typeable Hemophilus influenza protein D conjugate vaccine (PhiD-CV) when coadministered with different Neisseria meningitides serogroup C conjugate vaccines. *Pediatr Infect Dis.* 2009; n28: S77-S88.
282. Scott D.A., Komjathy S.F., Hu B.T., Baker S., Supan L.A., Monahan C.A., Gruber W., Siber G.R., Lockhart S.P. Phase 1 trial of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in healthy adults. *Vaccine.* 2007; 25: 6164-6166.
283. Cohen R., Levy C., Bonnet E., Thollot F., Boucherat M., Fritzell B., Derkx V., Bingen E., Varon E. Risk factors for serotype 19A carriage after introduction of 7-valent pneumococcal vaccination. *BMC Infectious Diseases.* 2001; 11: 95.
284. Pichichero M.E., Casey J.R. Emergence of a Multiresistant Serotype 19A Pneumococcal Strain Not Included in the 7-Valent Conjugate Vaccine as a Otopathogen in Children. *JAMA* 2007; 298: 15.
285. Skinner J.M., Indrawati L., Cannon J., Blue J., Winters M., Macnair J., Pujar N., Manger W., Zhang Y., Antonello J., Shiver J., Caulfield M., Heinrichs J.H. Pre-clinical evaluation of a 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV 15-CRM197) in an infant-rhesus monkey immunogenicity model. *Vaccine.* 2011 Nov; 29(48): 8870-6.
286. Yildirim I., Hanage W.P., Lipsitch M., Shea K.M., Stevenson A., Finkelstein J., Huang S.S., Lee G.M., Kleinman K., Pelton S.I. Serotype specific invasive capacity and persistent reduction in invasive pneumococcal disease. *Vaccine.* 2010 Dec; 29(2): 283-8.
287. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20, CLSI Wayne, PA. 2010 January; Vol. 30, N<sup>o</sup> 1.
288. Shakir E., Cameron C., Denham B., McMenamin J. Respiratory and immunization quarterly report. *HPS Wkly Rep.* 2009; 43: 407-408.

289. Ampofo K., Pavia A.T., Chris S., Hersh A.L., Bender J.M., Blaschke A.J., Weng H.Y., Korgenski K.E., Daly J., Mason E.O., Byngton C.L. The changing epidemiology of invasive pneumococcal disease at a tertiary children's hospital through the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine era: a case for continuous surveillance. *Pediatr Infect Dis J.* 2012 Mar; 31(3): 228-34.
290. Jansen A., Gerwin D., van der Ende A., van Alphen L., Veenhoven R.H., Spanjaard L., Sander E. Hak E. Invasive Pneumococcal Disease among Adult: Associations among Serotypes, Disease Characteristics, and Outcome. *Clin Inf Dis* 2009; 49: e23-9.
291. Sá-Leao R., Pinto F., Auiar S., Nunes S., Carrico J.A., Frazao N., Gonçalves-Sousa N., Melo-Cristino J. Analysis of Invasiveness of Pneumococcal Serotypes and Clones Circulating in Portugal before Widespread Use of Conjugate Vaccines Reveals Heterogeneous Behavior of Clones Expressing the same Serotype. *Journal of Clinical Microbiology.* 2011 Apr; 1369-1375.
292. Heffernan H.M., Martin D.R., Woodhouse R.E., Morgan J., Blackmore T.K. Invasive pneumococcal disease in New Zealand 1998-2005: capsular serotypes and antimicrobial resistance. *Epidmiol Infect.* 2008 Mar; 136(3): 352-9.
293. Hicks L.A., Harrison L.H., Flannery B., Hadler J.L., Schaffner W., Craig A.S., Jackson D., Thomans A., Geall B. & other authors. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. *J Infect Dis.* 2007; 196: 1646-1354.
294. Pichon B., Beasley L., Slack M., Efstratiou A., Miller E., George R. Effect of the introduction of the pneumococcal conjugate vaccine in the UK childhood immunization scheme on the genetic structure of paediatric invasive pneumococci. In *The 6<sup>th</sup> International Symposium on Pneumococci and Pnevnicicak Diseases*, 8-12 June 2008, Reykjavik Iceland. 2008.
295. Aguiar S.I., Pinto F.R., Nunes S., Serrano I., Melo-Cristino J., Sá-Leao R., Ramírez M., Lencastre H. Denmark-230 Clone as an Increasing cause of pneumococcal infection



- in Portugal within a background of diverse serotype 10A lineages. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010 Jan; 101-108.
296. Haber M., Barskey A., Baughman W., Barker L., Whitney C. G., Shaw K. M., Orenstein W., Stephens D.S. Herd immunity and pneumococcal conjugate vaccine: a quantitative model. *Vaccine* 25, 2007; 5390-5398.
297. Adam H.J., Karlowsky J.A., Nichol K.A., Gilmour M.W., Hoban D.J., Embree J., Zhanell G.G. Baseline epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* serotypes in Canada prior to the introduction of the 13-valent pneumococcal vaccine. *Microb Drug Resist*. 2012 Apr; 18(2).176-82.
298. Horacio A.N., Diamantttino-Miranda J., Aguiar S.I., Ramirez M., Melo-Cristino J., Portuguese Group for Study of Streptococcal Infections. Serotype changes in adult invasive pneumococcal infections in Portugal did not reduce the high fraction of potentially vaccine preventable infections. *Vaccine*. 2012 Jan; 30(2): 218-24.
299. Aguiar S.I., Brito M.J., Gonçalo-Marquea J., Melo-Cristino J., Ramirez M. Serotypes 1, 7F and 19A became the leading causes of pediatric invasive pneumococcal infections in Portugal after 7 years of heptavalent conjugate vaccine use. *Vaccine*. 2010 Jul; 28(32): 5167-73.
300. Muñoz-Almagro C., Jordan I., Gene A., Latorre C., Garcia-Garcia J.J., Pallares R. Emergence of invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes in the era of 7-valent conjugate vaccine. *Clin Infect Dis*. 2008 Jan; 46(2): 174-82.
301. Muñoz-Almagro C., Esteva C., de Sevilla M.F., Selva L., Gene A., Pallares R. Emergence of invasive pneumococcal disease caused by multidrug-resistant serotype 19A among children in Barcelona. *J Infect*. 2009 Aug; 59(2): 75-82.
302. Artilles F., Horcajada I., Cañas A.M., Alamo I., Bordes A., González A., Santan M., Lafarga B. Epidemiological features of invasive pneumococcal disease before and after the introduction of pneumococcal disease before and after the introduction of pneumococcal conjugate vaccine in Gran Canaria (Canary Islands). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009 Jan; 27(1);14-21.

