



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

# Canvis en l'epidemiologia de la malaltia pneumocòccica invasiva associats a la vacunació amb vacuna antipneumocòccica conjugada 13 valent en població pediàtrica de Catalunya

Sergi Hernández Baeza

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**CANVIS EN L'EPIDEMIOLOGIA DE LA MALALTIA  
PNEUMOCÒCCICA INVASIVA ASSOCIATS A LA VACUNACIÓ  
AMB VACUNA ANTIPNEUMOCÒCCICA CONJUGADA 13  
VALENT EN POBLACIÓ PEDIÀTRICA DE CATALUNYA.**

Memòria de Tesi Doctoral presentada per:

**Sergi Hernández Baeza**

Per a la obtenció del títol de doctor per la Universitat de Barcelona

Realitzada sota la direcció de:

Dra. Àngela Domínguez García

Programa de doctorat "Medicina i Recerca Translacional"

Departament de Medicina, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

Barcelona, 2020







A la Cristina, el Pau i el Lluç.



There is nothing like looking, if you want to find something.

You certainly usually find something, if you look,  
but it is not always quite the something you were after.

J.R.R. Tolkien





## AGRAÏMENTS

En primer lloc vull donar les gràcies a la Dra. Àngela Domínguez, la directora d'aquesta memòria de tesi. Amb el seu entusiasme i la seva crítica sempre constructiva m'han ensenyat el que és la recerca. D'ella m'emporto la seva visió pràctica i basada en la raó. Una manera de fer que m'ha acompanyat no només durant tot aquest viatge sinó també en el meu dia a dia com a professional de la salut pública.

En segon lloc vull donar les gràcies als companys del projecte FIS. Amb el seu esforç han fet possible aquesta memòria de tesi. Tots ells són grans professionals i tot un exemple del que un equip multidisciplinari i multicèntric és capaç d'aconseguir. Entre ells vull destacar, per la seva implicació en els articles que formen part d'aquesta memòria de tesi, a la Dra. Carmen Muñoz, al Dr. Álvaro Díaz, al Dr. Fernando Moraga, a la Dra. Conchita Izquierdo i, especialment, a la Dra. Pilar Ciruela, qui, a més, va ser la persona que em va animar a formar part d'aquest projecte i la meva cap a la Subdirecció de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública durant 13 anys. També vull agrair a l'Encarna Navas, al Dr. Ignacio Aznar i al Dr. Antoni Serrano la seva inestimable col·laboració per a que l'últim article d'aquesta memòria pogués ser una realitat i a la Núria Soldevila pel seu ajut en les anàlisis estadístiques. Vull agrair al Dr. Enric Limón, el meu actual cap al VINCat, els seus consells, els seus ànims i la seva comprensió.

Vull agrair l'amistat i l'acompanyament dels meus antics companys al Departament de Salut. Molts ja no estem al departament però el grup de "becaris i jubilats" perdura gràcies als seus dinars i sopars. Moltes gràcies també a la Dra. Nuria Torner, que m'ha donat suport tant des del vessant personal com professional. Qui ha dit que no es pot treballar bé amb la sogra?

Gràcies als meus amics del Templum per les partides de les nits del dissabte. Potser no han contribuït al meu descans físic però sí al meu descans mental. I als companys de Kukumku, no hi ha res millor que una bona tabalada per alliberar tensions.

Vull agrair als meus pares l'amor i l'educació que m'han donat. Tant ells com la meva germana sempre m'han recolzat en tots els passos que he donat al llarg de la meua vida. Sense ells no estaria avui aquí defensant aquesta memòria de tesi. I gràcies a la meua àvia, crec que és la persona que més ha resat per mi.

Finalment vull donar les gràcies a la meua dona i als meus fills. A vosaltres està dedicada aquesta memòria. Gràcies per estar sempre al meu costat, per la vostra ajuda, la vostra complicitat i la vostra paciència.

## **FINANÇAMENT**

Aquesta memòria de tesi s'ha realitzat dins del marc del projectes d'investigació "Efectividad de la vacuna 13-valente en la prevención de la enfermedad neumocócica invasiva en niños. Estudio de casos y controles" (Projectes PI 11/02081 i PI 11/2345) finançats pel Plan Nacional I+D+I, ISCIII Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria i cofinançada pel Fons Europeu de Desenvolupament Regional (FEDER) i l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR 2014 SGR 1403, 2017 SGR 1342 y 2017 SGR 0742).

Les entitats finançadores no han participat en el disseny de l'estudi, la recollida de dades, l'anàlisi o la redacció dels articles continguts en aquesta memòria de tesi.

L'autor de la tesi i la directora declaren no tenir cap conflicte d'interessos.

## LLISTAT D'ABREVIATURES I ACRÒNIMS

ADN: Àcid desoxiribonucleic

aOR: Odds ratio ajustada

API: Alt poder invasiu

ARN: Àcid ribonucleic

CC: Complex clonal

CIM: Concentració inhibidora mínima

EDTA: Àcid etilendiaminotetraacètic

EEA: European Economic Area

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

EV: Efectivitat vacunal

FEp Fracció evitada en la població

Gen *cps*: Gen capsular polysaccharide synthesis

IC: Interval de confiança

IRR: Raó de taxes d' incidències, pel nom en anglès

LCR: Líquid cefaloraquidi

LytA: Autolisina

MLST: Multilocus sequence typing

MPI: Malaltia pneumocòccica invasiva

MPOC: Malaltia pulmonar obstructiva crònica

Nan: Neuraminidasa

OMA: Otitis mitjana aguda

PBP: Proteïnes d'unió a la penicil·lina

PCR: Reacció en cadena de la polimerasa , pel nom en anglès

PIDIRAC: Pla d'informació de les infeccions respiratòries agudes a Catalunya

EDTA: àcid etilendiaminotetraacètic

Ply: Pneumolisina

PsaA: Proteïna A d'adhesió de superfícies

PspA: Proteïna de superfície pneumocòccica A

PspC: Proteïna de superfície pneumocòccica C

ST: Seqüenciotip

TI: Taxa d'incidència

UCI: Unitat de cures intensives

UE: Unió Europea

VIH: Virus de la immunodeficiència humana

VP: Vessament pleural

VP23: Vacuna polisacàrida 23 valent

VPC: Vacuna polisacàrida conjugada

VPC7: Vacuna polisacàrida conjugada 7 valent

VPC10: Vacuna polisacàrida conjugada 10 valent

VPC13: Vacuna polisacàrida conjugada 13 valent

VRS: Virus respiratori sincitial

## ÍNDEX

<b>1. Introducció.....</b>	<b>15</b>
1.1. Antecedents històrics.....	17
1.2. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	19
1.2.1. Fisiologia .....	19
1.2.2. Estructura .....	21
1.2.3. Classificació i nomenclatura .....	22
1.2.4. Factors de virulència.....	23
1.3. Patogènia .....	27
1.3.1. Definició de la malaltia pneumocòccica invasiva.....	27
1.3.2. Colonització i transmissió .....	27
1.3.3. Disseminació i infecció .....	28
1.4. Manifestacions clíniques de la malaltia pneumocòccica invasiva .....	29
1.4.1. Meningitis .....	30
1.4.2. Pneumònia .....	30
1.4.3. Bacterièmia.....	31
1.4.4. Altres formes invasives.....	31
1.5. Diagnòstic microbiològic de la malaltia pneumocòccica invasiva .....	32
1.5.1. Identificació de <i>S. pneumoniae</i> .....	32
1.5.2. Identificació del serotip de <i>S. pneumoniae</i> .....	35
1.5.3. Identificació clonal de <i>S. pneumoniae</i> .....	37
1.6. Estudi de sensibilitat antibiòtica i tractament antimicrobià.....	37
1.6.1. Estudi de sensibilitat antibiòtica .....	37
1.6.2. Tractament antimicrobià .....	38
1.7. Prevenció de la malaltia pneumocòccica invasiva.....	38
1.7.1. Vacuna polisacàrida .....	39
1.7.2. Vacunes conjugades .....	39
1.7.3. Noves vacunes antipneumocòcciques .....	42
1.8. Epidemiologia de la malaltia pneumocòccica invasiva .....	43

1.8.1.	Epidemiologia de la colonització i la transmissió.....	43
1.8.2.	Epidemiologia de la disseminació i la infecció.....	44
1.8.3.	Evolució de la incidència de la malaltia pneumocòccica invasiva.....	45
1.8.4.	Evolució de la distribució dels serotips causants de malaltia pneumocòccica invasiva.....	47
1.8.5.	Evolució de la sensibilitat antibiòtica dels serotips causants de malaltia pneumocòccica invasiva.....	48
1.8.6.	Costos de la malaltia pneumocòccica invasiva .....	50
<b>2.</b>	<b>Hipòtesi.....</b>	<b>51</b>
<b>3.</b>	<b>Objectius.....</b>	<b>55</b>
3.1.	Objectiu general.....	57
3.2.	Objectius específics: .....	57
<b>4.</b>	<b>Resultats.....</b>	<b>59</b>
4.1.	Article 1:.....	61
4.2.	Article 2:.....	79
4.3.	Article 3:.....	89
4.4.	Article 4:.....	107
4.5.	Article 5:.....	119
<b>5.</b>	<b>Discussió .....</b>	<b>137</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusions.....</b>	<b>155</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliografia .....</b>	<b>159</b>

# 1. INTRODUCCIÓ





## 1.1. ANTECEDENTS HISTÒRICS

*Streptococcus pneumoniae* va ser identificat per primer cop l'any 1881 per Louis Pasteur, a França, i per George Sternberg, als Estats Units. Tots dos van aïllar aquest patògen de la sang de conills que havien estat inoculats amb saliva humana en la qual, prèviament, s'havien observat bacteris en forma de cocs que s'agrupaven en parelles <sup>1</sup>. Inicialment va ser anomenat *Microbe septicemique du salive* per Pasteur i *Micrococcus pasteurii* per Sternberg. El 1886, degut a la seva associació amb la pneumònia lobar va ser anomenat per Fraenkel com a *pneumococcus* i el 1926, atès el seu aspecte ovalat i disposat en parelles a la tinció de gram en les mostres d'esput <sup>2</sup>, es va canviar aquest nom pel de *Diplococcus pneumoniae*. El nom actual, *Streptococcus pneumoniae*, data de l'any 1974 i és degut a la seva morfologia formant cadenes durant el creixement en medi líquid.

*S. pneumoniae* va ser un dels primers bacteris patògens identificats. El seu estudi ha proporcionat avenços fonamentals en l'àmbit clínic, microbiològic, epidemiològic i de prevenció, i ha estat clau per a l'estudi de la resposta humoral, la genètica bacteriana i el desenvolupament de tècniques de diagnòstic.

El paper etiològic de *S. pneumoniae* va quedar palès quan Christian Gram, l'any 1881, va observar diplococs gram positius en teixit pulmonar de pacients amb pneumònia i Fraenkel, el 1886, va observar la seva capacitat per produir malalties pulmonars <sup>1</sup>.

El 1890 Felix i George Klemperer van demostrar que la immunització de conills amb pneumococs morts o inactius els protegia contra la reinfecció per la mateixa soca però no contra altres soques diferents i que, mitjançant la infusió del sèrum d'aquests conills, la protecció es podia transferir a altres conills no immunitzats prèviament. Posteriorment, l'any 1895, Issaef va observar que el sèrum no tenia una activitat bactericida sinó que facilitava la fagocitosi dels pneumococs per part de les cèl·lules del sistema immunitari de l'hoste i que, a més, el sèrum de les persones que s'havien recuperat d'una pneumònia pneumocòccica conferien el mateix grau de protecció. El 1904, Neufeld i Rimpau van demostrar que la base d'aquesta immunitat era la presència d'un o més factors en el sèrum que facilitaven la fagocitosi de *S. pneumoniae* per part dels leucòcits si les bacteris havien estat exposades prèviament a aquest sèrum. Aquest fenomen va ser anomenat opsonització i va permetre establir les bases de la immunitat humoral <sup>1,3</sup>.

Per tal de facilitar la teràpia amb antisèrums específics es van desenvolupar diverses tècniques de serotipat entre les quals destaca la reacció de Quellung, descrita per

Neufeld el 1902 i que consistia en el reconeixement dels serotips capsulars quan una injecció de microorganismes inactivats en un conill estimulava la producció d'un anticòs sèric que causava una aglutinació i inflor capsular de la soca immunitzant <sup>3</sup>. Aquesta tècnica fou provada per primer cop per identificar els serotips de pneumococs en humans el 1931 <sup>1</sup>. Cooper i col., l'any 1932, ja havien descrit 32 serotips entre els quals es trobaven els principals serotips patògens, fet que va permetre desenvolupar antisèrums específics, tot i que no es van poder desenvolupar per a tots els serotips i que no sempre eren efectius. Aquesta limitació es va fer palesa amb la mort del príncep Valdemar de Dinamarca el 1939 degut a una pneumònia produïda per un pneumococ del serogrup 9. El príncep va ser tractat sense èxit amb antisèrum 9L i 9N. Estudis posteriors a la seva mort van mostrar que la pneumònia havia estat causada per un serotip nou que es va anomenar serotip 9V en honor seu. Aquest cas va suggerir la necessitat d'estudiar els diferents serotips que hi ha dins d'un mateix serogrup. Des d'aleshores la reacció de Quellung ha esdevingut l'estàndard de referència pel que fa als mètodes de serotipat capsular i el sistema de classificació danès (que distingeix serogrups i serotips) ha estat l'adoptat mundialment per a la classificació de *S. pneumoniae* <sup>4</sup>.

Els primers estudis que descrivien la morfologia del pneumococ distingien entre pneumococs d'aspecte rugós i pneumococs d'aspecte llis, que no era res més que la descripció dels pneumococs capsulats i no capsulats. El 1917, Dochez i Avery van iniciar l'estudi de la càpsula del pneumococ. El paper fonamental de la càpsula en la virulència de les soques de pneumococ va quedar demostrat per Avery en observar que la digestió enzimàtica de la càpsula del serotip 3 reduïa dràsticament la seva virulència <sup>5</sup>. Heidelberger i Avery van descobrir la naturalesa polisacàrida de la càpsula en estudiar els sobrenedants dels cultius de pneumococ i van demostrar que els anticossos que conferien immunitat estaven relacionats amb aquests polisacàrids <sup>4</sup>. El coneixement d'aquesta immunitat va permetre que, el 1930, Felton preparés els primers polisacàrids capsulars purificats per a la immunització en humans. La vacuna contra el serotip 1 va ser útil per aturar l'epidèmia de pneumònia a l'hospital de Massachusetts entre els anys 1937 i 1938 <sup>3</sup>. MacLeod i col., l'any 1945, van publicar una important reducció de la incidència de la pneumònia entre els militars vacunats amb material capsular dels serotips 1, 2, 5 i 7 <sup>6</sup>. Aquesta vacuna protegia contra la pneumònia causada per aquests quatre serotips però no enfront de la resta. A la dècada de 1960, gràcies als treballs publicats per Austrian <sup>3</sup>, es va fer palesa la necessitat de disposar d'una vacuna polivalent eficaç contra la malaltia causada pel pneumococ. El 1977 es va autoritzar la primera vacuna polisacàrida, que contenia els

polisacàrids capsulars purificats de 14 serotips (1, 2, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9N, 12F, 18C, 19F, 23F, 25F) <sup>7</sup> i finalment, el 1983, la vacuna polisacàrida 23 valent que va reemplaçar a la 14-valent. Aquesta vacuna contenia els polisacàrids capsulars purificats de 23 serotips (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F i 33F) i cobria entre el 60 i el 76% dels casos de malaltia pneumocòccica invasiva (MPI) <sup>8</sup>. Posteriorment es van anar autoritzant les vacunes polisacàrides conjugades (VPC) que incloïen els polisacàrids capsulars purificats: la de 7 serotips (VPC7) l'any 2000 <sup>9</sup>; la de 10 serotips (VPC10) el maig de 2009 <sup>10</sup>; i la de 13 serotips (VPC13) el desembre de 2009 <sup>11</sup>.

L'estudi del *S. pneumoniae* va tenir un paper rellevant per al descobriment de l'àcid desoxiribonucleic (ADN). El 1928, Griffith va demostrar en ratolins que una injecció intraperitoneal de pneumococs no capsulats vius (pneumococs no virulents) juntament amb pneumococs capsulats inactivats per calor ocasionava l'aparició de pneumococs capsulats vius que causaven la mort per pneumònia als ratolins. Aquest fenomen es va anomenar "transformació" i va romandre sense explicació fins a l'any 1944, quan Avery i col. van demostrar que aquesta transformació era deguda a l'ADN i que els pneumococs no capsulats havien adquirit la capacitat de generar una càpsula a partir dels àcids nucleics de les soques mortes dels pneumococs capsulats <sup>1,3</sup>. El 2001, Tetellin i col.<sup>12</sup> van publicar la seqüència genòmica completa de la soca virulenta de *S. pneumoniae* serotip 4 (TIGR4). Aproximadament el 5% del seu genoma estava format per seqüències d'inserció que poden contribuir a la recombinació genètica amb ADN d'altres microorganismes <sup>3</sup>.

Les infeccions pneumocòcciques van ser de les primeres que es van tractar amb antibiòtics (optoquina) i *S. pneumoniae* va ser també dels primers microorganismes que van desenvolupar resistències al tractament antibiòtic <sup>1</sup>. El 1965 es van descriure les primeres soques no susceptibles a la penicil·lina amb una concentració inhibidora mínima (CIM) inferior a 0,2µg/ml <sup>13</sup>.

## 1.2. **STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE**

### 1.2.1. **Fisiologia**

*S. pneumoniae* és un coc gram positiu d'entre 0,5 i 1,2µm de diàmetre menor i 1,2-1,8µm de diàmetre major. Presenta una agrupació en cadenes quan creix en un medi líquid i en forma de diplococ lanceolat en mostres clíniques. Té uns requisits nutricionals exigents. Com la resta d'estreptococs, el pneumococ és catalasa negatiu, però genera activitat peròxid d'hidrogen a través d'un flavoenzim, la qual cosa fa que únicament creixi en medis enriquits amb sang, ja que els eritròcits actuen com a una

font de catalasa<sup>3</sup>. Pot fermentar diversos carbohidrats i el seu principal producte metabòlic és l'àcid làctic. Creix amb dificultat en medis amb elevada concentració de glucosa, ja que l'àcid làctic arriba ràpidament a concentracions tòxiques <sup>2</sup>. És un microorganisme aerobi i el seu creixement es veu afavorit en una atmosfera de 3-5% de CO<sub>2</sub>; també és anaerobi facultatiu.

L'aspecte macroscòpic de les colònies de les soques capsulades és mucós, rodó i de major mida (1-3 mm de diàmetre) que les colònies de soques no capsulades, d'aspecte pla. Totes les colònies experimenten amb el temps un procés d'autòlisi, que consisteix en una dissolució i aparició d'una depressió de la part central de la colònia. Les colònies de les plaques d'agar sang incubades en condicions aeròbiques apareixen rodejades d'un halo de color verd degut a la descomposició de l'hemoglobina per la pneumolisina que produeix el pneumococ. Aquest fenomen és conegut com a alfa-hemòlisi i pot portar a confusió amb altres estreptococs alfa-hemolítics, especialment els del grup *Viridans*. Si les plaques d'agar sang es cultiven en condicions anaeròbiques, es produeix una zona de beta-hemòlisi per l'acció d'una pneumolisina que es degrada en presència d'oxigen <sup>1</sup>.



Figura 1: Morfologia de les colònies de *S. pneumoniae*. Font: ASM MicrobeLibrary. Rebecca Buxton. 2005. Blood agar plates and hemolysis: streptococcus and other catalase negative gram-positive cocci.

La identificació de *S. pneumoniae* es basa en tres característiques fenotípiques específiques que el diferencien d'altres espècies d'estreptococs alfa-hemolítics: la sensibilitat a l'optoquina, la solubilitat en sals biliars (desoxicolat sòdic) i la presència de la càpsula <sup>1</sup>. Però s'han descrit soques de *S. pneumoniae* resistents a l'optoquina. *S. pseudopneumoniae*, que s'associa a exacerbacions de malaltia pulmonar obstructiva crònica i a pneumònia, és sensible a l'optoquina quan creix en condicions aeròbiques a 37°C, però resistent quan creix en un medi enriquit amb CO<sub>2</sub>. Aquests factors han fet que la solubilitat en bilis i les sondes comercials d'ADN per al gen d'àcid ribonucleic (ARN) ribosòmic siguin proves més fiables per a la identificació.

### 1.2.2. Estructura

L'estructura externa de *S. pneumoniae* està formada per:

- Membrana citoplasmàtica

La membrana citoplasmàtica és una bicapa lipídica semipermeable. Té diverses funcions entre les quals està la de regular el pas de substàncies entre l'interior i l'exterior. Dins de la membrana hi ha inserides diverses proteïnes, com les proteïnes d'unió a la penicil·lina, que són uns enzims amb activitat transglicosidasa i transpeptidasa implicats en la síntesi del peptidoglicà de la paret cel·lular. Aquestes proteïnes són les dianes dels antibiòtics β-lactàmics que inhibeixen la funció transpeptidasa interrompent així el mecanisme de síntesi de la paret cel·lular <sup>14</sup>.

- Paret cel·lular

La paret cel·lular rodeja exteriorment la membrana citoplasmàtica. Està formada principalment per peptidoglicà i àcid teïcoic. El peptidoglicà està format per subunitats alternades de N-acetil-Dglucosamida i àcid N-acetilmuràmic, des de les quals s'estenen cadenes d'oligopèptids (de 4 a 6 aminoàcids) que estan entrecruades mitjançant ponts de pentaglicina i aporten la resistència estructural a la paret cel·lular. L'altre component fonamental, l'àcid teïcoic, es pot trobar en dues formes: en forma de polisacàrid C, unit a la capa de peptidoglicà que s'estén a través de la càpsula exterior que rodeja la paret cel·lular, o en forma d'antigen F unit amb enllaços covalents a la membrana citoplasmàtica. Totes dues formes d'àcid teïcoic s'associen a residus de fosfocolina. La fosfocolina juga un paper important en la regulació de la hidròlisi de la paret cel·lular, ja que està implicada en l'activació de l'amidasa, una autolisina pneumocòccica que s'activa durant la divisió cel·lular <sup>3</sup>.

- Càpsula

Les soques virulentes de *S. pneumoniae* tenen la paret cel·lular embolcallada per una càpsula. Està formada per polisacàrids repetits sintetitzats al citoplasma, polimeritzats i transportats a la superfície bacteriana per transferrases de la membrana cel·lular. S'uneixen de forma covalent al peptidoglicà i a la proteïna C <sup>3</sup>.

L'estudi de la càpsula té una gran importància, ja que és antigènica, és la base per a la classificació dels pneumococs en serogrupos i serotips i és determinant per a la patogenicitat <sup>8</sup>. L'estudi de l'estructura repetida de polisacàrids està centrada, per una banda, en els monosacàrids que la formen i com estan units, i per l'altra, en com s'enllacen les esmentades estructures repetides entre elles. Dins de la càpsula es troben grups O-acetil que contribueixen a la conformació de la càpsula i són determinants antigènics. Els estudis estructurals de la càpsula mostren que les similituds serològiques entre els diferents serotips estan relacionades amb les similituds estructurals de les seves càpsules <sup>4</sup>. L'estudi de la composició química de la càpsula de molts pneumococs ha mostrat que és aniònica, la qual cosa implica que té una càrrega negativa que l'ajuda a evitar l'aclariment mucós <sup>15</sup>.

Una propietat important del pneumococ és la seva capacitat d'expressar un sensor proteic de competència i, mitjançant un procés de transformació, adquirir ADN d'altres pneumococs o, fins i tot, d'altres espècies bacterianes <sup>1,3</sup>. Aquest fet el capacita per a adquirir gens exògens que li permeten codificar una càpsula diferent de la seva. En l'era postvacunal aquest intercanvi capsular ha permès que clons de *S. pneumoniae* que expressaven una càpsula d'un serotip vacunal evadeixin l'acció immunològica de la vacuna mitjançant l'adquisició de gens capsulars d'un serotip no vacunal <sup>16,17</sup>.

### 1.2.3. Classificació i nomenclatura

- Serotips

La càpsula de *S. pneumoniae* és l'estructura que es fa servir per classificar serològicament els pneumococs. Els serotips es distingeixen per les diferències químiques dels polisacàrids que conformen la càpsula i per la capacitat del sistema immunitari de reconèixer aquestes diferències estructurals i respondre amb anticossos específics. A l'actualitat hi ha 100 serotips diferents i se'n continuen descobrint de nous <sup>18</sup>.

Hi ha dos sistemes de classificació per als pneumococs: el sistema danès (el més acceptat internacionalment) i el sistema nord-americà. Al sistema danès el serotip es va definir com un conjunt de soques de pneumococ que produïen una càpsula amb



una estructura i unes propietats antigèniques úniques. El serogrup es basa en les reaccions creuades, de tal forma que als serotips amb reaccions serològiques creuades se'ls assigna un serogrup comú. Dins d'un mateix serogrup els serotips es distingeixen per la seva lletra final <sup>19</sup>. Al sistema nord-americà els serotips es numeren seqüencialment seguint l'ordre en que s'han descobert, sense tenir en compte les reaccions creuades entre els serotips i, per tant, sense l'assignació de serogrups <sup>20</sup>. Cada serotip del sistema de classificació danès es correspon amb un únic serotip del sistema americà, excepte el serotip 35A danès que es correspon amb els serotips 47 i 62 del sistema nord-americà <sup>4</sup>.

- Clons i complexes clonals

El fenomen d'intercanvi capsular fa que l'estudi a nivell clonal de les soques aïllades sigui de gran importància en el context vacunal actual. Els seqüenciotips (ST) permeten classificar les soques de *S. pneumoniae* en funció del seu perfil genètic. Els STs que comparteixen un perfil genètic comú s'agrupen en complexes clonals (CC). Un mateix ST pot incloure soques que expressin diferents serotips a causa del fenomen d'intercanvi capsular, per exemple el ST156 inclou aïllaments dels serotips 9V, 14 o 19F. Igualment, un mateix serotip pot incloure STs diferents com, per exemple, el serotip 8 del qual s'han trobat aïllats, entre d'altres, dels ST53, ST63 o ST89 <sup>21</sup>. En l'actualitat es coneixen 14.840 STs corresponents a 47.737 aïllaments <sup>22</sup>. Aquesta classificació permet situar a les poblacions de pneumococ en un context evolutiu que resulta de gran utilitat en l'epidemiologia. Alguns d'aquests complexos poden estar associats a resistències antibiòtiques, a una major virulència o a un territori en concret des del qual es poden disseminar <sup>17,23,24</sup>.

#### **1.2.4. Factors de virulència**

*S. pneumoniae* posseeix un gran nombre de factors de virulència, incloent la mateixa càpsula, les proteïnes de superfície i els enzims i toxines, sense els quals no podria desenvolupar el seu paper patogen. No totes les soques de *S. pneumoniae* tenen la mateixa capacitat per produir aquests factors de virulència i el mecanisme d'acció d'aquests factors encara és objecte d'estudi.



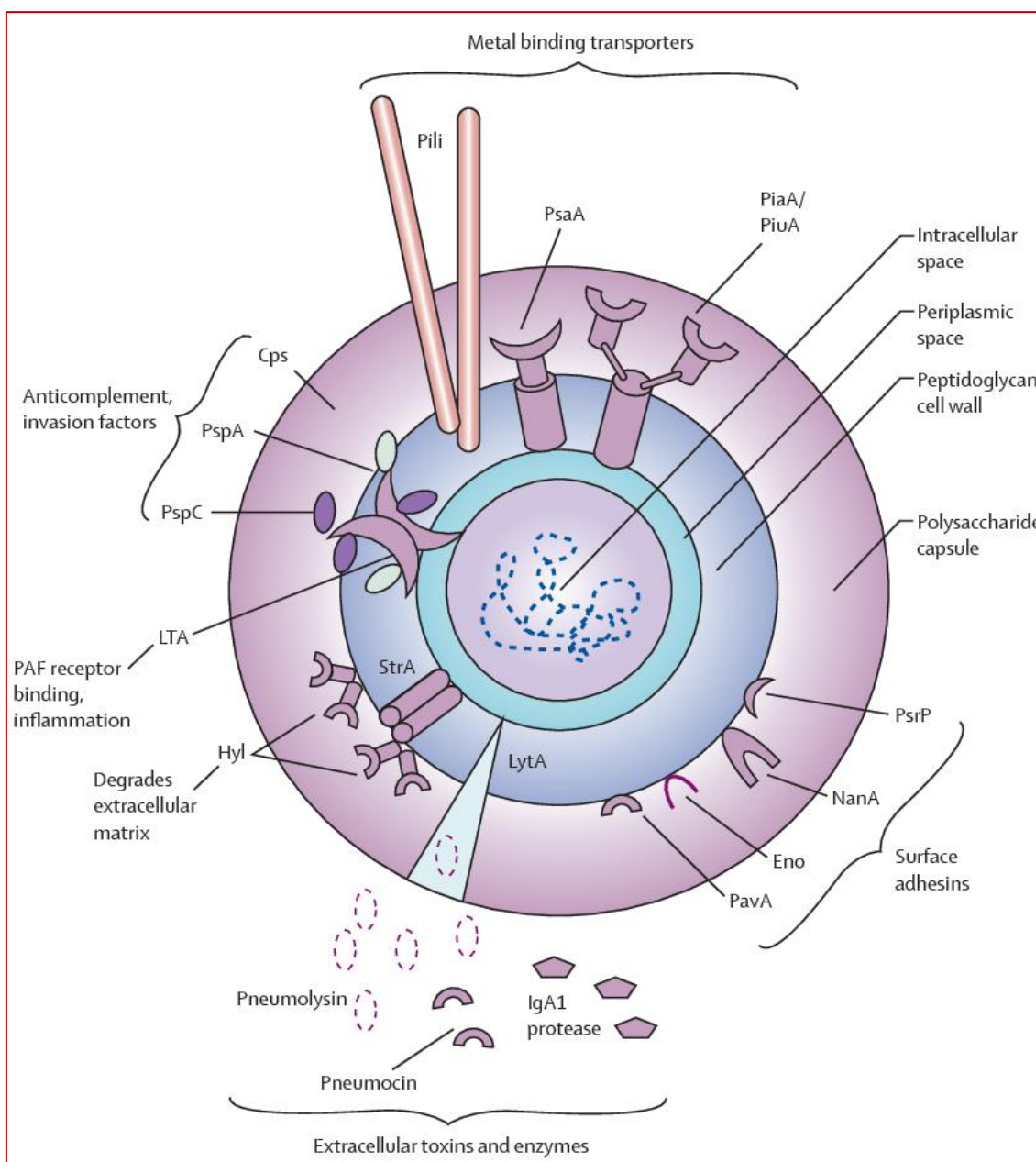


Figura 2. Factors de virulència de *S. pneumoniae*. Font: Van der Poll i col.<sup>25</sup>

Els principals factors de virulència són:

- Càpsula polisacàrida

La producció de la càpsula polisacàrida és el factor de virulència més important de *S. pneumoniae*. Afecta tant a la resposta immunitària mitjançada per neutròfils com al sistema complement. Protegeix al bacteri de la fagocitosi sempre que l'hoste no tingui anticossos específics<sup>26</sup>, impedeix l'opsonització del bacteri mitjançada pels components de les vies alternativa i clàssica del sistema complement, emmascara el reconeixement dels anticossos dels antígens subcapsulars i dificulta la unió de les proteïnes C reactives, inhibint així la via clàssica del sistema complement<sup>27</sup>. Té un

paper destacat en la colonització, ja que impedeix l'eliminació mecànica dels bacteris per l'aclariment mucociliar a la nasofaringe <sup>15</sup>. Actua com una barrera que dificulta la penetració de determinats antibiòtics <sup>25</sup>.