303. Jefferies J.M., Smith A.J., Edwards G.F.S., McMenamin J., Mitchell T.J., Clarke S.C. Temporal analysis of invasive pneumococcal clones from Scotland illustrates fluctuations in diversity of serotype and genotype in the absence of pneumococcal conjugate vaccine. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 87-96.
304. Kirkham L.-A., Jefferies J.M.C., Kerr A.R., Jing Y., Clarke S.C., Smith A., and Mitchell T.J. Identification of invasive serotype 1 pneumococcal isolates that express nonhemolytic pneumolysin. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 151-159.
305. Picazo J., Ruiz-Contreras J., Castor-Flores J., Giangaspro E., Del Castillo F., Hernández-Sampelayo T., Otheo E., Balboa F., Rios E., Méndez C., Relationship between serotypes, age, and clinical presentation of invasive pneumococcal disease in Madrid, Spain, after introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine into the vaccination calendar. *Clin Vaccine Immunol.* 2011 Jan; 18(1):89-94.
306. Pai R., More M.R., Pilishvili T., Gertz R.E., Whitney C.G., Beall B. Postvaccine genetic structure of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A from children in the United States. *J Infect Dis.* 2005 Dec; 192(11): 1988-95.
307. Grall N., Hurmic O., Al Nakib M., Longo M., Poyart C., Ploy M.C., Varon E., Raymond J. Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* in France before introduction of the PCV-13 vaccine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011 Dec; 30(12): 1511-9.
308. Ho P.L., Chiu S.S., Ang I, Lau Y.L. Serotypes and antimicrobial susceptibilities of invasive *Streptococcus pneumoniae* before and after introduction of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine, Hong Kong, 1995-2009. *Vaccine.* 2011 Apr; 29(17): 3270-5.
309. Miller E., Andrews N.J., Waight P.A., Slack M.P., George R.C. Herd immunity and serotype replacement 4 years after seven-valent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2011 Oct; 11(10): 760-768.

310. Tarragó D., Fenoll A., Sánchez-Tatay D., Arroyo L.A., Muñoz-Almagro C., Esteva C., Hausdorff W.P., 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.
311. Byington C.L., Hulten K.G., Ampofo K., Sheng X., Pavia A.T., Blaschke A.J., Pettigrew M., Korgenski K. Daly J., Mason E.O. Molecular epidemiology of pediatric pneumococcal empyema from 2001 to 2007 in Utah. *J Clin Microbiol.* 2010 Feb; 48(2):520-5.
312. Strachan R.E., Cornelius, A., Gilbert G.L., Gulliver T., Martin A., McDonald T., Nixon G.M. Roseby R., Ranganathan S., Selvadurai H., Smith G., Soto-Martinez M., Suresh S., Teoh L. Thapa K., Wainwright C.E., Jaffé A. Bacterial Causes of Empyema in Children, Australia, 2007-2009. *Emerging Infectious Diseases.* 2011 Oct; 17: 1839-1845.
313. Vila-Corcoles A., Ochoa-Gondar O., Gomez-Bertomeu F., Raga-Luria X. Invasive pneumococcal disease in Catalanian elderly people, 2002-2009; serotype coverage for different anti-pneumococcal vaccine formulations at the beginning of the new conjugate vaccines era. *Vaccine.* 2011 Oct; 29(43): 7430-4.
314. Dochez A.R. Gillespie L.J. A biologic classification of pneumococci by means of immunity reactions. *JAMA* 1913; 61: 727-730.
315. Dagan R., Gradstein S., Belmaker I., Porat N., Siton Y., Weber G., Janco J., Yagupsky P. An outbreak of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 in a closed community in southern Israel. *Clin Infect Dis.* 2000; 30: 319-321.
316. DeMaria A., Browne K., Berk S.L., Sherwood E.J., McCabe W.R. An outbreak of type 1 pneumococcal pneumonia in a men's shelter. *JAMA.* 1980; 244: 1446-1449.
317. Fraser D., Givon-Lavi N., Bilenko N., Dagan R. A decade (1989-1998) of pediatric invasive pneumococcal disease in 2 populations residing in 1 geographic location: implications for vaccine choice. *Clin Infect Dis.* 2001; 33: 421-427.

318. Sleeman K., Knox K., George R., Miller E., Waight P., Griffiths D., Efstratiou A., Broughton K., Mayon-White R.T., Moxon E.R., Crook D.W. on behalf of the Public Health Laboratory Service and the Oxford Pneumococcal Surveillance Group. Invasive pneumococcal disease in England and Wales: vaccination implications. *J Infect Dis.* 2001; 183: 239-246.
319. Henriques Normark B., Kalin M., Ortqvist A., Akerlund T., Olsson Liljequist B., Hedlund J., Svenson S.B., Zhou J., Spratt B.G., Normark S., Kallenius G. Dynamic of penicillin-susceptible clones in invasive pneumococcal disease. *J Infect dis.* 2001; 184: 861-869.
320. Koradsen H.B., Kalsoft M.S. Invasive pneumococcal infections in Denmark from 1995 to 1999; epidemiology, serotypes and resistance. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9: 358-365.
321. McFarlane A.C., Hamra L.K., Reiss-Levy E., Hansman D. Pneumococcal peritonitis in adolescent girls. *Med J Aust.* 1979; 1: 100-101.
322. Sirotnak A.P., Eppes S.C., Klein J.D. Tuboovarian abscess and peritonitis caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 in young girls. *Clin Infect Dis.* 1996; 22: 993-996.
323. Westh H., Skibsted L., Korner B. *Streptococcus pneumoniae* infections of the female genital tract and in the newborn child. *Rev Infect* 1990; 12: 416-422.
324. Gilman B.B., Anderson G.W. A community outbreak of type 1 pneumococcus infection *Am J Hyg.* 1938; 28: 345-358.
325. Mackenzie G.M. Epidemiology of an outbreak of pneumococcal pneumonia in a rural community. *Trans Assoc Am Physicians.* 1940; 55: 199-208.
326. Smillie W.G., Warnock G.H., White H.J. A study of type 1 pneumococcus epidemic at the estate hospital at Worcester, Massachusetts. *Am J Pub Health.* 1938; 28: 293-302.
327. Brueggemann A.B., Spratt B. G. Geographic Distribution and Clonal Diversity of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 1

Isolates. Journal of Clinical Microbiology. 2003 Nov; 4966-4970

328. Byington C.L., Spencer L.Y., Johnson T.A., Pavia T.A., Allen D. Mason E.O., Kaplan S., Carroll K.C., Daly J.A., Christenson J.C., Samore M.H. An epidemiological investigation of a sustained high rate of pediatric parapneumonic empyema; risk factors and microbiological associations. Clin Infect Dis. 2002; 34: 434-440.
329. Scott J.A., Hall A.J., Hannington A., Edwards R., Mwarumba S.M., Lowe B., Griffiths D., Crook D., Marsh K. Serotype distribution and prevalence of resistance to benzypenicillin in three representative populations of *Streptococcus pneumoniae* isolates from the coast of Kenya. Clin Infect Dis 1998; 27: 1442-1450.
330. Aguiar D.L., Serrano I., Pinto F.R., Melo-Cristino J., Ramirez M. Changes in *Streptococcus pneumoniae* serotypes causing invasive disease with non-universal vaccination coverage of the seven-valent conjugate vaccine. Clin Microbiol Infect. 2008; 14: 835-843.
331. Ardanuy C., Tubau F, Pallares R., Calatayud L., Dominguez M.A., Rolo D., Grau I., Martin R., Linares 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; 48: 57-64.
332. Brueggemann A.B., Pai R., Crook D.W., Beall B. Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. PLoS Patogens.2007; 3: e168.
333. Dagan R., Givon-Lavi N., Leibovitz E., Greenberg D., Porat N. Introduction and proliferation of multidrug resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A clones that cause acute otitis media in an unvaccinated population. J Infect Dis. 2009; 199: 776-785.
334. Hwa Choi E., Hee Kim S., Wook Eun B., Jung Kim S., Hee Kim N., Lee. J., Jong Lee H. *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in children South Korea. Emerg Infect Dis. 2008; 14: 275-281.

335. Tarragó D., Aguilar L., García R., Gimenez M.J., Granizo J.J., Fenoll A. Evolution of clonal and susceptibility profiles of serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* among Invasive Isolates from Children in Spain, 1990 to 2008. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*. 2011 May; 2297-2302.
336. Mahjoub-Messai F., Doit C., Koeck J.L., Bilard T., Evrard B., Bidet P., Hubans C., Raymond J., Levy C., Cohen R., Bingen E. Population snapshot of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A isolates before and after introduction of seven-valent pneumococcal vaccination for French children. *J Clin Microbio*. 2009; 47: 837-840.
337. Picazo J., Ruiz-Contreras J., Hernandez B., Sanz F., Gutierrez A., Cercenado E., Meseguer M.A., Delgado-Iribarren A., Rodriguez-Avial I., Méndez C. Clonal and clinical profile of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A causing pediatric invasive infections: a 2-year (2007-2009) laboratory-based surveillance in Madrid. *Vaccine*. 2011 Feb; 29(9): 1770-6.
338. Fenoll A., Aguilar L., Vicioso M.D., Giménez M.J., Robledo O., Granizo J: J., Méndez C. Serotype distribution and susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolates from pleural fluid in Spain from 1999 to 2008. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010 Dec; 5387-5390.
339. Jin P., Kong F., Xiao M, Oftadeh S., Zhou F., Liu., Russell F., Gilbert G.L. First report of putative *Streptococcus pneumoniae* serotype 6D among nasopharyngeal isolates from Fijian children. *J Infect Dis*. 2009; 200: 1375-1380.
340. Park I.H., Park S., Hollingshead S...K., Nahm M.H. Genetic basis for the new pneumococcal serotype, 6C. *Infect Immun*. 2007a; 75: 4482-4489.
341. Rolo D., Fenoll A., Ardanuy C., Calatayud L, Cubero M., de la Campa A.G., Liñares J. Trends of invasive serotype 6C pneumococci in Spain: emergence of a new lineage. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Aug; 66(8): 1712-8.
342. Du Plessis M., von Gottberg A., Madhi S.A., Hattingh O., de Gouveia L., Klugman K.P. 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 Nov; 32 Suppl 1: S66-70.
343. Marimon J.M., Ercibengoa M., Alonso M., García-Medina G., Pérez-Trallero E. Prevalence and molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6C causing invasive disease in Gipuzkoa, northern Spain. 1990-2009. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010 Aug; 29(8): 1035-8.
344. Green M.C., Mason E.O., Kaplan S.L., Lamberth L.B., Stovall S.H., Givner L.B., Bradley J.S., Tan T.Q., Barson W.J., Hoffman J.A., Lin P.L., Hulten K.G. Increase in prevalence of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6C at Eight Children's Hospitals in the United States from 1993 to 2009. *J Clin Microbiol*. 2011 Jun; 49(6): 2097-101.
345. Tocheva A.S., Jefferies J.M., Christodoulides M., Faust S.N., Clarke S.C., Increase in serotype 6C pneumococcal carriage, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*. 2010 Jan; 16(1): 154-5.
346. Cooper D., Yu X., Sidhu M., Hahm M.H., Fernsten P., Jansen K.U. The 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) elicits cross-functional opsonophagocytic. Killing responses in humans to *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6C and 7A. *Vaccine*. 2011 Sep; 29(41): 7207-11.
347. Calix J.J., Dagan R., Pelton S.I., Porat N., Nahm M.H. Differential occurrence of *Streptococcus pneumoniae* serotype 11E between asymptomatic carriage and invasive pneumococcal disease isolates reflects a unique model of pathogen microevolution. *Clin Infect Dis*. 2012 Mar; 54(6): 794-9.
348. Tocheva A.S., Jefferies J.M., Rebery H., Bennett J., Afmimeke G., Garland J., Christodoulides M., Faust S.N., Clarke S.C. Declining serotype coverage of new pneumococcal conjugate vaccines relating to the carriage of *Streptococcus pneumoniae* in young children. *Vaccine*. 2011 Jun; 29(26): 440-4.
349. Berhrman R.E., Meyers V.R., Mendelson M.H., Sacks H.S., Hirschman S.Z. Central nervous system infections in the elderly. *Arch Intern Med*. 1989; 149: 1596-9.