- Pneumolisina (Ply)

La pneumolisina no forma part de les proteïnes de la superfície bacteriana sinó que és un enzim citoplasmàtic que s'excreta al medi quan es produeix la lisi bacteriana, principalment per l'acció de l'autolisina, però també per altres causes com pot ser l'ús d'antibiòtics bacteriolítics <sup>28</sup>. Té la capacitat de destruir les cèl·lules de l'hoste mitjançant la seva unió amb el colesterol present a la paret cel·lular i la posterior creació de porus. Aquesta activitat és la responsable de l'alfa-hemòlisi observada en els cultius enriquits amb sang <sup>2,26</sup>. Activa la ruta clàssica del sistema complement, provocant una inflamació en els teixits infectats i afavorint així la destrucció tissular típica de les infeccions per *S. pneumoniae*. És capaç d'interaccionar amb les cèl·lules de l'endoteli pulmonar causant edema i hemorràgies durant els episodis de pneumònia. Inhibeix l'activitat oxidativa dels fagòcits, contribuint a evitar la fagocitosi <sup>2,28</sup>. En models animals, una major concentració de pneumolisina al líquid cefaloraquídi (LCR) s'ha relacionat amb un major dany cerebral, fet que s'ha de tenir en compte a l'hora de seleccionar la teràpia antibiòtica per al tractament de la meningitis <sup>29</sup>. La pneumolisina juga un paper fonamental en el desenvolupament de la MPI <sup>30</sup>.

- Autolisina (LytA)

Les autolisines són un conjunt d'enzims situats a la càpsula encarregats de regular la lisi bacteriana degradant el peptidoglicà de la paret cel·lular. La més estudiada és la LytA <sup>28</sup>. La seva activitat com a factor de virulència se centra, per una banda, en l'alliberament d'altres components fruit de la seva activitat lítica, el més important dels quals és la pneumolisina <sup>3</sup>, i per l'altra, en la inhibició del sistema complement mitjançant la interacció amb els components C1 (de la via clàssica) i B (de la via alternativa), així com mitjançant la degradació del component C3, impedit l'opsonització <sup>31</sup>.

- Proteïna de superfície pneumocòccica A (PspA)

La PspA és una proteïna que forma part del grup de proteïnes d'unió a la colina que es troba a la superfície de *S. pneumoniae* <sup>32</sup>. Actua sobre el factor B de la cascada del sistema complement, inhibint l'activació de la via alternativa <sup>33</sup>. També inhibeix l'activació de la via clàssica mitjançant dos mecanismes: a) competeix amb la captació de la proteïna C reactiva evitant que es dipositi en la superfície del bacteri, que és un pas necessari que permet l'acció del component C3 <sup>34</sup>, i b) restringeix la deposició del

component C4b a la superfície bacteriana mitjançant la inactivació d'aquest, interrompent la cascada del sistema complement <sup>35</sup>. Protegeix al pneumococ de l'acció bactericida de la xarxa extracel·lular dels neutròfils <sup>36</sup> i s'uneix a la lactoferrina, impedit la seva acció bactericida. Aquest fet facilita la colonització de la nasofaringe, ja que la lactoferrina es troba en gran quantitat a la saliva <sup>37</sup>.

- Proteïna de superfície pneumocòccica C (PspC)

La PspC és una altra de les proteïnes que forma part del grup de proteïnes d'unió a la colina i es troba a la superfície de *S. pneumoniae* <sup>32</sup>. Té la capacitat de captar el factor H del sistema complement, la qual cosa permet al pneumococ evadir l'opsonització del complement C3 i, en última instància, el protegeix de la fagocitosi <sup>3,38</sup>. Juntament amb la PspA és capaç d'inactivar el component C4b del sistema complement <sup>35</sup>. Joga un paper important en la colonització, facilitant l'adhesió a les cèl·lules de la nasofaringe mitjançant la hidròlisi de la IgA present al mucus i la interacció amb el seu receptor de les cèl·lules epitelials de les mucoses <sup>26,39</sup>. És un factor determinant de la MPI a causa de la seva capacitat d'adherència a les cèl·lules endotelials vasculares mitjançant la unió al receptor de laminina d'aquestes <sup>38,40</sup>.

- Proteïna A d'adhesió de superfícies (PsaA)

La PsaA és una lipoproteïna que es troba ancorada a la paret cel·lular. Afavoreix l'adherència del pneumococ a les cèl·lules endotelials i pulmonars <sup>3,32</sup>. La seva capacitat de captació i transport del Mn<sup>2+</sup> a l'interior del bacteri s'ha associat amb la resistència a l'estrès oxidatiu durant les infeccions <sup>41</sup>.

- Neuraminidasa A (NanA)

Les neuraminidases són un conjunt d'enzims situats a la càpsula, el més estudiat dels quals és la NanA. Interacciona amb l'àcid siàlic situat a la superfície de les cèl·lules de l'hoste i trenca les lipoproteïnes i oligosacàrids presents. Aquest fet aporta al pneumococ els nutrients necessaris per continuar proliferant, causa danys cel·lulars i desemmascara receptors de la cèl·lula de l'hoste amb els quals el pneumococ pot interaccionar i millorar la seva adherència, incrementant la interacció del pneumococ amb les cèl·lules epitelials de tracte respiratori i afavorint així la colonització i la seva progressió cap a formes invasives <sup>32,42</sup>.

- Proteasa IgA1

La proteasa IgA1 és una metaloproteasa que hidrolitza la immunoglobulina humana IgA1, que suposa aproximadament el 90% dels anticossos presents al tracte respiratori superior i inferior <sup>43</sup>. Evita que la IgA s'uneixi al pneumococ i l'ancori a la mucina del

mucus, impedit que quedi embolcallat i sigui eliminada per l'acció de les cèl·lules ciliades de l'epiteli, per la qual cosa es facilita l'adherència i posterior colonització de la nasofaringe <sup>2,44</sup>.

### 1.3. PATOGÈNIA

La patogènia que causa *S. pneumoniae* es basa en la seva capacitat de colonització, transmissió, disseminació i infecció dels teixits de l'hoste. Els factors de virulència permeten al pneumococ evadir la resposta immunitària del sistema complement i estimular i treure profit de la resposta inflamatòria.

#### 1.3.1. Definició de la malaltia pneumocòccica invasiva

La malaltia pneumocòccica invasiva ha estat definida per l'European Centre for Disease Prevention and Control com aquella que compleix un o més dels següents criteris <sup>45</sup>:

- Aïllament de *S. pneumoniae* d'un lloc normalment estèril.
- Detecció d'àcid nucleic de *S. pneumoniae* d'un lloc normalment estèril.
- Detecció de l'antigen de *S. pneumoniae* d'un lloc normalment estèril.

#### 1.3.2. Colonització i transmissió

*S. pneumoniae* està molt adaptat a l'hoste humà, que és el seu reservori. Pot colonitzar la nasofaringe gràcies a la seva capacitat d'adherir-se a les cèl·lules epitelials i de resistir l'eliminació mucosa. La colonització comença pràcticament després del naixement i durant el primer any de vida arriba al màxim. Entre el 60% i 100% dels nens menors d'un any han estat colonitzats per *S. pneumoniae* com a mínim una vegada. Passat aquest període, els nivells de colonització van disminuint progressivament fins a arribar a l'edat adulta, en què se situen al voltant del 10%. Durant els mesos immediatament posteriors al part, els nivells de colonització en les mares pot augmentar fins al 20-25%. La durada de l'estat de portador oscil·la entre una setmana i sis mesos i les recolonitzacions són més freqüents en menors de dos anys, en els que poden arribar fins al 85%, i disminueixen fins al 35% en els adults <sup>3,46-48</sup>.

La inflamació del tracte respiratori superior afavoreix la presència del pneumococ i el seu principal mecanisme de transmissió és el contacte directe amb les secrecions respiratòries d'una persona colonitzada <sup>49</sup>. L'alt percentatge d'infants colonitzats implica, doncs, la posterior disseminació de *S. pneumoniae* a la població adulta.

*S. pneumoniae* pot sobreviure fins a 4 setmanes en el medi ambient gràcies a la seva capacitat de produir biofilms a les superfícies contaminades. S'ha trobat a altes concentracions en cultius ambientals de les superfícies de centres sanitaris o en objectes d'ús comú com joguines utilitzades per nens colonitzats, essent aquesta una altra via de transmissió possible <sup>50</sup>. La capacitat de crear biofilms fa augmentar la capacitat de colonització del pneumococ, ja que li permet evadir la resposta del sistema complement i la fagocitosi <sup>51</sup>.

Després de la colonització, s'augmenta el nivell de limfòcits T CD4<sup>+</sup> específics de *S. pneumoniae* en sang i pulmons i també s'han detectat anticossos específics contra la NanA, la PspA i els polisacàrids capsulars. La colonització indueix la creació d'anticossos específics del serotip colonitzador, la qual cosa explicaria la relativa baixa incidència de malaltia causada per *S. pneumoniae* en comparació amb les altes freqüències de colonització <sup>1,3,52</sup>.

### 1.3.3. Disseminació i infecció

La condició de portador no només permet actuar a l'hoste com a reservori de *S. pneumoniae*, sinó que és un pas necessari per al desenvolupament de la infecció per pneumococ <sup>53</sup>. La malaltia pneumocòccica es produeix quan els pneumococs que estan colonitzant la nasofaringe envaeixen altres teixits com els sins paranasals o l'oïda. Per tal de desenvolupar la MPI, *S. pneumoniae* ha de travessar les barreres epitelials i/o endotelials, penetrar als teixits i, en última instància, arribar al torrent sanguini des d'on es podrà disseminar a qualsevol part del cos. En el cas de la meningitis, però, la bacterièmia no és un requisit indispensable, ja que es pot desenvolupar a partir d'altres focus infecciosos com una sinusitis o una mastoïditis. L'aspiració de *S. pneumoniae* des de la nasofaringe cap als pulmons també pot possibilitar el desenvolupament de malaltia pneumocòccica. Una de les principals característiques de les infeccions pneumocòcciques és la destrucció tissular que provoquen i que és deguda tant a factors de virulència del pneumococ (com la pneumolisina o la neuraminidasa), com a la mobilització i migració de cèl·lules inflamatòries cap al lloc de la infecció causada per *S. pneumoniae* <sup>2,54</sup>.

Un cop establerta la colonització, per evitar que es desenvolupi la infecció pneumocòccica, l'hoste compta amb un sistema de defensa que inclou mecanismes d'aclariment mucociliar (que eviten que el pneumococ abandoni la nasofaringe), d'acció del sistema complement, de generació d'anticossos específics contra *S. pneumoniae* (especialment contra els polisacàrids capsulars) i d'activitat dels fagòcits. La melsa és l'òrgan encarregat d'eliminar del torrent sanguini els bacteris no

opsonitzats. Qualsevol alteració en aquests mecanismes de defensa augmenta les possibilitats que *S. pneumoniae* es dissemini i causi infecció <sup>2,3</sup>.

Diversos factors de virulència de *S. pneumoniae* possibiliten que pugui desenvolupar el seu paper patògen. La migració de *S. pneumoniae* des de la nasofaringe cap a altres teixits de l'hoste requereix canvis en la seva expressió genètica per tal d'activar els gens que permeten al pneumococ evadir el sistema immunitari de l'hoste, adaptar-se a altres nínxols ambientals i sobreviure a la inflamació aguda que acompanya la invasió dels teixits <sup>54</sup>. Experiments *in vivo* en models animals han demostrat que quan *S. pneumoniae* envaeix el teixit pulmonar o la sang es produeix una regulació a l'alça de determinats gens que contribueixen a la seva patogènia i la seva virulència <sup>55</sup>.

El factor de virulència més determinant per a la patogenicitat *S. pneumoniae* és la seva càpsula. No tots els serotips capsulars tenen la mateixa habilitat per inhibir l'opsonofagocitosi i el grau d'èxit d'aquesta, en absència d'anticossos capsulars específics, està directament relacionat amb la capacitat invasiva de la soca. Quan es passa d'un estadi de colonització a un estadi d'infecció es pot produir una hipersecreció de la càpsula, de forma que el pneumococ pot passar de tenir una càpsula més fina (colònies més transparents) que facilita la unió a la nasofaringe i l'estadi de portador, a una càpsula més gruixuda (colònies més opaques) que actua com a mecanisme de protecció davant l'opsonofagocitosi <sup>56</sup>. Mitjançant l'estudi dels serotips capsulars dels pneumococs aïllats o detectats en pacients amb MPI i en portadors sans s'ha pogut diferenciar en funció de la capacitat invasiva de la càpsula entre serotips amb alt poder invasiu, aquells que s'associen majoritàriament a casos de MPI (serotips 1, 3, 4, 5, 7F, 8, 9N, 9V, 12F, 14, 18C, 19A i 22F) i serotips amb baix poder invasiu, aquells que s'associen majoritàriament a un estat de portador <sup>57-59</sup>. Les característiques de la càpsula del pneumococ també tenen influència en el desenllaç de la MPI: aquells serotips amb una càpsula més gruixuda com el 3, 6A, 6B, 9N i 19F estan associats a una major mortalitat <sup>60</sup>.

#### **1.4. MANIFESTACIONS CLÍNiques DE LA MALALTIA PNEUMOCÓCCICA INVASIVA**

*S. pneumoniae* és una de les principals causes de malaltia d'origen bacterià en població infantil i adulta. El seu espectre clínic inclou malalties localitzades no invasives com l'otitis mitja aguda, la sinusitis o la pneumònia no bacterièmica i malalties invasives com la meningitis, la pneumònia bacterièmica, la bacterièmia o altres formes invasives, que tot i ser menys freqüents que les formes no invasives, comporten una major morbiditat i mortalitat <sup>3,61,62</sup>.

### 1.4.1. Meningitis

La meningitis pneumocòccica és la presentació clínica més greu de la MPI. Pot debutar com a infecció primària, tot i que sovint té un focus d'infecció contigu o distant (otitis, mastoiditis, sinusitis, pneumònia, bacterièmia o endocarditis), o una comunicació entre l'espai subaracnoide i la nasofaringe (traumatisme cranioencefàlic, postquirúrgica com en els implants coclears, fístula del LCR o una pèrdua d'integritat de la duramàter); en aquestes circumstàncies solen presentar-se episodis recorrents mentre la comunicació perduri <sup>1-3</sup>.

La meningitis pneumocòccica sol tenir un inici brusc i una progressió ràpida. La simptomatologia és similar a la d'altres meningitis bacterianes i es caracteritza per mal de cap, febre, rigidesa a la nuca, estat mental alterat (que en nonats es pot manifestar en forma d'irritabilitat o letargia), vòmits, convulsions i disminució del nivell de consciència que pot evolucionar cap a un estat de coma <sup>8,63</sup>. El dany neurològic produït en una meningitis pneumocòccica és degut, principalment, a l'acció de la pneumolisina i l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produïts pel mateix pneumococ i per una reacció inflamatòria excessiva per l'acció de citocines, enzims proteolítics i oxidants que comporten una destrucció tissular i hipertensió intracranial <sup>64,65</sup>.

La letalitat dels casos de meningitis pneumocòccica se situa entre 16-37% en població adulta i 5-10% en població infantil. Les seqüeles neurològiques inclouen pèrdua d'audició, hidrocefàlia, i dèficits neurològics, motors i cognitius; es donen en 30-52% dels pacients adults supervivents i 30% aproximadament dels pacients pediàtrics <sup>8,65-67</sup>.

### 1.4.2. Pneumònia

La pneumònia bacterièmica és la presentació de MPI més freqüent en pacients adults i pediàtrics. Es caracteritza per un inici brusc i els símptomes més habituals són tos productiva amb esput purulent, calfreds, febre alta mantinguda i, en menor grau, astènia, sensació de falta d'aire i dispnea. La simptomatologia és més prominent en pacients pediàtrics. Contràriament, els pacients més grans presenten un quadre més inespecífic que pot retardar el seu diagnòstic. Degut al dolor el pacient pot presentar una disminució de la mobilitat respiratòria del costat afectat. Durant l'auscultació se senten crepitacions en la majoria dels casos. Les imatges radiològiques presenten un infiltrat lobular que sol afectar diferents segments d'un sol lòbul, tot i que en les pneumònies bacterièmiques la afectació multilobar és més freqüent <sup>2,3,68,69</sup>.

Les complicacions més habituals, en més del 50% dels casos, són el vessament pleural i l'empiema que pot arribar a requerir drenatge o fins i tot la realització d'una



toracoscòpia o d'una toracotomia oberta. L'aparició d'empiema està molt lligada al serotip causant de la pneumònia bacterièmica i s'associa, sobretot, als serotips 1, 3 i 19A<sup>69-71</sup>. En pacients adults el xoc sèptic es dona en el 10% dels casos i causa una elevada letalitat<sup>72</sup>.