350. Fenoll A., Giménez J.J., Vicioso M.D., Granizo J.J., Robledo O., Aguilar L. Susceptibility of pneumococci causing meningitis in Spain and prevalence among such isolates of serotypes contained in the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *J Antimicrobiol Chemother.* 2009 Dec; (6): 1338-40.
351. Mook-Kanomir B.B., Geldhoff :, van der Poll T., Van de Beek D. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 2011 Jul; 24(3): 557-91.
352. De Sevilla M.F., García-García J.J., Esteva C., Moraga F., Hernández S., Selva L., Coll F., Ciruela P., Planes A.M., Codina G., Salleras L., Jordan I., Domínguez A., Muñoz-Almagro C. Clinical presentation of invasive pneumococcal disease in Spain in the era of heptavalent conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis.* 2012 Feb; 31(2): 124-8.
353. Levi 2011
354. Levi 2008
355. Azzari C., Moriondo M., Cortimiglia M., Valleriani C., Canessa C., Infolfi G., Ricci S., Nieddu F., de Martino M., Resti M., Italian group for the study of Invasive Pneumococcal Disease. Potential serotype coverage of three pneumococcal conjugate vaccines against invasive pneumococcal infection in Italian children. *Vaccine.* 2012 Mar; 30(16): 2701-5.
356. Lepoutre A., Varon E., Georges S., Gutmann L, Levy-Bruhl D. Impact of infant pneumococcal vaccination on invasive pneumococcal diseases in France, 2001-2006. *Euro Surveill.* 2008; 13(35).
357. Chen Y., Deng W., Wang S.M., Mo Q.M., Jia H., Wang Q., Li S.G., Li X., Yao B.D., Liu C.J., Zhan Y.Q., Ji C., Lopez A.L., Wang X.Y. Burden of pneumonia and meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* in China among children under 5 years of age: a systematic literature review.
358. Metlay J.P., Schulz R., Li Y.H. et al. Influence of age on symptoms at presentation in patients with community-acquired pneumonia. *Arch Intern Med.* 1997; 157: 1453-1459.



359. Spencer D.A., Iqbal S.M., Hasan A., Hamilton L. Empyema thoracic is still increasing in UK children. *Bmj*. 2006; 332: 1136.
360. Bekri H., Cohen R., Varon E., Madhi F., Gire R., Guillot F, et al. *Streptococcus pneumoniae* serotypes involved in children with pleural empyemas in France. *Arch Pediatr*. 2007; 14: 239-43.
361. Hsieh Y.C., Husueh P.R. Lu C.Y., Lee P.I., Lee C.Y., Huang L.M. Clinical manifestations and molecular epidemiology of necrotizing pneumonia and empyema caused by *Streptococcus pneumoniae* in children in Taiwan. *Clin Infect Dis*. 2004; 38: 830-5.
362. Eastham K.M., Freeman R., Kearns A.M., Eltringham G., Clark J., Leeming J., et al. Clinical features, aetiology and outcome of empyema in children in the north east of England. *Thorax*. 2004; 59: 522-5.
363. Van Ackere T., Proesmans M., Vermuelen F., Van Raemdonck D., De boeck K. Complicated parapneumonic effusion in Belgian children: increased occurrence before routine pneumococcal vaccine implementation. *Eur J Pediatr*. 2009 Jan; 168(1):51-8.
364. Strachan R., Jaffe A. Assessment of the burden of paediatric empyema in Australia. *J Paediatr Child Health*. 2009; 45: 431-6.
365. Whitney C.G., Farley M.M., Hadler J., Harrison L.H., Bennett N.M., Lynfield R., Reingold A., Cieslak P.R., Pilishvili T., Jackson D., Facklam R.R., Jorgensen J.H., Shuchat A., and the Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med*. 2003; 348: 1737-1746.
366. Picazo J., Ruiz-Contreras J., Casado-Flores J., Negreira S., Del Castillo F., Hernández-Sampelayo T., Bueno M., Calvo C., Ríos E., Méndez C. HERACLES Study Group. Laboratory-bases, 2-year surveillance of pediatric parapneumonic pneumococcal empyema following heptavalent pneumococcal