Les pneumònies bacterièmiques s'associen a una major durada de l'estada hospitalària, a una major admissió a la unitat de cures intensives (UCI) i a una major demanda de ventilació mecànica que les pneumònies no bacterièmiques<sup>69,73</sup>. La letalitat en pacients adults se situa entre el 8 i el 30% i depèn de factors com l'edat, les malalties de base o el serotip causant. En menors de 5 anys la letalitat és inferior al 4%<sup>69,74,75</sup>.

### 1.4.3. Bacterièmia

La bacterièmia pneumocòccica es defineix com la presència de *S. pneumoniae* en sang. La bacterièmia pot estar associada a un focus infecció conegut i es dona entre el 25 i el 30% dels pacients amb pneumònia i en el 80% dels pacients amb meningitis. En els casos en què no hi ha un focus infecció conegut s'anomena bacterièmia sense focus. Es presenta sobretot en nens de fins a 3 anys d'edat i és la causa de MPI més freqüent en menors de 2 anys<sup>2,8,76</sup>. Està caracteritzada per un quadre de febre de curta durada i un estat general conservat. La majoria dels pacients són tractats de forma ambulatoria i les complicacions són poc freqüents. En els pacients que presenten una temperatura >39°C hi ha un risc d'entre l'1,5% i l'11% de desenvolupar una sèpsia. En pacients ingressats amb bacterièmia sense focus, un temps de positivació del cultiu de sang inferior a 12 h també és un marcador de gravetat i s'associa a un major risc de sèpsia i a una major letalitat<sup>76-79</sup>.

### 1.4.4. Altres formes invasives

El pneumococ pot estar implicat en una gran varietat de processos infecciosos invasius. Poden ser processos relativament poc freqüents com les infeccions osteoarticulars, la cel·lulitis o la peritonitis, o molt infreqüents com l'endocarditis o la pericarditis.

Les infeccions osteoarticulars suposen aproximadament el 3% de les MPI en menors de 18 anys i afecten principalment a nens petits sense malalties prèvies. La presentació més freqüent és l'artritis sèptica (entre el 50 i el 60% dels casos) seguida de l'osteomielitis, que pot aparèixer de forma concomitant a l'artritis sèptica quan hi ha afectació òssia (menys del 20% dels casos) o com un focus infecció propi (25%



casos). L'artritis sèptica acostuma a afectar a una sola articulació i produeix febre, dolor i impotència funcional de l'articulació afectada <sup>1,80</sup>.

La cel·lulitis es presenta en el 3% dels casos de MPI en menors de 18 anys, especialment en pacients menors de 2 anys. En quasi el 85% dels casos té una localització periorbital <sup>81</sup>.

La peritonitis pot ser primària, és a dir sense cap altra focus infeccions evident, o pot tenir el seu origen en una ascitis preexistent o en la introducció del pneumococ a través del tracte genital femení a causa d'una perforació intestinal. En la majoria de casos és necessària la cirurgia. En població infantil s'associen a pacients amb síndrome nefròtica <sup>82,83</sup>.

L'endocarditis pneumocòccica suposa menys del 0,5% de les MPI en adults i és encara més infreqüent en nens. A la població infantil acostuma a estar lligada a factors de risc com malalties coronàries, malformacions congènites o prematuritat. El curs de la malaltia és agut i destructiu, pot afectar el teixit de les vàlvules cardíaques, en especial a la vàlvula aòrtica, i pot ser necessari un recanvi valvular. Té una letalitat del 40% <sup>84,85</sup>.

La pericarditis és una forma de MPI molt poc freqüent. Pot ser un focus infeccions propi o derivar-se d'una endocarditis. El 70% dels pacients pediàtrics tenen menys de 5 anys i el 46% són menors d'un any. Sol debutar amb febre elevada i simptomatologia respiratòria seguida de pal·lidesa cutània, taquicàrdia i hepatomegàlia. Les imatges radiològiques presenten un augment de la mida del cor. Si no es diagnostica i es tracta ràpidament la letalitat pot arribar al 30% <sup>3,86</sup>.

## 1.5. DIAGNÒSTIC MICROBIOLÒGIC DE LA MALALTIA PNEUMOCÒCCICA INVASIVA

### 1.5.1. Identificació de *S. pneumoniae*

- Microscòpia

L'observació directa en mostres normalment estèrils de diplococs gram positius, en forma lanceolada i rodejats d'una càpsula pot ser un indicador d'infecció per *S. pneumoniae*. En mostres de LCR la sensibilitat de la tinció de gram se situa entre el 69-93% <sup>87</sup>. En cas de vessament pleural l'anàlisi per tinció de gram del líquid pleural també és una pràctica recomanada <sup>88</sup>. Tot i això, les soques més velles de pneumococ tendeixen a no tenyir-se correctament i poden semblar gram negatives. En cas que la mostra s'hagi recollit un cop ha començat la teràpia antibiòtica la morfologia del pneumococ pot estar alterada. La sensibilitat de la tècnica també depèn de l'expertesa

de l'observador. L'observació directa pot ser una bona eina per a establir una primera sospita de diagnòstic, però s'ha de confirmar amb proves que tinguin una major sensibilitat i especificitat <sup>89</sup>.

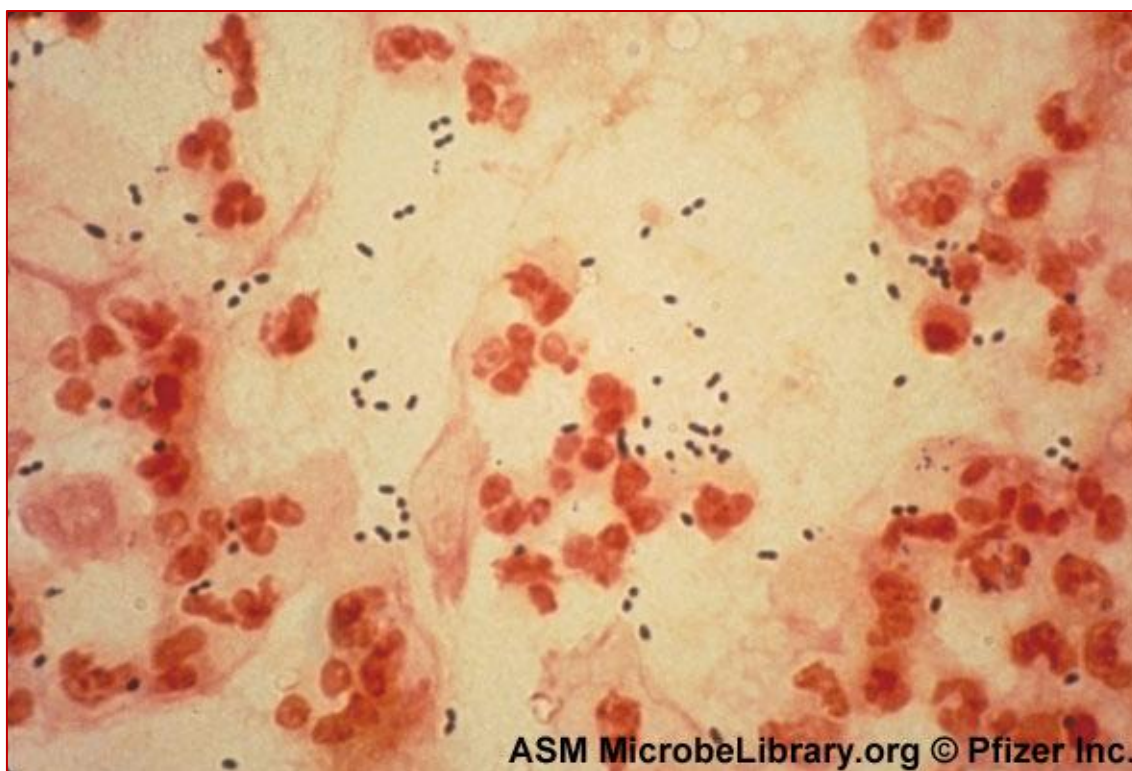


Figura 3: Tinció de gram de *S. pneumoniae* en LCR. Font: ASM MicrobeLibrary. Rebecca Buxton. 2007. Examination of gram stains of spinal fluid—bacterial meningitis.

- Detecció d'antigen

El test de detecció d'antigen més usat és el Binax NOW® *S. pneumoniae*. Aquest test detecta, mitjançant la tècnica d'immunocromatografia, el polisacàrid C que està present a la paret cel·lular de tots els pneumococs, si bé s'han descrit reaccions creuades amb *S. mitis* i *S. oralis* <sup>90</sup>. Inicialment es va desenvolupar per a ser usat en mostres d'orina i, posteriorment, es va aprovar el seu ús en LCR. Té una bona sensibilitat i especificitat en altres fluids corporals, fins i tot després d'haver-se iniciat la teràpia antibiòtica. En LCR ha mostrat una sensibilitat del 95-100% i una especificitat del 100% <sup>91,92</sup>. En líquid pleural de pacients pediàtrics amb pneumònia pneumocòccica ha mostrat una sensibilitat del 70% i una especificitat superior al 90% <sup>93,94</sup>. La detecció d'antigen ha mostrat un 100% de sensibilitat en brou de cultiu de sang i ha permès la detecció de *S. pneumoniae* fins i tot en aquells casos en què, després d'una alerta positiva del sistema automatitzat BactT/ALERT®, no ha crescut cap pneumococ a la resembra. El test de detecció d'antigen es pot fer servir tant com alternativa ràpida per donar un diagnòstic de presumpció en els casos de bacterièmia pneumocòccica, com

per millorar-ne el diagnòstic, especialment en els països amb menys recursos econòmics <sup>95-97</sup>.

Després del Binax NOW® s'han comercialitzat altres tests de detecció d'antigen com el Immunocatch® que, tot i que han mostrat una bona sensibilitat i especificitat en orina, encara no s'han estudiat en altres fluids corporals <sup>98</sup>.

- Cultiu

Històricament, el diagnòstic de la MPI s'ha basat en l'aïllament de *S. pneumoniae* d'una mostra normalment estèril i la seva posterior identificació en funció les característiques morfològiques de les colònies, la tinció de gram, la sensibilitat a l'optoquina i la solubilitat en bilis. La sensibilitat del cultiu disminueix per factors com el tipus mostra, la baixa concentració del microorganisme, el volum insuficient de la mostra (sobretot en pacients pediàtrics), l'autòlisi dels microorganismes o el tractament antibiòtic previ a la recollida de la mostra <sup>89,99,100</sup>.

La sensibilitat de l'hemocultiu està influenciada per la presència intermitent de *S. pneumoniae* en sang. En pacients amb pneumònia pneumocòccica la sensibilitat és del 20-30% en adults i inferior al 10% en nens <sup>99,101</sup>. En pacients amb meningitis pneumocòccica, en els que la bacterièmia és més freqüent, l'hemocultiu és positiu en un 50% dels casos <sup>89,90</sup>.

El cultiu el líquid pleural té una sensibilitat del 18-33%. El baix rendiment està influenciat per l'administració rutinària d'antibioteràpia parenteral prèvia als procediments quirúrgics toracoscòpics <sup>99,102</sup>.

El cultiu de LCR és l'estàndard de referència per al diagnòstic de la meningitis pneumocòccica <sup>100</sup>. Un cultiu positiu juntament amb la tinció de gram permeten la detecció de *S. pneumoniae* amb una sensibilitat del 84% i una especificitat del 98% <sup>89</sup>. El rendiment del cultiu de LCR és molt variable i s'han descrit sèries de casos amb el 87% de cultius positius i d'altres de només el 17,5% <sup>87,103</sup>. El tractament antibiòtic previ pot fer disminuir la sensibilitat del cultiu en LCR fins a un 18% i fins a un 29% en el cas que aquest s'hagi administrat durant més de 24 hores <sup>104</sup>.

Un dels principals inconvenients de la tècnica de cultiu és que els resultats triguen com a mínim 24-48 hores. Si bé els cultius són necessaris, ja que permeten fer estudi de la sensibilitat de la soca, poden ser poc útils per a la presa de decisions en els moments inicials atesa la gravetat d'algunes presentacions clíniques.

- Biologia molecular

La detecció de *S. pneumoniae* mitjançant la reacció de la cadena de la polimerasa a temps real o *real-time polymerase chain reaction* (real-time PCR) és una eina important per al diagnòstic de la MPI. És una tècnica quantitativa basada en l'amplificació selectiva i detecció de determinats fragments d'ADN també anomenats dianes moleculars. Posseeix certs avantatges sobre el cultiu: permet detectar mínimes quantitats d'ADN, no requereix microorganismes viables, la teràpia antibiòtica prèvia afecta menys a la seva sensibilitat i pot proporcionar resultats en poques hores. Per contra, la variabilitat genètica del pneumococ i les seves similituds amb altres microorganismes com *S. mitis* i *S. oralis* dificulten l'elecció de les dianes moleculars, la realització de la tècnica requereix laboratoris i personal especialitzat i, tot i que és possible detectar marcadors de resistència (com els gens *pbp2x/2b/1a* associats a la resistència a antibiòtics beta-lactàmics) no permet realitzar estudis de sensibilitat antibiòtica<sup>89,100,105</sup>.

El gen de l'autolisina *Lyt-A* és la diana molecular més utilitzada, ja que està molt conservat en tota l'espècie de *S. pneumoniae*. Amb un encebador adequat permet diferenciar-lo de la resta d'espècies genotípicament similars com *S. mitis*, *S. oralis* i *S. pseudopneumoniae*, amb una alta sensibilitat i especificitat. La real-time PCR *Lyt-A* és la tècnica més utilitzada i recomanada per l'OMS<sup>100,106-108</sup>. La combinació del gen *Lyt-A* amb les molècules diana *piaB* o SP2020 s'ha mostrat altament eficaç i atorga a la real-time PCR uns valors de sensibilitat i especificitat propers al 100%<sup>108,109</sup>.

En sang la capacitat de la real-time PCR per a la detecció de *S. pneumoniae* és molt superior a la del cultiu, sobretot en pacients pediàtrics. En mostres de plasma EDTA presenta una sensibilitat del 70% (i fins hi tot superior en nens) i una especificitat del 96%<sup>110,111</sup>. En líquid pleural ha mostrat una sensibilitat i especificitat del 100% i ha esdevingut mètode de diagnòstic essencial donat el baix rendiment dels cultius en aquesta mostra<sup>102,112</sup>. Al LCR té una sensibilitat del 92,3% i una sensibilitat del 100%<sup>113</sup>.

### 1.5.2. Identificació del serotip de *S. pneumoniae*

La identificació del serotip és un pas essencial per conèixer l'epidemiologia de la MPI, el disseny de futures vacunes i per poder avaluar la seva efectivitat.

- Reacció de Quellung

La reacció de Quellung és un test serològic basat en la interacció dels antígens capsulars amb anticossos específics. Aquesta interacció produeix una aglutinació i una

inflor (*quellung* en alemany) que pot ser observada al microscopi. Existeixen dues tècniques de microscòpia: la "humida", que requereix una ampliació de x100 i l'ús d'oli d'immersió, i la "seca", que requereix una ampliació de x40 i es realitza sense oli <sup>107</sup>.

Es considera l'estàndard de referència i la resta de tècniques de serotipat han de mostrar la seva concordança de resultats amb la reacció de Quellung per a ser validades. Tot i això, és un mètode laboriós i costós que requereix l'ús d'antisèrum específic per a cada serotip capsular així com personal expert per interpretar correctament els resultats.

Com a la resta de mètodes serològics, per poder realitzar una identificació positiva és necessari que una gran quantitat d'anticossos quedin units als antígens capsulars i per això l'ús d'aquesta tècnica només és possible si es disposa d'un cultiu pur.

- Aglutinació en làtex

És un test serològic en el qual els anticossos que interaccionen amb els antígens capsulars estan recoberts de partícules de làtex de forma que la reacció entre l'anticòs específic i els antígens de la càpsula produeix un agrupament visible anomenat aglutinació. És un test més ràpid, fàcil i econòmic que la reacció de Quellung i té una alta sensibilitat i especificitat. Sovint, però, s'ha de combinar amb la reacció de Quellung per identificar el serotip concret <sup>100,107</sup>.