- conjugate vaccine universal vaccination in Madrid. *Pediatr Infect Dis J.* 2011; 30(6): 471-4.
367. Li S.T., Tancredi D.J., Empyema hospitalizations increased in US children despite pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics.* 2010 Jan; 125(1): 26-33.
368. Hendrickson D.J., Blumberg D.A., Joad J.P., Jhawar S., McDonald R.J. Five-fold increase in pediatric parapneumonic empyema since introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2008 Nov; 27(11): 1030-2.
369. Byington C.L., Korgenski K., Daly J., Ampodo K., Pavia A., Mason E.O. Impact of the pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal parapneumonic empyema. *Pediatr Infect Dis J.* 2006 Mar; 25(3): 250-4.
370. Flecher M., Leeming J., Cartwrigth K., Finn A. South West of England Invasive Community Acquired Infection Study Group. Childhood empyema: limited potential impact of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2006; 25(6): 559-60.
371. Espín M.I., Sandoval A., Ruiz J., Navarro J.A., García J., Pérez Flores D. Enfermedad neumocócica invasiva en niños de la Región de Murcia. *Gac Sanit.* 2002; 16(5): 385-91
372. Muñoz-Almagro C., Selva L, Pallares R. Influence of pneumococcal vaccine on the incidence of empyema. *Curr Opin Pulm Med.* 2010 Jul; 16(4): 394-8.
373. Obando I., Muñoz-Almagro C., Arroyo L.A., Tarragó D., Sánchez-Tatay D., Moreno-Pérez D., Dhillon S.S., Esteva C., Hernández-Bou S., García-García J.J., Hausdorff W.P., Brueggemann A.B. Pediatric Parapneumonic Empyema, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2008 Sep; 14(9): 1390-7.
374. Resti M., Micheli A., Moriondo M., Becciolini L., Cortimiglia M., Canessa C., Infolfi G., Bartolini E., de Martino M., Azzari C. Comparison of the effect of antibiotic treatment on the possibility of diagnosing invasive pneumococcal disease by culture or molecular methods: a prospective, observational study of children and adolescents with proven pneumococcal infection. *Clin Ther.* 2009 Jun; 31(6): 1266-73.

375. Resti M., Moriondo M., Cortimiglia M., Indolfi G., Canessa C., Beccioli L., Bartolini E., de Benedictis F.M., de Martino M., Azzari C; Italian Group for the Study of Invasive Pneumococcal Disease. Community-acquired bacteremic pneumococcal pneumonia in children: diagnosis and serotyping by real-time polymerase chain reaction using blood samples. Italian Group for the Study of Invasive Pneumococcal Disease. Clin Infect Dis. 2010 Nov 1;51(9): 1042-9.
376. Strachan R.E., Cornelius A., Gilbert G.L., Gulliver T., Martin A., McDonald T., Nixon G.M., Roseby R., Ranganathan S., Selvadurai H., Smith G., Soto-Martinez M., Suresh S., Teoh L., Thapa K., Wainwright C.E., Jaffé A; Australian Research Network in Empyema. A Bedside assay to detect *Streptococcus pneumoniae* in children with empyema. Pediatr Pulmonol. 2011 Feb; 46(2): 179-83.
377. World Health Organization (WHO). Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization-WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec. 2007; 82: 93-104.
378. Black S., Shinefield H., Fireman B., et al. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal vaccine in children. Pediatr Infect Dis J. 2000; 19: 187-95.
379. Whitney C.G., Pilishvili T., Farley M.M., et al. Effectiveness of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease: a matched case-control study. Lancet. 2006; 368: 1495-502.
380. Cutts F.T., Zaman S.M., Enwere G., et al. Efficacy of nine-valent pneumococcal conjugate vaccine against pneumonia and invasive pneumococcal disease in The Gambia: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet. 2005; 365: 1139-46.
381. Klugman K.P., Madhi S.A., Huebner R.E., et al. A trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with and those without HIV infection. N Engl J Med. 2003; 349: 1341-8.
382. Pallarés R., Liñares J., Vadillo M., Cabellos C., Manresa F., Viladrich P.F., Martín R., Gudil F. Resistance to penicillin and cephalosporin and mortality from severe pneumococcal

- pneumonia in Barcelona, Spain. N Engl J Med. 1995 Aug; 333(8): 474-80.
383. Jacobs M.R. Drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: rational antibiotic choices. Am J Med. 1999 May; 106(5A): 19S-25S; discussion 48S-52S.
384. Jacobs R.F., Kaplan S.L., Schutze G.E., Dajani A.S., Leggiadro R.J., Rim C.S., Puri S.K. Relationship of MICs to efficacy of cefotaxime in treatment of *Streptococcus pneumoniae* infections. Antimicrob Agents Chemother. 1996 Apr; 40(4): 895-8.
385. Tan T.Q., Schutze G.E., Mason E.O. Jr., Kaplan S.L. Antibiotic therapy and acute outcome of meningitis due to *Streptococcus pneumoniae* considered intermediately susceptible to broad-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother. 1994 May; 38(5): 918-23.
386. Fenoll A., Giménez M.J., Robledo O., Aguilar L., Tarragó D., Granizo J.J., Gimeno M., Coronel P. In vitro activity of oral cephalosporins against pediatric isolates of *Streptococcus pneumoniae* non-susceptible to penicillin, amoxicillin or erythromycin. J Chemother. 2008 Apr; 20(2): 175-9.
387. Fenoll A., Giménez M.J., Robledo O., Aguilar L., Tarragó D., Granizo J.J., Martín-Herrero J.E. Influence of penicillin/amoxicillin non-susceptibility on the activity of third-generation cephalosporins against *Streptococcus pneumoniae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008 Jan; 27(1): 75-80.
388. Goosens M.C., Catry B., Verhaegen J. Antimicrobial resistance to benzyl penicillin in invasive pneumococcal disease in Belgium, 2003-2010: the effect of altering clinical breakpoints. Epidemiol Infect. 2012 Jun; 1-6.
389. Bettinger J.A., Scheifele D.W., Kellner J.D., Halperin S.A., Vaudry W., Law B., Tyrrel G; Canadian Immunization Monitoring Program Active (IMPACT). The effect of routine vaccination on invasive pneumococcal infections in Canadian children, Immunization Monitoring Program, Active 2000-2007. Vaccine Feb; 28(9): 2130-6.