- Dot Blot

És una prova d'hibridació que permet serotipar més d'una soca al mateix temps. És ràpida, econòmica i es pot realitzar fent servir una quantitat mínima de sèrum <sup>114</sup>.

- PCR

El tipat del pneumococ també es pot fer mitjançant l'estudi dels nucleòtids implicats en la biosíntesi de la càpsula. Cada serotip capsular té una combinació diferent de gens *cps* (capsular polysaccharide synthesis) l'anàlisi dels quals permet la seva identificació. Un dels principals avantatges de les tècniques basades en l'anàlisi de les seqüències dels nucleòtids és que poden ser tècniques qualitatives i quantitatives, tenen una gran sensibilitat i permeten la identificació de microorganismes no viables. Al llarg del temps s'han anat desenvolupant diferents mètodes (real-time PCR simples i múltiples, *múltiple PCR*) que han permès la detecció i diferenciació de cada cop més serotips d'una forma ràpida i fiable <sup>107,115-117</sup>.

### 1.5.3. Identificació clonal de *S. pneumoniae*

La metodologia més emprada per a la identificació clonal és la MLST (*multilocus sequence typing*). Permet mesurar variacions de seqüències d'ADN i classificar als pneumococs en ST en funció del seu perfil genètic. L'anàlisi dels STs del pneumococ es basa en fragments de 7 gens constitutius (*housekeeping genes*): *aroE*, *ddl*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi* i *xpt*.<sup>118</sup> Per assignar un ST es compara la seqüència de cada fragment amb una base de dades d'al·lels. A cada seqüència única se li assigna un identificador numèric i la combinació dels al·lels crea un perfil al·lèlic. Cada perfil al·lèlic esdevé un ST que identifica de forma inequívoca un clon<sup>22</sup>. Un CC està format per un grup de STs que comparteixen entre 6 i 7 al·lels amb almenys un altre ST del grup i que per tant es considera que tenen un antecessor comú<sup>21</sup>. L'assignació del CC és realitzada mitjançant el programa eBRUST<sup>119</sup>.

## 1.6. ESTUDI DE SENSIBILITAT ANTIBIÒTICA I TRACTAMENT ANTIMICROBIÀ

### 1.6.1. Estudi de sensibilitat antibiòtica

És necessari realitzar cultius per tal de poder obtenir la sensibilitat *in vitro* de la soca aïllada i racionalitzar el tractament.

L'estudi de sensibilitat es realitza mitjançant els mètodes quantitius de disc difusió o microdilució. Tal com recomanen el Comité Español del Antibiograma i la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica cal seguir la metodologia i els punts de tall establerts per l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)<sup>120-122</sup>. L'EUCAST estableix punts de tall diferenciats en funció de la forma clínica (meningitis i no meningitis) per a les benzilpenicil·lines i el meropenem.

L'any 2019 el Comitè Executiu de l'EUCAST va canviar les categories clíniques de "Sensible" "Intermedi" i "Resistent" per "Sensible, règim de dosificació estàndard", "Sensible, quan s'incrementa l'exposició" i "Resistent", respectivament. Aquestes noves categories responen a la necessitat d'incloure el concepte d'exposició (entesa com l'administració, la dosi, l'interval entre dosis, el temps d'infusió, la distribució, el metabolisme i l'excreció de l'antimicrobià) en la presa de decisions per a establir un tractament adequat. En el cas de *S. pneumoniae* aquest canvi ha afectat la categorització de la levofloxacina. Totes les soques aïllades amb un punt de tall  $\leq 2$  mg/L es consideren sensibles quan s'incrementa l'exposició<sup>123</sup>.



### 1.6.2. Tractament antimicrobià

Els antibiòtics  $\beta$ -lactàmics són el tractament de primera elecció per a les infeccions per *S. pneumoniae*. L'aparició i la disseminació de soques resistents, però, fan que els tractaments s'hagin d'adaptar a les recomanacions locals i al resultat de l'antibiograma. Al document de consens de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica i la Sociedad Española de Neumología Pediátrica <sup>124</sup> per al tractament antibiòtic de pneumònies en nens hospitalitzats es recomana l'ús d'ampicil·lina o penicil·lina G sòdica per via intravenosa en aquells casos sospitosos o amb etiologia pneumocòccica confirmada. Després de 24 h o 48 h sense febre, i si hi ha bona evolució clínica, es pot passar a amoxicil·lina oral. Es recomana una durada total del tractament d'entre 7 i 10 dies. En pacients amb pneumònia complicada per vessament pleural es recomana l'ús dels mateixos antibiòtics però a dosis més elevades (per assegurar que arriben en concentracions adequades a l'espai pleural) i amb una durada del tractament d'entre 2 i 4 setmanes. En els casos més greus està justificada l'administració d'una cefalosporina (cefuroxima o cefotaxima) juntament amb clindamicina o vancomicina en funció de les dades locals de sensibilitat.

En casos de meningitis pneumocòccica l'Asociación Española de Pediatría i la Sociedad Española de Infectología Pediátrica <sup>125</sup> recomanen com a antibiòtic d'elecció una cefalosporina de tercera generació (cefotaxima o ceftriaxona) per la seva bona penetració al LCR. En casos de sensibilitat disminuïda es recomana l'administració conjunta amb vancomicina sola o vancomicina i rifampicina. La durada del tractament recomanada és d'un mínim de catorze dies. L'ús d'imipenem en casos resistents a penicil·lina està desaconsellat per la seva tendència a produir convulsions.

Cal recordar que el mecanisme de resistència de *S. pneumoniae* als antibiòtics  $\beta$ -lactàmics no es basa en la producció de  $\beta$ -lactamases sinó en la modificació de les proteïnes d'unió a la penicil·lina <sup>126</sup> i que, per tant, l'addició d'inhibidors  $\beta$ -lactamases no aporta cap benefici clínic.

### 1.7. PREVENCIÓ DE LA MALALTIA PNEUMOCÒCCICA INVASIVA

L'elevada morbiditat i mortalitat de la malaltia per *S. pneumoniae*, incrementada per l'augment de les resistències antibiòtiques, fan de la prevenció la millor estratègia per al maneig de la MPI. Des de finals dels anys setanta les vacunes antipneumocòcciques polisacàrides han encapçalat els esforços per a reduir la incidència de la malaltia. Es tracta de vacunes inactivades que contenen els polisacàrids capsulars purificats dels serotips dels pneumococs que causen infeccions amb més freqüència. Quan els polisacàrids que contenen estan conjugats amb

proteïnes transportadores reben el nom de vacunes polisacàrides conjugades. Actualment hi ha disponibles tres vacunes antipneumocòcciques: la vacuna polisacàrida 23 valent i les vacunes polisacàrides conjugades 10 valent i 13 valent.

### 1.7.1. Vacuna polisacàrida

La vacuna polisacàrida 23 valent (VP23) es va autoritzar a Espanya l'abril de 2001 amb el nom comercial de Pneumovax 23®. La vacunació primària consta d'una sola dosi de 0,5 ml administrada per injecció intramuscular o subcutània. Degut un major risc de reaccions adverses no es recomana la revacunació fins passats entre 3 i 5 anys. Cada dosi de vacuna conté 25 µg de cada un dels 23 serotips de polisacàrids pneumocòccics següents: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F i 33F <sup>127</sup>.

La resposta immunològica de la VP23 és independent dels limfòcits T i no genera memòria ni és immunògena en menors de 2 anys. No proporciona immunitat a les mucoses i, per tant, no redueix la incidència d'infeccions localitzades al tracte respiratori superior com la sinusitis i l'otitis mitjana aguda (OMA), no elimina l'estat de portador i tampoc genera immunitat de grup <sup>8,128</sup>.

A Catalunya, la vacunació amb VP23 està indicada contra la malaltia causada pels serotips dels pneumococs inclosos a la vacuna i la seva administració està recomanada en infants de 24 a 59 mesos que pertanyin a algun grup de risc després de finalització de la immunització amb la VPC13, en majors de 5 anys que pertanyin a algun grup de risc després de l'administració d'una dosi de VPC13 i en persones de 65 anys i més <sup>129</sup>.

### 1.7.2. Vacunes conjugades

La primera vacuna antipneumocòccica conjugada autoritzada a Espanya l'any 2001 fou la VPC7 valent, que incloïa els polisacàrids conjugats dels serotips 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F i 23F. Actualment hi ha disponibles dues vacunes conjugades:

- VPC 10 valent, que va ser autoritzada a Espanya el maig de 2009 amb el nom comercial de Synflorix®. Inclou els polisacàrids conjugats dels serotips inclosos a la VPC7 més els dels serotips 1, 5 i 7F. Els polisacàrids dels serotips 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F i 23F estan conjugats amb la proteïna D (derivada de l'*Haemophilus influenzae* no tipable), el del serotip 18C amb toxina tetànica i el del serotip 19F amb toxina diftèrica com a proteïnes transportadores respectivament i absorbits en fosfat d'alumini com a adjuvant <sup>130</sup>.



- VPC 13 valent, que va ser autoritzada a Espanya el desembre de 2009 amb el nom comercial de Prevenar-13®. Inclou els polisacàrids conjugats dels serotips inclosos a la VPC7 valent més els dels serotips 1, 3, 5, 6A, 7F i 19A. Tots els polisacàrids dels serotips continguts a la vacuna estan conjugats amb la toxina diftèrica CRM197 com a proteïna transportadora i absorbits en fosfat d'alumini com a adjuvant <sup>131</sup>.

Les vacunes conjugades uneixen els polisacàrids capsulars a proteïnes transportadores per tal d'aconseguir una resposta depenent de limfòcits T. Aquesta resposta genera memòria, de manera que la revacunació posterior produeix un augment del títol d'anticossos tant si es fa servir la vacuna conjugada com la no conjugada. És immunògena a partir dels 2 mesos d'edat. Ha mostrat ser efectiva en la prevenció de formes no invasives d'infecció pneumocòccica, elimina l'estat de portador dels serotips continguts a la vacuna i, per tant, és capaç de generar immunitat de grup <sup>8,132-134</sup>.

Al juliol de 2016 la VPC13 va ser inclosa al calendari de vacunacions sistemàtiques de Catalunya. Està indicada per fer la immunització activa contra la MPI, la pneumònia i l'OMA causada per *S. pneumoniae* en els lactants, els nens i els adolescents i per a la prevenció de la MPI i la pneumonia causada per *S. pneumoniae* en els adults <sup>129</sup>.

Taula 1. Esquema de vacunació amb vacunes antipneumocòcciques

Grup edat	Grup de risc	Pauta (tipus de vacuna)	Tipus de vacunació	Edat / interval mínim d'administració
2 mesos	-	2+1 (VPC13)	sistemàtica	Als 2, 4 i 11 mesos d'edat
≤ 6 mesos	Risc de malaltia pneumocòccica greu o freqüent	3+1 (VPC13) + 1 (VP23)	selectiva	<b>VPC 13:</b> 1 mes entre les 3 primeres i 2 mesos entre la 3a i la 4a (en el segon any de vida). <b>VP23:</b> a partir dels 24 mesos d'edat i 8 setmanes des de la darrera dosi de VPC13.
7-11 mesos	Risc de malaltia pneumocòccica greu o freqüent	2+1 (VPC13) + 1 (VP23)	selectiva	<b>VPC 13:</b> 1 mes entre les 2 primeres i 2 mesos entre la 2a i la 3a (en el segon any de vida). <b>VP23:</b> a partir dels 24 mesos d'edat i 8 setmanes des de la darrera dosi de VPC13.
12-23 mesos	Risc de malaltia pneumocòccica greu o freqüent	1+1 (VPC13) + 1 (VP23)	selectiva	<b>VPC 13:</b> 2 mesos entre les 2 dosis. <b>VP23:</b> a partir dels 24 mesos d'edat i 8 setmanes des de la darrera dosi de VPC13.
24-59 mesos	Risc de malaltia pneumocòccica greu o freqüent	1 / 1+1* (VPC13) + 1 (VP23)	selectiva	<b>VPC 13:</b> 2 mesos entre les 2 dosis. <b>VP23:</b> 8 setmanes des de la darrera dosi de VPC13.
5-64 anys	Risc de malaltia pneumocòccica greu o freqüent	0 <sup>†</sup> /1 <sup>‡</sup> (VPC13) + 1 <sup>†</sup> /2 <sup>‡</sup> (VP23)	selectiva	<b>VP23:</b> 8 setmanes (recomanat 12 mesos) des de la darrera dosi de VPC13 i una 2a dosi almenys 5 anys després. <b>VPC13:</b> a partir dels 3-6 mesos després del transplament.
5-64 anys	Transplantament de progenitors hematopoètics	3 (VPC13) + 1 (VP23)	selectiva	<b>VP23:</b> entre 12 i 24 mesos després del transplament.
≥65 anys	-	1 (VP23)	sistemàtica	

\*Malalts d'alt risc (asplènia, drepanocitosi, fístula de LCR, implant coclear, immunodeficiències, fibrosi quística i síndrome de Down)

<sup>†</sup>Malaltia cardiovascular crònica, malaltia pulmonar crònica, malaltia neurològica crònica, diabetis mellitus, hepatopatia crònica, malaltia celíaca.

<sup>‡</sup>Immunodeprimits (excepte trasplantamet de progenitors hematopoètics), asplènia anatòmica o funcional.

Font: Elaboració pròpia a partir del Manual de Vacunacions de Catalunya 2020 de l'ASPCAT<sup>129</sup>.

### 1.7.3. Noves vacunes antipneumocòcciques

La limitació en la cobertura de serotips que proporcionen les vacunes a causa del fenomen de reemplaçament, la incidència encara elevada d'alguns serotips continguts a la VPC13, les diferències geogràfiques en la distribució dels serotips i el fenomen d'intercanvi capsular, afecten l'efectivitat de les actuals vacunes antipneumocòcciques i suposen un repte de futur a l'hora de desenvolupar-ne de noves.

Actualment hi ha dues noves vacunes conjugades en fase 3 de desenvolupament:

- Vacuna conjugada 15 valent: incorpora els serotips 22F i 33F respecte a la VPC13. Els estudis clínics mostren que és una vacuna segura i capaç d'induir concentracions d'IgG i activitat opsonofagocítica per als 15 serotips continguts a la vacuna tant en infants com en població adulta <sup>135-137</sup>.
- Vacuna conjugada 20 valent: incorpora els serotips 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F i 33F respecte a la VPC13. Els resultats en fase I en adults no vacunats de 18 a 49 anys van mostrar una bona tolerància i la capacitat de generar concentracions substancials d'IgG i activitat opsonofagocítica per als 20 serotips continguts a la vacuna <sup>138</sup>. En fase tres, els estudis s'han ampliat a població de fins a 64 anys amb bons resultats i la resposta de la vacuna ha superat els criteris de no inferioritat respecte a la VPC13 i la VP23, excepte per al serotip 8 <sup>139</sup>.

Tot i les noves VPC15 i VPC20, la capacitat d'afegir polisacàrids de més serotips en futures vacunes conjugades és tècnicament limitada i el producte final té un cost elevat que fa que aquestes vacunes siguin de difícil accés per als països més pobres. És necessari, doncs, poder desenvolupar vacunes assequibles, que generin resposta immunitària independentment del serotip, i que puguin prevenir la MPI i l'estat de portador per així generar immunitat de grup. Amb aquest objectiu s'estan desenvolupant dos tipus de noves vacunes antipneumocòcciques <sup>128,140-143</sup>.

- Vacunes proteiques: Les proteïnes associades a factors de virulència com la Ply, la PspC o la PspA tenen seqüències molt conservades presents a la majoria de pneumococs. Aquestes proteïnes poden generar una resposta immunològica depenent de limfòcits T i la seva producció és més econòmica que la de les VPC. La vacuna proteica basada en la PspA es troba actualment en fase 1. La basada en la Ply i una vacuna multiproteica que engloba la PspA, PsaA, PiuA i la Ply es troben en fase 2.

- Vacunes de bacteris sencers: Les vacunes de bacteris sencers tenen l'avantatge de poder expressar tots els antigens proteics sense necessitat de purificació i suposen una alternativa econòmica a les VPC. Poden proporcionar una protecció independent del serotip i generar resposta tant humoral com cel·lular contra múltiples antigens. En l'actualitat s'estan desenvolupant vacunes antipneumocòcciques tant amb soques de *S. pneumoniae* inactivades (basada en la soca RM200 i actualment en fase 2), com de soques vives atenuades (basada en la soca TIGR4).