390. Hampton L.M., Farley M.M., Schaffner W., Thomas A., Reingold A., Harrison L.H., Lynfield R., Bennett N.M., Petit S., Gershman K., Baumbach J., Beall B., Jorgensen J., Glennen A., Zell E.R. Moore M. Prevention of antibiotic-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* with conjugate vaccines. *J Infect Dis.* 2012 Feb; 205(3): 401-11.
391. Kempf M., Baraduc R., Bonnabau H., Brun M., Chabanon G., Chardon H., Croizé J., Demachy M.C., Donnio P.Y., Dupont P., Fosse T., Gibel L., Gravet A., Grignon B., Hadou T., Hamdad F., Joly-guillou M.L., Koeck J.L., Maugein J., Péchinot A., Ploy M.C., Raymond J., Ros A., Roussel-Delvallez M., Segonds C., Vergnaud M., Vernet-Garnier V., Lepoutre A., Gutmann L., Varon E., Lanotte P. Epidemiology and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in France in 2007: data from the pneumococcus surveillance network. *Microb Drug Resist.* 2011 Mar; 17(1): 31-6.
392. Gertz R.E. Jr., Li Z., Pimenta F.C., Jackson D., Juni B.A., Lynfield R. Jorgensen J.H., Carvalho M.G., Beall B.W., for the Active Bacterial Core Surveillance Team. Increased penicillin nonsusceptibility of nonvaccine-serotype invasive pneumococci other than serotypes 19A and 6A in post-7-valent conjugate vaccine era. *J Infect Dis.* 2010 Mar; 201(5): 770-5.
393. Ardanuy C., Rolo D., Fenoll A., Tarrago D., Calatayud L., Liñares J. Emergence of a multidrug-resistant clone (ST 320) among invasive serotype 19A pneumococci in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Sep; 64(8): 507-10.
394. Morosini M.I., Cantón R., Loza E., Negri M.C., Galán J.C. Almaraz F. Baquero F. In vitro activity of telithromycin against Spanish *Streptococcus pneumoniae* isolates with characterized macrolide resistance mechanisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45: 2427-2431.
395. Schito G.C. Felmingham D. Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin, azithromycin and telithromycin (PROTEXT 1999-2003). *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 26: 479-485.
396. Calatayud L., Ardanuy C., Tubau F., Rolo D., Grau I., Pallarés R., Martín R., Liñares J. Serotype and genotype replacement among macrolide-resistant invasive pneumococci

- in adults: Mechanisms of resistance and association with different transposons. *J Clin Microbio.* 2010 Apr; 48(4): 1310-6.
397. Calatayud L., Ardanuy C., Cercenado E., Fenoll A., Bouza E., Pallares R., Martín R., Liñares J. Serotypes, clones, and mechanisms of resistance of erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates collected in Spain. *Antimicrobiob Agents Chemoter.* 2007 Sep; 51(9): 3240-6.
398. Liu Z., Nachamkin I., Edelstein P.H., Lautenbach E., Metlay J.P. Serotype emergence and genotype distribution among macrolide-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in the postconjugate vaccine (PCV-7) era. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Feb; 56(2): 743-50.
399. Cochetti I., Tili E., Vecchi M., Manzini A., Mingoia M. Varaldo P.E., Montanari M.P. New Tn916-related elements causing erm (B)-mediated erythromycin resistance in tetracyclinesusceptible pneumococci. *J Antimicrob chemother.* 2007; 60: 127-131.
400. Leclercq R., Courvalin P. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 2727-2734.
401. Varaldo P.E., Montanari M.P., Giovanetti E.E. Genetic elements responsible for erythromycin resistance in streptococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 343-353.
402. Cooke B., Smith A., Diggle M., Lamb K., Robertson C., Inverarity D., Jefferies J., Edwards G., Mitchell T., Clarke S., McMenemy J. Antibiotic resistance in invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates identified in Scotland between 1999 and 2007. *J Med Microbio.* 2010 Oct; 59(Pt10); 1212-8.
403. Rodriguez-Avial I., Ramos B., Rios E., Cercenado E., Ordobás M., Sanz J.C.; Madrid *Streptococcus pneumoniae* Microbiological Group. Clonal spread of levofloxacin-resistant *streptococcus pneumoniae* invasive isolates in Madrid, Spain, 2007 to 2009. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 May; 55(5): 2469-71.

404. Gant C.M., Rosingh A.W., López-Montangas J.L., van der Heijden M., González-Morán F., Bijlsma J.J., Canton E., RedMiva (Network of Microbiological Vigilance of Comunidad Valenciana). Serotype distribution and antimicrobial resistance of invasive pneumococcal disease strains in the Comunidad Valenciana, Spain during the winter of 2009-2010; low PCV7 coverage and high levofloxacin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jul.
405. Hoge C.W., Reichler M.R., Dominguez E.A. & 7 other authors. An epidemic of pneumococcal disease in an overcrowded, inadequately ventilated jail. *N Engl J Med.* 1994; 331: 643-648.
406. Kristinsson K.G. Epidemiology of penicillin resistant pneumococci in Iceland *Microb Drug Resist.* 1995; 1: 121-125.
407. Mandigers C.M., Diepersloot R.J., Dessens M., Mol S.J., van Klengeren B. A hospital outbreak of penicillin-resistant pneumococci in The Netherlands. *Eur Respir J.* 1994; 7: 1635-1639.
408. Muñoz R., Coffey T.J., Daniels M. & other authors. Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.* 1991; 164: 302-306.
409. Lieberman A., Dagan R., Leibovitz E., Yagupsky P., Fliss D.M. The bacteriology of the nasopharynx in childhood. In *J Pediatr Otorhinolaryngol.* 1999; 49: S151-153.
410. Black, S.B., Shinefield H.R., Ling S., Hansen J., Fireman B., Spring D., Noyes J., Lewis E., Ray P., Lee J., Hackell J. Effectiveness of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children younger than five years of age for prevention of pneumonia. *Pediatr Infect Dis J.* 2002; 21: 810-815.
411. Eskola J., Kilpi T., Palmu A. & 11 other authors. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med.* 2001; 344: 403-409.
412. Dagan R., Givon-Lavi N., Zamir O., Sikuler-Cohen M., Guy L., Janco J., Yagupsky P., Fraser D. Reduction of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* after administration of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine

- to toddlers attending day care centers. *J Infect Dis.* 2002; 185: 927-936.
413. Veenhoven R., Bogaert D., Uiterwal C. & 9 other authors. Effect of pneumococcal vaccine followed by polysaccharide pneumococcal vaccine on recurrent acute otitis media. *Lancet.* 2003; 361: 2189-2195.
414. López B., Cima M.D., Vázquez F., Fenoll A., Gutiérrez J., Fidalgo C., Caicoya M., Méndez F.J. Epidemiological study of *Streptococcus pneumoniae* carriers in healthy primary-school children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999 Nov; 18(11): 771-6.
415. Garcia-Vera C., Ruiz Andrés M.A., Arana Navarro T., Moneo Hernández I., Castillo Laita J.A., Macipe Costa R., Revillo Pinilla M.J. Nasopharyngeal carriage of pneumococcal serotypes in healthy pre-school aged children after 7-valent pneumococcal vaccine. *Med Clin (Barc).* 2011 Jun; 137(1): 1-7.
416. Obando I., Sánchez-Tatay D., Molinos-Quintana A., Delgado-Pecellin I., Porras A., Orillo-Gutiérrez B., Fenoll A., Lirola M.J. Epidemiology of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in children <6 years old in Seville. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011 Oct; 29(8): 581-6.
417. Sanchez-Tatay D., Arroyo L.A., Tarragó D., Lirola M.J., Porras A., Fenoll A., Hausdorff W.P., Brueggemann A.B., Obando I. Antibiotic susceptibility and molecular epidemiology of nasopharyngeal pneumococci from Spanish children. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14: 797-801.
418. Wroe P.C., Lee G.M., Finkelstein J.A., Pelton S.I., Hanage W.P., Lipsitch M., Stevenson A.E., Rifa-Shiman S.L., Kleinman K., Dutta-Linn M.M., Hinrichsen V.L., Lakoma M., Huang S.S. Pneumococcal carriage and antibiotic resistance in young children before 13-valent conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2012 Mar; 31(3): 249-54.
419. Kuo C.Y., Hwang K.P., Hsieh Y.C., Cheng C.H., Huang F.L., Shen Y.H., Huang Y.C., Chiu C.H., Chen P.Y., Lin T.Y. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Taiwan Before and after the introduction of a conjugate vaccine. *Vaccine.* 2011 Jul; 29(32): 5171-7.



420. Valente C., Hinds J., Pinto F., Brugger S.D., Gould K., Mühlemann K., de Lencastre H., Sá-Leão R. Decrease in pneumococcal co-colonization following vaccination with the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. *PloS One*. 2012; 7(1): e30235.
421. Lakshman R., Murdoch C., Race G., Burkinshaw R., Shaw L., Finn A. Pneumococcal nasopharyngeal carriage in children following heptavalent pneumococcal conjugate vaccination in infancy. *Arch Dis Child*. 2003 Mar; 88(3): 211-4.
422. Ansaldi F., de Florentis D., Canepa P., Zancolli M., Martini M., Orsi A., Durando P., Icardi G., Carriage of *Streptococcus pneumoniae* 7 years after implementation of vaccination program in a population with very high and long-lasting coverage, Italy. *Vaccine*. 2012 Mar; 30(13): 2288-94.
423. Spijkerman J., van Gils E.J.M., Veenhoven R.H., Hak E., Yzerman P.F. van der Ende A., Wijmenga-Monsuur A.J., van den Dobbelsteen G. P.J.M. Sanders E.A.M. Carriage of *Streptococcus pneumoniae* 3 years after start of vaccination program, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*. 2011; 17: 584-591.
424. Scott J.R., Millar E.V., Lipsitch M., Moulton L.H., Weatherholtz R., Perilla M.J., Jackson D.M., Beall B., Craig M.J., Reid R., Santosham M., O'Brien K.L. Impact of more than a decade of pneumococcal conjugate vaccine use on carriage and invasive potential in Native American communities. *J Infect Dis*. 2012 Jan; 205(2): 280-8.
425. Dunais B., Bruno-Bazureault P., Carsenti-Dellamonica H., Touboul P., Pradier C. A decade-long surveillance of nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae* among children attending day-care centers in south-eastern France: 1999-2008. *Eur J clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Jul; 30(7): 837-4.
426. Grivea I.N., Tasantouli A.G., Michoula A.N., Syrogiannopoulos G.A. Dynamics of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage with high heptavalent pneumococcal conjugate vaccine coverage in Central Greece. *Vaccine*. 2011 Nov; 29(48): 8882-7.

427. Ho P.L., Chiu S.S., Chan M.Y., Ang I., Chow K.H., Lau Y.L. Changes in nasopharyngeal carriage and serotype distribution of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* before and after the introduction of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in Hong Kong. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011 Dec; 71(4): 327-34.
428. Nahm M.H., Lin J., Finkelstein J.A., Pelton S.I. Increase in the prevalence of the newly discovered pneumococcal serotype 6C in the nasopharynx after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *J Infect Dis.* 2009; 199: 320-5.
429. Van Gils E.J., Veenhoven R.H., Hak E., Rodenburg G.D., Kijzers W.C., Bogaert D., Trzcinski K., Bruin J.P., van Alphen L., van der Ende A., Sanders E.A. Pneumococcal conjugate vaccination and nasopharyngeal acquisition of pneumococcal serotype 19A strains. *JAMA.* 2010 Sep; 304(10): 1099-106.
430. Hanage W.P., Bishop C.J., Lee G.M., Lipsitch M., Stevenson A., Rifas-Shiman S.L., Pelton S.I., Huang S.S., Finkelstein J.A. Clonal replacement among 19A *Streptococcus pneumoniae* in Massachusetts, prior to 13 valent conjugate vaccination. *Vaccine.* 2011 Nov; 29(48): 8877-81.
431. Weinberger D.M., Trzeinski K., Lu Y.J., Bogaert D., Brandes A., Galagan J., et al. Pneumococcal capsular polysaccharide structure predicts serotype prevalence. *PLoS Pathog.* 2009; 5: e1000476.
432. Albrich W.C., Baughman W., Schmotzer B., Farley M.M. Changing characteristics of invasive pneumococcal disease in metropolitan Atlanta, Georgia, after introduction of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Infect Dis.* 2007; 44: 1569-76.
433. Sjöström K., Spindler C., Ortqvist A., Kalin M., Sandgren A., Kühlmann-Berenzon S., et al. Clonal and capsular types decide whether pneumococci will act as a primary or opportunistic pathogen. *Clin Infect Dis.* 2006; 42: 451-9.
434. Brueggemann A.B., Peto T.E.A., Crook D.W., Butler J.C., Kristinsson K.G., Spratt B. G. Temporal and Geographic Stability of the Serogroup-Specific Invasive Disease Potential of