## 1.8. EPIDEMIOLOGIA DE LA MALALTIA PNEUMOCÒCCICA INVASIVA

La MPI presenta un patró d'incidència bimodal i afecta majoritàriament a nens menors de 5 anys i adults de 65 anys i més. En tots els grups d'edat la incidència és major en homes que en dones. En els països de clima temperat la MPI mostra una fluctuació estacional i és més freqüent durant els mesos d'hivern. Es presenta majoritàriament en les formes clíniques de pneumònia, meningitis, bacterièmia sense focus o infecció osteoarticular <sup>3,8</sup>.

### 1.8.1. Epidemiologia de la colonització i la transmissió

Diversos factors afavoreixen la transmissió i colonització de *S. pneumoniae*. La infecció amb virus respiratoris facilita l'adherència del pneumococ a la nasofaringe, ja que molts d'ells també produeixen neuraminidasa, incrementant-se la secreció de mucus i la resposta inflamatòria, que compromet la integritat de l'epiteli. Així doncs, s'augmenta la susceptibilitat per adquirir *S. pneumoniae* i també la densitat de pneumococ excretat, que pot arribar a nivells que permetin la transmissió <sup>144,145</sup>. Un efecte similar, que també deriva en l'increment de l'excreció del bacteri, es produeix durant els primers anys de vida en els que la rinorrea sol ser molt abundant <sup>146</sup>. L'exposició al fum del tabac o als fums de la llar també són factors que afavoreixen la colonització. També l'afavoreixen altres factors socioeconòmics com l'assistència a escola, conviure amb germans o l'assistència a un centre de salut, ja que augmenten les possibilitats d'exposició a persones portadores, sobretot en nens i en les regions amb menys recursos econòmics <sup>147-150</sup>. Els percentatges de colonització més elevats es corresponen amb els països que tenen unes rendes més baixes <sup>46</sup>.

L'administració d'antibiòtics durant el mes anterior suposa un factor de risc per a la colonització amb soques de *S. pneumoniae* resistents tant a penicil·lina com a eritromicina <sup>150,151</sup>

La presència d'altres bacteris a la nasofaringe també pot influir en la colonització. Aquests bacteris interaccionen amb *S. pneumoniae* mitjançant relacions sinèrgiques que tenen com a conseqüència la colonització amb ambdós microorganismes com és el cas d'*H. influenzae*, o mitjançant relacions de competència com en el cas de *S. aureus*<sup>152</sup>.

### 1.8.2. Epidemiologia de la disseminació i la infecció

Diversos factors poden afavorir que una persona passi d'un estat de portador a patir una MPI.

Els mecanismes d'aclariment mucociliar i la integritat de l'epiteli es poden veure compromesos si hi ha inflamació, edema, obstrucció dels conductes, alteracions ciliars o augment de la producció del moc produïts per patologies de base com l'asma, les al·lèrgies o la malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC), per l'exposició al tabac o per una infecció prèvia de virus respiratoris<sup>153-155</sup>.

Les persones amb malalties de base, tant congènites com adquirides, que afecten el funcionament del sistema immunitari estan més exposades a patir una malaltia pneumocòccica després d'una colonització. Aquests dèficits també poden incrementar el risc de patir MPI recurrents i, en menors de 5 anys, s'associen a formes greus com meningitis o pneumònies complicades<sup>156,157</sup>. Aquelles persones amb asplènia congènita o les que han patit una esplenectomia, o les que la melsa no els funciona correctament tenen un major risc de patir una infecció per *S. pneumoniae* i un risc entre 5 i 15 vegades superior de patir una infecció pneumocòccica fulminant<sup>3,156</sup>.

Altres condicions de base com la diabetes mellitus, l'anèmia falciforme, l'alcoholisme crònic o la insuficiència hepàtica o renal també s'associen a un major risc de patir una infecció per *S. pneumoniae*<sup>2,3,158</sup>.

El Comité Asesor de Vacunas de la Asociación Española de Pediatría va elaborar la classificació les situacions de risc de malaltia pneumocòccica greu o freqüent en la infància i adolescència que es mostra a la taula 2<sup>159</sup>.

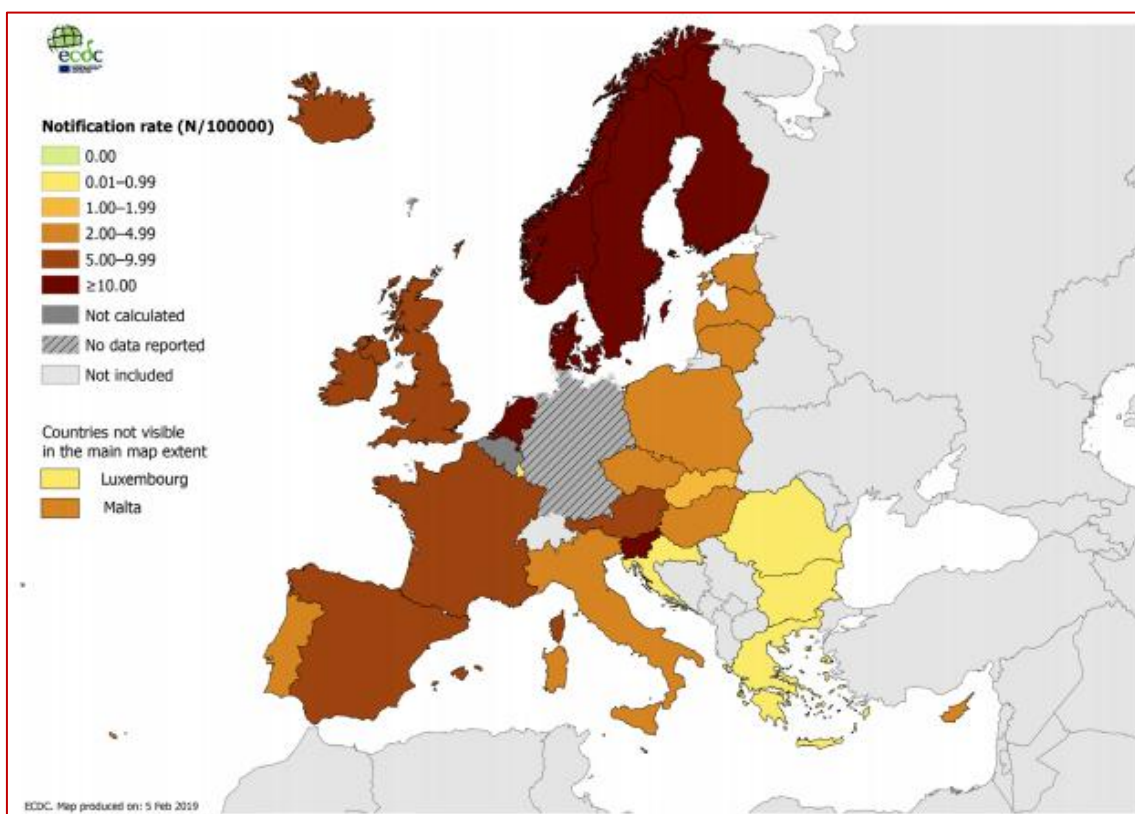
**Taula 2. Classificació les situacions de risc de malaltia pneumocòccica greu o freqüent en la infància i adolescència**

<b>Grup de risc</b>	<b>Malaltia o situació</b>
<b>Nens immunocompetents</b>	Malaltia cardíaca crònica (especialment cardiopaties congènites cianosants o que cursen amb insuficiència cardíaca).
	Malaltia pulmonar crònica (incloent-hi l'asma tractada amb dosis altes de corticoesteroides orals de forma perllongada).
	Diabetes mellitus
	Fístula de LCR
	Implant coclear
	Hepatopaties cròniques (en nens majors de 6 anys)
<b>Nens amb asplènia (anatòmica o funcional)</b>	Anèmia de cèl·lules falciformes i altres hemoglobinopaties.
	Asplènia congènita o adquirida, o disfunció esplènica
<b>Nens immunodeprimits</b>	Infecció pel virus de la immunodeficiència humana (VIH)
	Insuficiència renal crònica i síndrome nefròtica
	Malalties que requereixin tractament amb fàrmacs immunosupressors o radioteràpia (p. ex. neoplàsies malignes, leucèmia, limfoma i malaltia de Hodgkin o trasplantament de medul·la òssia o d'òrgan sòlid)
	Immunodeficiències congènites (incloent-hi dèficit de limfòcits B o T; deficiències del complement, especialment C1, C2, C3 o C4 i deficiències de la fagocitosi, excloent la malaltia granulomatosa crònica)

### 1.8.3. Evolució de la incidència de la MPI

L'any 2000 es varen estimar 14,5 milions de casos de MPI en nens menors de 5 anys que varen suposar 735.000 defuncions <sup>160</sup>. Posteriorment, quan ja s'havien introduït les VPC, l'any 2015 es varen estimar 3,7 milions d'episodis de MPI en aquesta mateixa

franja d'edat que varen suposar 294.000 defuncions <sup>161</sup>. Tot i aquest descens, les defuncions atribuïbles a *S. pneumoniae* en 2015 varen suposar l'11% de les defuncions en nens menors de 5 anys no infectats per VIH. Les taxes d'incidència i mortalitat són majors en els països en vies de desenvolupament i la majoria de morts es registren en les regions d'Àfrica i Àsia <sup>61</sup>. Al continent europeu, l'informe anual de MPI de 2017 <sup>162</sup> assenyalava una incidència a la UE/EEA de 6,2 casos per 100.000 habitants i a Espanya de 6,6 casos per 100.000 habitants. Incidències superiors a les que s'havia detectat el 2014 (4,8 per 100.000 habitants a UE/EEA i 5,0 a Espanya). A Catalunya la incidència de MPI l'any 2016 fou de 12,2 casos per 100.000 habitants, taxa que suposa una reducció del 9% respecte a la de 2012 (13,4 casos per 100.000 habitants)<sup>163</sup>.



**Figura 4. Distribució de casos confirmats de MPI per 100.000 habitants als països de la UE/EEA, 2017. Font: Invasive pneumococcal disease. ECDC. Annual epidemiological report for 2017.**

L'any 2017 la taxa de MPI en menors d'un any dels països de la UE/EEA fou de 14,5 casos per 100.000 habitants i va ser el segon grup d'edat amb una major taxa per darrere dels adults de 65 anys i més (18,9 casos per 100.000 habitants) <sup>162</sup>. A Espanya la incidència el 2016 fou de 15,4 casos per 100.000 habitants en menors d'un any i de 17,7 casos per 100.000 habitants en persones de 65 anys i més <sup>164</sup>. A Catalunya, l'any 2016, els menors de 2 anys van ser el grup d'edat amb una major taxa d'incidència

(38,2 casos per 100.000 habitants), seguit pel grup de 65 anys i més (32,5 casos per 100.000 habitants) i el grup de 2 a 4 anys (20,9 casos per 100.000 habitants)<sup>163</sup>.

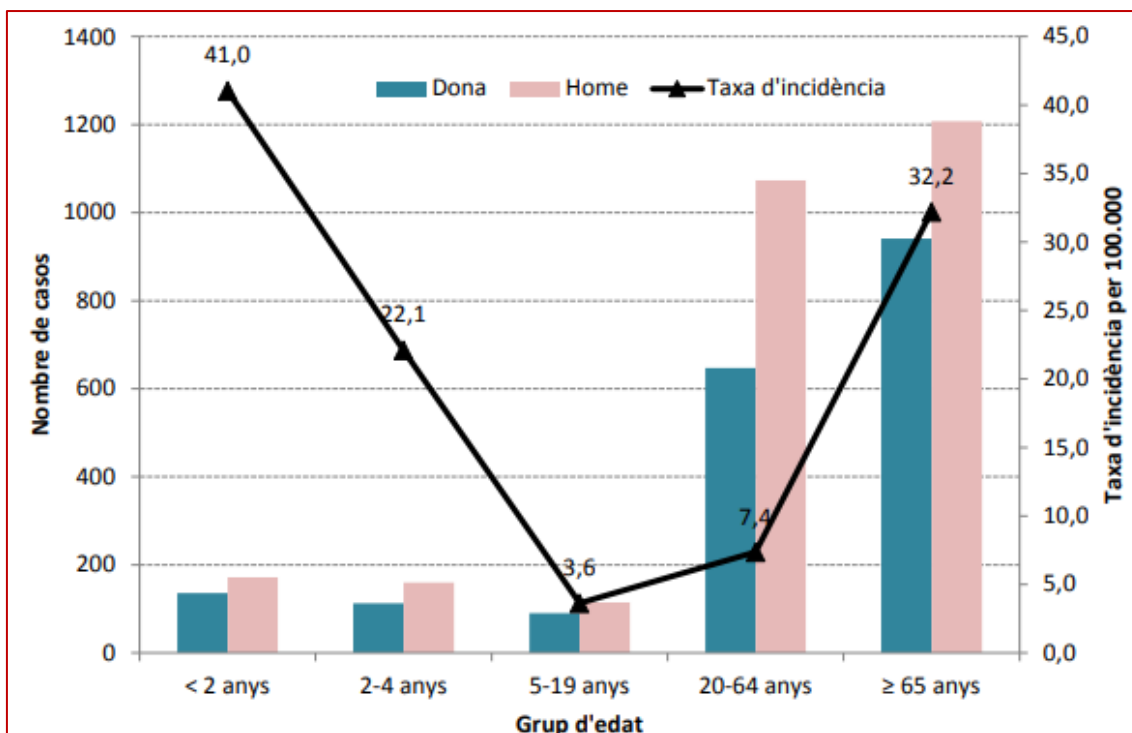


Figura 5: Incidència d'MPI segons el grup d'edat i sexe. Catalunya, 2012-2016. Font: Sistema de notificació microbiològica de Catalunya. Sub-direcció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública. Agència de Salut Pública de Catalunya.

#### 1.8.4. Evolució de la distribució dels serotips causants de MPI

Després de la introducció de la VPC7 es va produir un descens tant en el nombre de casos de MPI com en el nombre d'hospitalitzacions ocasionades pels serotips continguts en la vacuna<sup>165,166</sup>. Durant els anys posteriors, però, va haver-hi un augment en el nombre de casos de MPI produïts, principalment, pels serotips 1, 3 i 19A, no presents a la vacuna VPC7<sup>167,168</sup>.

Després de la introducció de la VPC10 i, especialment de la VPC13, s'ha observat una reducció dels casos de MPI associats als serotips continguts en les VPC. Paral·lelament a aquest descens, nombrosos estudis han observat un augment dels casos de MPI produïts per serotips no vacunals en totes les formes clíniques<sup>169,170</sup>. Els serotips no vacunals que més han incrementat la seva incidència des de la introducció de la VPC13 són el 8, el 12F, el 24F, el 9N, el 10A, el 22F, el 33F i el 35B en una proporció variable en funció del grup d'edat, la manifestació clínica, la zona geogràfica i les polítiques de vacunació. També s'ha observat una incidència encara elevada d'alguns serotips continguts a la VPC13 com l'1, el 3, el 14 i el 19A.<sup>171-174</sup>



A Anglaterra i Gal·les la VPC13 està inclosa al calendari vacunal des de l'abril de 2010 i té una cobertura de vacunació superior al 90%. Durant el període 2016-2017 els principals serotips causants de MPI en menors de 5 anys van ser el 12F (14,2%), el 8 (10,0%) i el 10A (8,2%). En el grup de 5 a 64 anys van ser el 8 (27,2%), el 12F (17,9%), i el 3 i el 9N (7,0% cada un). En el grup de 65 anys i més van ser el 8 (15,7%), el 3 (11,5%) i el 12F (9,3%)<sup>171</sup>.

A Catalunya la VPC13 es va incloure al calendari de vacunacions sistemàtiques el juliol de 2016. Durant el període 2014-2016 la cobertura de vacunació amb VPC 13 va ser del 63,6%. Els principals serotips causants de MPI en aquest període en menors de 5 anys van ser el 24F, el 14 i el 10A; en el grup de 5 a 17 anys van ser els serotips 1, 12F i 14; en el grup de 18 a 64 anys els serotips 8, 12F i 3 i en el grup de 65 anys i més els serotips 3, 14 i 12F<sup>175</sup>.

A Àustria i Finlàndia, països en els què es va administrar la VPC10, els serotips més prevalents en els menors de 5 anys van ser el 19A, el 7F i el 23F el 2013 a Àustria i el 19A, el 3 i el 23A el 2014 a Finlàndia<sup>176</sup>.

En població pediàtrica el serotip 3 s'ha associat a una presentació clínica de pneumònia complicada amb vessament pleural i/o empiema<sup>70,177</sup>. Aquest serotip, inclòs a la VPC13, no ha disminuït en la mateixa proporció que ho han fet la resta de serotips inclosos a la vacuna<sup>173</sup> i pot estar infranotificat, ja que majoritàriament només es detecta per la tècnica de PCR<sup>178</sup>.

En l'era postvacunal la proporció de portadors s'ha mantingut pràcticament igual<sup>179</sup>, si bé s'han observat diferències en la durada i freqüència de les colonitzacions en infants, que són significativament inferiors per a pneumococs continguts a la VPC13<sup>180</sup>. També s'ha observat un increment en els portadors de soques de *S. pneumoniae* no capsulat<sup>181</sup> que són resistents als macròlids i tenen la capacitat de crear biofilms, la qual cosa suposa un avantatge per a la colonització de la nasofaringe tal com s'ha vist també en els serotips emergents 22F i 33F<sup>172</sup>.

### **1.8.5. Evolució de la sensibilitat antibiòtica dels serotips causants de MPI.**

Fins al 1965 no es van descriure soques de pneumococ resistents a la penicil·lina. El seu mecanisme de resistència es basa en modificacions de les proteïnes d'unió a la penicil·lina (PBP), especialment en les *pbp1a*, *pbp2x* i *pbp2b*. Aquestes modificacions no només poden fer resistents els pneumococs a la penicil·lina sinó també a altres antibiòtics  $\beta$ -lactàmics com les cefalosporines de tercera generació (ceftriaxona i cefotaxima) i el meropenem. La sensibilitat disminuïda a les penicil·lines és un

marcador que s'associa a resistències a altres antibiòtics com els macròlids, les tetraciclines o les quinolones<sup>3,126,182</sup>. En entorns on hi ha una alta pressió antibiòtica se suprimeix la microbiota normal dels pacients, s'elimina la competència i en conseqüència es crea un nínxol per als microorganismes resistents. Aquest fet té dues conseqüències per al pneumococ. Per una banda, s'exerceix una selecció natural dels pneumococs amb resistències antibiòtiques i per l'altra, s'incrementa la prevalença d'altres microorganismes amb resistències que poden ser assimilades pels pneumococs mitjançant processos de transformació. En ambients on hi ha un contacte estret entre persones, com les llars d'infants o els centres socio-sanitaris es produeix una major disseminació d'aquestes soques resistents<sup>3,183</sup>.

Després de l'autorització de la VPC13 es va constatar una disminució de la proporció de resistències antibiòtiques en els serotips causants de MPI degut, principalment, a la reducció dels casos produïts pel serotip 19A, un serotip molt associat a soques resistents a la penicil·lina i multiresistents. Però la disminució del serotip 19A va estar relacionada amb l'increment d'altres serotips associats a resistències com els 15A, 15B/C, 23A, 23B o 35B<sup>182,184</sup>.

També s'han observat fenòmens de recombinació capsular que han derivat en la proliferació de soques no vacunals resistents a antibiòtics  $\beta$ -lactàmics. Aquest és el cas del clon 11A-ST6521, que està associat al clon 9V-ST156 resistent a la penicil·lina<sup>17,185</sup>, del clon multiresistent 8-ST63 derivat de la recombinació del clon multiresistent 15A-ST63 amb el clon 8-ST53<sup>186</sup> o del clon resistent a meropenem 15B/C-ST83, que té el seu origen en el clon 23F-ST81 també resistent al meropenem<sup>182</sup>. Aquest fenomen es produeix perquè els gens que expressen la càpsula polisacàrida estan situats al costat dels gens que expressen la *pbp1a* i la *pbp2*. El fragment d'ADN que es recombina pot incloure, a part dels gens capsulars, una part o la totalitat dels gens d'aquestes proteïnes.

Així doncs, la sensibilitat antibiòtica varia molt en funció de les regions i és el resultat de la combinació de diferents factors com el consum antibiòtic, l'ecologia de la malaltia i el creixement socioeconòmic<sup>187</sup>. La proporció de soques amb resistències antibiòtiques en els aïllaments clínics de *S. pneumoniae* a Espanya l'any 2018 va ser d'un 18,5% (IC 95%: 16 a 21) de soques no sensibles a la penicil·lina, un 18,0% (IC 95%: 16 a 20) de soques de resistents a macròlids i un 9,6% (IC 95%: 8 a 12) de soques no sensibles a la penicil·lina i resistents a macròlids segons l'European Antimicrobial Resistance Surveillance Network<sup>188</sup>.

### 1.8.6. Costos de la MPI

Els costos produïts per la MPI poden variar en funció de l'àmbit geogràfic. Cada regió té una política sanitària, un sistema de salut i una realitat socioeconòmica pròpia. Els serotips circulants i les resistències antibiòtiques poden variar entre regions i condicionar la forma clínica i l'evolució de la MPI. És imprescindible conèixer els costos de la MPI per tal de poder dissenyar polítiques més adequades, optimitzar els recursos sanitaris disponibles i avaluar l'impacte de les vacunes antipneumocòcciques. Song i col.<sup>189</sup> va estimar que el cost directe mitjà d'un cas de MPI en població adulta a Korea del Sud era de 7.452 US\$ (6.630 €). Calderón i col. van estimar el cost directe mitjà de la MPI en adults a Bogotà en funció de les principals manifestacions clíniques en 6.283 US\$ (5.592 €), 3.886 US\$ (3.459 €) i 4.768 US\$ (4.243 €) per a pneumònia, meningitis i bacterièmia, respectivament <sup>190</sup>. A Turquia, on la VPC7 i posteriorment la VPC13 estan incloses al calendari vacunal infantil, el cost directe mitjà es va estimar en 3.346,4 € per a la meningitis i 480,6 € per a la pneumònia invasiva <sup>191</sup>. En el nostre entorn Brotons i col. <sup>192</sup> el 2011 va estimar el cost directe mitjà de la pneumònia invasiva en 4.533 €.

Donat l'elevat cost de la MPI, la inclusió de les VPC al calendari vacunal s'ha mostrat cost-efectiva, especialment la VPC13 <sup>193-195</sup>. Tot i això, l'alt preu d'aquestes vacunes dificulta el seu ús als països amb baix poder adquisitiu <sup>196</sup>.

## **2. HIPÒTESI**



- La vacunació amb VPC13 redueix la incidència de la MPI causada pels serotips inclosos a la vacuna.
- La vacunació amb VPC13 produeix canvis en l'epidemiologia, la clínica i distribució de serotips causants de MPI.
- La presentació de MPI pot ser més freqüent en períodes d'activitat epidèmica de grip i el benefici de la vacunació amb VPC13 serà ser superior durant aquests períodes.



## **3. OBJECTIUS**





### **3.1. Objectiu general**

Estimar l'efecte de la vacunació amb vacuna VPC13 en l'epidemiologia de la MPI en menors de 18 anys en una població amb una cobertura vacunal intermèdia.

### **3.2. Objectius específics**

1. Avaluar l'efectivitat de la vacunació amb vacuna VPC13 enfront de la MPI causada pels diferents serotips inclosos a la vacuna en nens de 7 a 59 mesos.
2. Analitzar les característiques epidemiològiques clíniques i microbiològiques de les pneumònies complicades amb vessament pleural i/o empiema.
3. Analitzar les variacions en la incidència, presentació clínica, gravetat i serotips causants de la MPI, així com l'impacte de la VPC13 sobre la incidència de MPI durant els períodes epidèmics i no epidèmics de grip.
4. Analitzar les fallades vacunals de la VPC13 en la població de 2 a 59 mesos.
5. Analitzar els costos de la MPI durant el període 2007-2009 (anterior a la comercialització de VPC13) i el període 2012-2015 (posterior a la comercialització de VPC13) i identificar els principals factors que es poden associar a les variacions en els costos.



## **4. RESULTATS**



#### 4.1. ARTICLE 1:

##### **Autors**

Domínguez Á, Ciruela P, **Hernández S**, García-García JJ, Soldevila N, Izquierdo C, Moraga-Llop F, Díaz A, F de Sevilla M, González-Peris S, Campins M, Uriona S, Martínez-Osorio J, Solé-Ribalta A, Codina G, Esteva C, Planes AM, Muñoz-Almagro C, Salleras L.

##### **Títol**

Effectiveness of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in preventing invasive pneumococcal disease in children aged 7-59 months. A matched case-control study.

##### **Revista**

PLoS One

##### **Referència**

PLoS One. 2017;12(8):e0183191. doi:10.1371/journal.pone.0183191.

##### **Factor d'impacte**

2,766 (2017)

##### **Quartil**

Q1 (Medicine (miscellaneous))



RESEARCH ARTICLE

# Effectiveness of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in preventing invasive pneumococcal disease in children aged 7-59 months. A matched case-control study

Ángela Domínguez<sup>1,2\*</sup>, Pilar Ciruela<sup>2,3</sup>, Sergi Hernández<sup>3</sup>, Juan José García-García<sup>2,4,5</sup>, Núria Soldevila<sup>1,2</sup>, Conchita Izquierdo<sup>3</sup>, Fernando Moraga-Llop<sup>6</sup>, Alvaro Díaz<sup>7</sup>, Mariona F. de Sevilla<sup>2,4,5</sup>, Sebastià González-Peris<sup>6</sup>, Magda Campins<sup>6,8</sup>, Sonia Uriona<sup>6,8</sup>, Johanna Martínez-Osorio<sup>5</sup>, Anna Solé-Ribalta<sup>5</sup>, Gemma Codina<sup>6</sup>, Cristina Esteva<sup>2,4,5</sup>, Ana María Planes<sup>6</sup>, Carmen Muñoz-Almagro<sup>2,4,5,9</sup>, Luis Salleras<sup>1,2</sup>

**1** Departament de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **2** CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain, **3** Agència de Salut Pública de Catalunya, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain, **4** Malalties Prevenibles amb vacunes, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, Spain, **5** Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **6** Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain, **7** Hospital de Nens, Barcelona, Spain, **8** Grup de Recerca en Epidemiologia i Salut Pública, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Barcelona, Spain, **9** Departament de Medicina, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain

\* [angela.dominguez@ub.edu](mailto:angela.dominguez@ub.edu)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Domínguez Á, Ciruela P, Hernández S, García-García JJ, Soldevila N, Izquierdo C, et al. (2017) Effectiveness of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in preventing invasive pneumococcal disease in children aged 7-59 months. A matched case-control study. PLoS ONE 12(8): e0183191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183191>

**Editor:** Jose Melo-Cristino, Universidade de Lisboa Faculdade de Medicina, PORTUGAL

**Received:** May 2, 2017

**Accepted:** July 31, 2017

**Published:** August 14, 2017

**Copyright:** © 2017 Domínguez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** This work was supported by the Plan Nacional I+D+i, ISCIII – Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria (Projects PI 11/02081, PI 11/2345) and cofounded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and AGAUR (Grant 2014 SGR 1403).

## Abstract

### Background

The 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) was licensed based on the results of immunogenicity studies and correlates of protection derived from randomized clinical trials of the 7-valent conjugate pneumococcal vaccine. We assessed the vaccination effectiveness (VE) of the PCV13 in preventing invasive pneumococcal disease (IPD) in children aged 7–59 months in a population with suboptimal vaccination coverage of 55%.

### Methods

The study was carried out in children with IPD admitted to three hospitals in Barcelona (Spain) and controls matched by hospital, age, sex, date of hospitalization and underlying disease. Information on the vaccination status was obtained from written medical records. Conditional logistic regression was made to estimate the adjusted VE and 95% confidence intervals (CI).

### Results

169 cases and 645 controls were included. The overall VE of  $\geq 1$  doses of PCV13 in preventing IPD due to vaccine serotypes was 75.8% (95% CI, 54.1–87.2) and 90% (95% CI, 63.9–97.2) when  $\geq 2$  doses before 12 months, two doses on or after 12 months or one dose on or after 24 months, were administered. The VE of  $\geq 1$  doses was 89% (95% CI, 42.7–97.9)



**Competing interests:** JJGG reports personal fees from Pfizer. FMLL reports participation in expert meetings and symposiums organized by Pfizer and GSK. MC reports and participation as investigator in clinical trials from GSK and in expert meetings and symposiums organized by Pfizer and GSK. CMA reports grants from Pfizer laboratories, personal fees from GSK Laboratories, outside the submitted work. All other authors declare no competing interests. The above does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

against serotype 1 and 86.0% (95% CI, 51.2–99.7) against serotype 19A. Serotype 3 showed a non-statistically significant effectiveness (25.9%; 95% CI, -65.3 to 66.8).

## Conclusions

The effectiveness of  $\geq 1$  doses of PCV13 in preventing IPD caused by all PCV13 serotypes in children aged 7–59 months was good and, except for serotype 3, the effectiveness of  $\geq 1$  doses against the most frequent PCV13 serotypes causing IPD was high when considered individually.

## Introduction

*Streptococcus pneumoniae* continues to be a leading cause of morbidity and mortality in persons of all ages and the leading cause of bacterial childhood pneumonia and death in children worldwide. Pneumococcal infections include invasive pneumococcal diseases (IPD) such as meningitis, bacteremia and bacteremic pneumonia. In 2015, the estimated number of deaths due to pneumonia worldwide in children aged  $< 5$  years was 921,000, and the mortality rate was 6.59 per 1,000 live births [1].

There are currently 97 recognized *S. pneumoniae* serotypes [2], but their distribution varies with age and geographical region. The continued incidence and severity of pneumococcal disease, and the increasing prevalence of strains of pneumococci with reduced antimicrobial susceptibility underline the need for research into the prevention of pneumococcal infections.

Pneumococcal protein conjugate vaccines have been designed and developed to prevent invasive and non-invasive pneumococcal disease caused by *S. pneumoniae*. The first licensed vaccine, the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) contained polysaccharides of seven pneumococcal serotypes (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F and 23F), which were the most frequent IPD-causing serotypes at the end of the last century in the United States. In 2009–2010, two other conjugate vaccines were licensed to respond to emerging serotypes: 10-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV10) (containing serotypes 1, 5 and 7F in addition to the PCV7 serotypes) and PCV13 (containing serotypes 3, 6A and 19A in addition to the PCV10 serotypes) [3].

The PCV13 vaccine, unlike the PCV7 vaccine, was licensed based on the results of immunogenicity studies for the added serotypes and the correlates of protection derived from randomized clinical trials of the PCV7 vaccine [3, 4]. Therefore, continuing observational epidemiological studies (case-control and indirect cohort studies) are required to assess the protective value of the vaccine under normal, non-experimental administration.

The WHO recommends three primary doses or, alternatively, two primary doses plus a booster after considering locally-relevant factors including the epidemiology of pneumococcal disease, the likely coverage and the vaccine schedule of the vaccine doses [5].

Although the Vaccination Advisory Committee of the Spanish Association of Pediatrics has recommended the routine administration of conjugate pneumococcal vaccines (PCV7 since 2003–2010 and, currently, PCV13) these vaccines were not financed by the Catalan Public Health System until July 2016, except in children with selected risk factors, and were only available in the private sector. In Spain, the vaccine was not introduced into the recommended calendar until January 2017, and there are no estimates of vaccination coverage. In the Madrid region, PCV13 was introduced into the vaccination calendar in June 2010 but was later excluded from 2012 to 2015 for economic reasons. During the periods when the vaccine was included in the

calendar, the coverage in children aged <2 years was 95% and during the years it was not included, coverage ranged from 67% to 82% [6]. In Navarre, as in Catalonia, the vaccine was not included in the immunization calendar and the coverage was 76% in 2011–2014 in children aged <5 years [7]. In Catalonia, the coverage of PCV13 achieved in children aged <5 years in 2012–2013 was estimated as 55% [8] and the coverage of PCV10 in children aged <2 years was estimated as <4% [9].