- Streptococcus pneumoniae* in Children. *Journal Infection Diseases*. 2004; 190.
435. Hanage W.P., Kaijalainen T.H., Syrjänen R.K., Auranen K., Leinonen M., Mäkelä P.H., Spratt B.G. Invasiveness of serotypes and clones of *Streptococcus pneumoniae* among children in Finland. *Infect Immun*. 2005; 73(1): 431-5.
  436. Rodenburg G.D., de Greeff S.C., Janasen A.G., de Melder H.E., Schouls L.M., Hak E., et al. Effects of pneumococcal conjugate vaccine 2 years after its introduction, the Netherlands. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16: 816-23.
  437. Ling M.L., Tay L. Epidemiology of pneumococcal infection in Singapore (1977-1986). *Ann Acad Med Singapore*. 1990 Nov; 19(6): 777-80.
  438. Bokaeian M., Khazaei H.A., Javadimehr M. Nasopharyngeal carriage, antibiotic resistance and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* among healthy adolescents in Zahedan. *Iran Red Crescent Med J*. 2011 May; 13(5): 328-33.
  439. Flasche S., Van Hoek A.J., Sheasby E., Waight P., Andrews N., Sheppard C., George R., Miller E. Effect of pneumococcal conjugate vaccination on serotype-specific carriage and invasive disease in England: a cross-sectional study. *PloS Med* 2011 Apr; 8(4): e1001017.
  440. Hashida K., Shiomori T., Hohchi N., Ohkubo J.I., Ohbudhi T., Mori T., Suzuki H. Nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* carriage in Japanese children attending day-care centers. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2011 mar.
  441. Kyaw M.H., Lynfield R., Schaffner W. et al. Effect of introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med*. 2006; 354: 1455-1463.
  442. Stephens D.S., Zughair S.M., Whitney C.G. et al. Incidence of macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* after introduction of the pneumococcal conjugate vaccine: population-based assessment. *Lancet*. 2005; 365: 855-863.

443. Huang S.S., Platt R., Rifas-Shiman S.L., Pelton S.I., Goldmann D., Finkelstein J.A. Post-PCV7 changes in colonizing pneumococcal serotypes in 16 Massachusetts communities, 2001 and 2004. *Pediatrics*. 2005; 116: e408-e413.
444. Temime L., Guillemot D., Boelle P.Y. Short- and long-term effects of pneumococcal conjugate vaccination of children on penicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48: 2206-2213.
445. Rodrigues F., Nuñez S., Sá-Leão R., Gonçalves G., Lemos L., de Lencastre H. *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in children attending day-care centers in the central region of Portugal, in the era of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Microb Drug Resist*. 2009 Dec; 15(4): 269-77.
446. Kim K.H., Hong J.Y., Lee H., Kwak G.Y., Nam C.H., Lee S.Y., Oh E., Yu J., Nahm M.H., Kang J.H. Nasopharyngeal pneumococcal carriage of children attending day care centers in Korea: comparison between children immunized with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and non-immunized. *J Korean Med Sci*. 2011 Feb; 26(2): 184-90.
447. Vasoo S., Singh K., Hsu L.Y., Chiew Y.F., Chow C., Lin R.T., Tambyah P.A. Increasing antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* colonizing children attending day-care centers in Singapore. *Respirology*. 2011 Nov; 16(8): 1241-8.
448. Chavanet P., Atale A., Mahy S., Neuwirth C., Varon E., Dabemat H., Portier H. Nasopharyngeal carriage, antibiotic susceptibility and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in children attending day care centers. *Med Mal Infect*. 2011 Jun; 41(6): 307-17.
449. Grivea I.N., Tsantolliu A.G., Chryssanthopoulou D.C., Syrogiannopoulos G.A. Interaction of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine and the use of individual antibiotics among children on nasopharyngeal colonization with erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010 Jan; 29(1): 97-105.

450. Leach A.J., Morris P.S., McCallum G.B., Wilson C.A., Stubbs L., Beissbarth J., Jacups S., Hare K., Smith-Vaughan H.C. Emerging pneumococcal carriage serotypes in a high-risk population receiving universal 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent polysaccharide vaccine since 2001; BMC Infect Dis. 2009 Aug; 9: 121.
451. Sá-Leão R., Nunes S., Brito-Avô A., Frazão N., Simões A.S., Crisóstomo M.I., Paulo A.C., Saldanha J., Santos-Sanches I., de Lencastre H. Changes in pneumococcal serotypes and antibiotypes carried by vaccinated and unvaccinated day-care centre attendees in Portugal, a country with widespread use of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. Clin Microbiol Infect. 2009 Nov; 15(11): 1002-7.
452. Von Gottberg A., Klugman K.P., Cohen C., Wolter N., de Gouveia L., du Plessis M., Mpenbe R., Quan V., Whitelaw A., Hoffmann R., Govender N., Meiring S., Smith A.M., Schrag S; Group for Enteric, Respiratory and Meningeal Disease Surveillance in South Africa (GERMS-SA). Emergence of levofloxacin-non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* and treatment for multidrug-resistant tuberculosis in children in South Africa; a cohort observational surveillance study. Lancet. 2008 Mar; 371(9618): 1108-13.