Vaccination effectiveness (VE) against PCV13 serotypes requires field investigation because changes in the distribution of serotypes can influence the overall VE. In Catalonia, the overall incidence of IPD and the incidence in children aged <5 years decreased in 2010–2013 in relation to 2006–2009 but the distribution of most frequent serotypes changed [10]. Serotype 3, which had been very infrequent previously [11], has been the most frequent serotype in recent years [10,12] and several failures against IPD caused by this serotype in PCV13-vaccinated children has been observed [8].

The objective of the study was to evaluate the VE of PCV13 against IPD caused by the different serotypes included in the vaccine under usual condition of administration in children aged 7–59 months.

## Methods

### Data confidentiality and ethical aspects

No diagnostic tests were made or samples taken from any participant in addition to those required by routine care. The study complies with the principles of the Declaration of Helsinki and the legal structure in respect to international human rights and biomedicine and protection of personal data laws.

The Ethics Committee of Hospital Sant Joan de Déu approved the study. Informed consent signed by parents or legal guardians was given for all participants (cases and controls). All data were treated as confidential and records were accessed anonymously.

### Study design

A matched case-control study was carried out in patients with IPD admitted to three pediatric hospitals in Barcelona, Spain (Hospital de Nens, Hospital Sant Joan de Déu and Hospital Vall d'Hebrón). The estimated reference population aged <5 years of the three hospitals was 116,279, representing 30.4% of the whole population of this age group in Catalonia (382,507 children) [13]. Cases and controls were recruited between January 2012 and June 2016.

### Selection of cases

Patients aged 7–59 months hospitalized for IPD were studied. IPD was defined as isolation by culture of *S. pneumoniae* or DNA detection of the *Lyt A* gene and an additional capsular gene of *S. pneumoniae* by real-time polymerase chain reaction (PCR) in any normally-sterile site according to a previously reported method [14]. Strains isolated by culture were serotyped using the Quellung reaction or dot blot by the National Centre for Microbiology, Majadahonda, Madrid. Culture-negative and PCR-positive samples with a cycle threshold (Ct) >30 cycles were serotyped using a previously-described, real-time multiplex PCR technique [15]. PCR-positive samples with a Ct ≤30 cycles were serotyped using sequential multiplex PCR combined with fragment analysis and automated fluorescent capillary electrophoresis [16]. Children with IPD in whom serotyping of *S. pneumoniae* was not possible because the sample was not available were excluded.

## Selection of controls

Four controls were selected for each case from patients attending the same hospitals for causes other than IPD. Controls were matched by age ( $\pm 6$  months in patients aged  $< 12$  months and  $\pm 12$  months in patients aged 12–59 months), sex, date of hospitalization of the case ( $\pm 3$  months) and underlying medical conditions [17], when present. Study investigators were blinded to the vaccination status of all controls during selection.

## Vaccination status of cases and controls

A case or control was considered vaccinated if this was recorded in the medical record, the vaccination card or the child's health card. Cases and controls whose vaccination status could not be determined were excluded. Any dose of PCV13 given after six weeks of age, at least four weeks after the previous dose, and at least 15 days before the hospital admission date (cases) or before the hospitalization date of the matched case (controls) was considered valid.

To assess the VE against all PCV13 serotypes, the vaccination status included only doses of PCV13 and any child (case or control) who received PCV7, PCV10 or a mixture of either with PCV13 was excluded from the analysis. To assess the VE against PCV13-non-PCV7 serotypes, only doses of PCV13 were considered and any child who received only PCV7 or PCV10 was excluded from the analysis.

## Sociodemographic, clinical and epidemiological variables

The demographic and clinical variables recorded for each case were: age, sex, date of hospitalization, clinical form, underlying medical conditions, antibiotic therapy, history of respiratory infection in the 30 days before symptom onset and recurrent acute otitis media. Other epidemiological variables recorded were: birth weight, day care or school attendance, house size, number of cohabitants, siblings, parental smoking, parental education and influenza vaccination in the current season. The same variables were recorded for controls except for those relating to IPD. All variables were collected using a single questionnaire for cases and controls and there was an instruction manual to facilitate compliance.

## Sample size

The sample size required was calculated using Schlesselman's criteria [18]. Assuming a prevalence of a history of vaccination in controls of 47% [19], a VE of 80%, a bilateral  $\alpha$  error of 0.05 (two-tailed), and a  $\beta$  error of 0.2, and supposing that 25% of cases would be caused by vaccine serotypes (at present the figure is higher but vaccine serotypes are expected to decrease following the introduction of PCV13), that four controls would be sought per case, and that children aged 7–23 months and those aged 24–59 months would be analyzed separately, the minimum number of cases required was estimated at 160 and the number of controls as 642.

## Statistical analysis

Differences in demographic, clinical and epidemiological variables between cases and controls were analyzed using the McNemar test for categorical variables and the paired t-test for continuous variables. A two-tailed distribution was assumed for all p-values.

To estimate the adjusted VE a multivariate analysis was performed using conditional logistic regression. We introduced all demographic, clinical and epidemiological variables in the model and obtained a final model using backward stepwise selection with a cut-off point of  $p < 0.2$ . Interactions between vaccination and other variables were assessed using the likelihood ratio test in the conditional regression analysis. Independent variables were checked for collinearity

using the variance inflation factor [20].

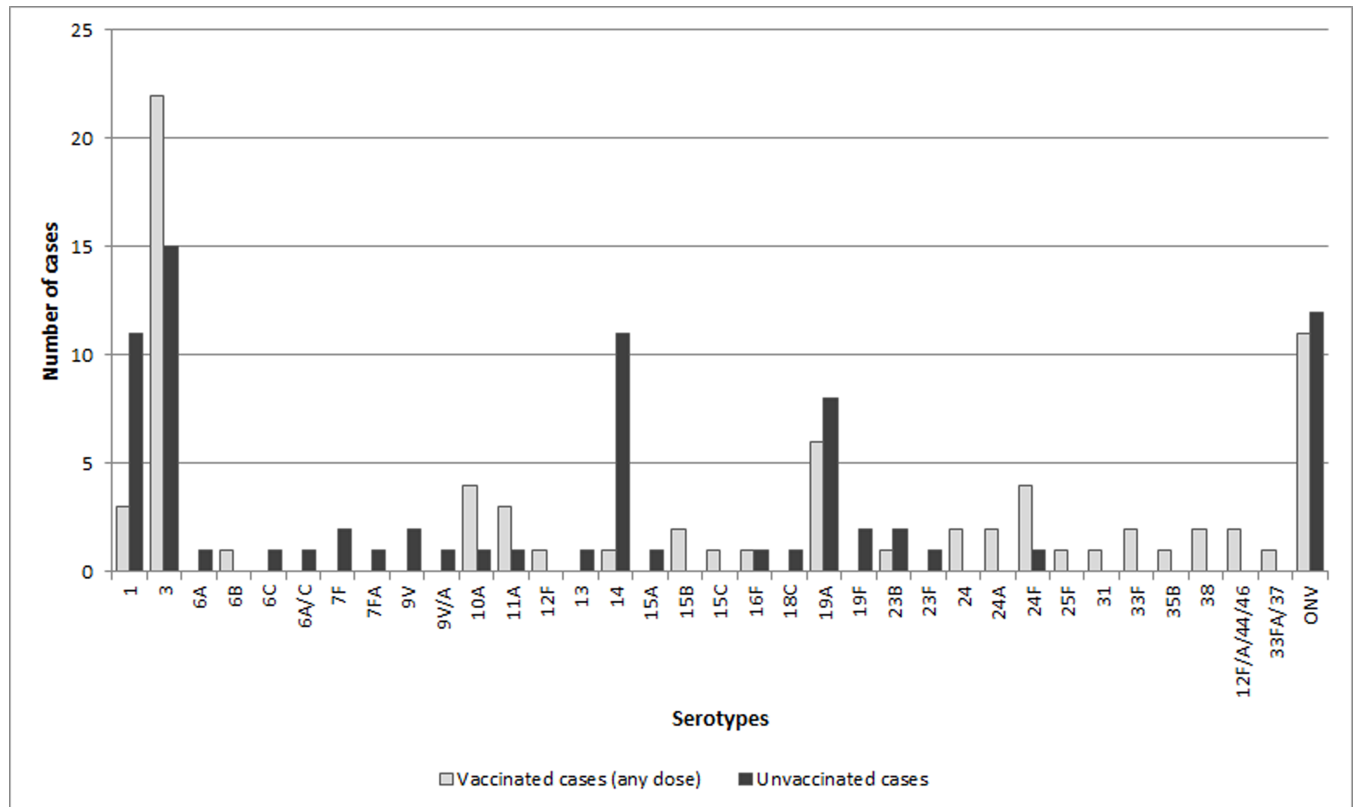
VE was calculated using the formula  $VE = (1 - OR) \times 100$ .

Analyses were performed for PCV13 serotypes, PCV13-non-PCV 7 serotypes, and individual serotypes according to the number of doses, schedule and age group. The analysis was performed using the SPSS v24 statistical package and R v3.3.0 statistical software.

## Results

During the study period, 180 cases of IPD were detected in patients aged 7–59 months, of whom 169 were included. The remaining cases were excluded because no controls meeting the study criteria were found (one case), or the sample for serotyping (seven cases) or the clinical record (three cases) were not available. A total of 239 samples from the 169 patients were studied. Of these, 31 samples were negative and 208 were positive for PCR and/or culture. Of the 144 blood samples analyzed, 43 were positive for culture alone, 49 for PCR alone and 23 for culture and PCR; of the 74 pleural fluid samples, 4 were positive for culture alone, 56 for PCR alone and 13 for culture and PCR; of the 12 cerebrospinal fluid samples, 3 were positive for culture alone, 4 for PCR alone and 4 for culture and PCR; all 4 synovial fluid samples, 1 epidural abscess sample and 1 otogenic abscess sample analyzed were positive for culture alone; 2 mastoid samples and 1 nasopharyngeal aspirate sample were positive for PCR alone. Cases with nasopharyngeal aspirate and otogenic abscess samples also had positive blood samples. Of the 169 cases, 83 (49.1%) were diagnosed by PCR alone, 43 (25.4%) by culture alone and 43 (25.4%) by culture and PCR. The most frequent serotypes in the cases included were serotype 3 (24.3%), serotype 1 (11.2%), serotype 19 A (9.5%) and serotype 14 (7.1%). The distribution of serotypes according to the receipt of any dose of PCV13 vaccine is shown in Fig 1. Serotype 3 was more frequent in the 24–59 months age group than in the 7–23 months age group (75.6% vs. 24.4%,  $p = 0.01$ ). The clinical manifestations of the cases were: complicated pneumonia including empyema, pleural effusion or necrotizing pneumonia (58.6% in all cases, 45.1% in children aged 7–23 months and 68.4% in children aged 24–59 months), uncomplicated pneumonia (15.4% in all cases, 14.1% in children aged 7–23 months and 16.3% in children aged 24–59 months), occult bacteremia (10.6% in all cases, 16.9% in children aged 7–23 months and 6.1% in children aged 24–59 months), and meningitis (6.5% in all cases, 9.9% in children aged 7–23 months and 4.1% in children aged 24–59 months). Other forms included mastoiditis (3.0%), bone and joint infection (3.0%), septic shock (2.3%) and cellulitis (0.6%).

We included 645 matched controls attending the same hospitals due to causes other than IPD. The demographic, epidemiologic and clinical characteristics of cases and controls are shown in Table 1. The proportion of cases and controls who had received  $\geq 1$  doses of PCV13 were 44.4% and 63.6%, respectively. The underlying medical conditions of cases and controls were: immunosuppressive therapy (4 cases and 9 controls), chronic renal failure (1 case and 3 controls), chronic lung disease (1 case and 3 controls) and chronic heart disease (2 cases and 2 controls). No interaction was found between vaccination and the other variables. Crude and adjusted estimations of VE for all PCV13 serotypes and all PCV13 serotypes, excluding serotype 3, according to age, number of doses and vaccination schedule is shown in Table 2. Table 3 summarizes the estimates of crude and adjusted VE for PCV13-non-PCV7 serotypes, including and excluding serotype 3, according to age, number of doses and vaccination schedule. The VE against individual serotypes 1, 3, 14 and 19A is shown in Table 4 (this could not be assessed for other serotypes due to the low number of cases).



**Fig 1. Distribution of serotypes of cases included in the study according to the receipt of any dose of PCV13 vaccine<sup>a</sup>.** ONV = Other non-PCV13 serotypes <sup>a</sup>Any child who received only PCV7 or PCV10 was excluded

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183191.g001>

## Discussion

This matched case-control study carried out in children aged 7–59 months admitted to three Catalonia pediatric hospitals has provided three main results. First, the overall VE of  $\geq 1$  doses of PCV13 in preventing IPD caused by vaccine serotypes is good (75.8%; 95% CI, 54.1–87.2) and increases when  $\geq 2$  doses before 12 months, two doses on or after 12 months or one dose on or after 24 months, are administered (90%; 95% CI, 63.9–97.2). In the 24–59 months age group, the latter schedule showed a non-significant effectiveness against IPD (83.5%; 95% CI, -19.5 to 97.7), probably because serotype 3 was more frequent in this age group. Secondly, the VE of  $\geq 1$  doses against two previously-emergent serotypes in our geographical area was high: 89% (95% CI, 42.7–97.9) for serotype 1 and 86.0% (95% CI, 51.2–99.7) for serotype 19A, but the VE of  $\geq 1$  doses against serotype 3 showed a non-significant effectiveness (25.9%; 95% CI, -65.3 to 66.8). Thirdly, the VE of  $\geq 1$  doses against serotype 14 was the highest found (96.9%; 95% CI, 70.4–99.7), which is important because this serotype is a very frequent cause of IPD in Catalonia [12].

Our results are similar to those obtained in observational studies carried out in other locations [7,21–27]. In case-control studies [7,21–26], the point estimate of VE against PCV13 serotypes ranges between the 77% (95% CI, 38–91) found by Miller et al. [21] in the United Kingdom in children aged 2.5–24 months who received one dose on or after 12 months or at least one dose before 12 months and one dose on or after 12 months and the 91% (95% CI, 61–99) found by Van Der Linden et al. [23] in children aged <2 years who had received the complete immunization schedule in Germany. In the study by Cohen et al. [26] in South Africa,

Table 1. Characteristics of cases and controls.

Characteristic	Cases	Controls	P value
	(N = 169)	(N = 645)	
<b>Age in months, median (range)</b>	27 (7–59)	29 (7–71)	0.04
<b>Age group</b>			0.20
7–23 months	71 (42.0%)	252 (39.1%)	
24–59 months	98 (58.0%)	393 (60.9%)	
<b>Sex</b>			1.00
Female	64 (37.9%)	248 (38.4%)	
Male	105 (62.1%)	397 (61.6%)	
<b>Underlying medical condition</b>			1.00
Yes	8 (4.7%)	17 (2.6%)	
No	161 (95.3%)	628 (97.4%)	
<b>Birth weight, median (range)</b>	3.2 (0.8–5.6)	3.2 (0.62–5.0)	0.08
<b>Breastfeeding</b>			0.21
Yes	140 (82.8%)	508 (78.8%)	
No	29 (17.2%)	137 (21.2%)	
<b>Day care or school attendance</b>			0.01
Yes	120 (71.0%)	411 (63.7%)	
No	49 (29.0%)	234 (36.3%)	
<b>Antibiotic treatment in previous month</b>			0.71
Yes	26 (15.4%)	104 (16.1%)	
No	143 (84.6%)	541 (83.9%)	
<b>Respiratory infection in previous month</b>			0.51
Yes	96 (56.8%)	354 (54.9%)	
No	73 (43.2%)	291 (45.1%)	
<b>Recurrent acute otitis media</b>			0.26
Yes	24 (14.2%)	116 (18.0%)	
No	145 (85.8%)	529 (82.0%)	
<b>House size (m<sup>2</sup>), median (range)</b>	80 (40–400)	85 (40–500)	0.01
<b>Cohabitants, median (range)</b>	4 (2–10)	4 (1–11)	0.62
<b>Siblings</b>			0.41
Yes	95 (56.2%)	386 (59.8%)	
No	74 (43.8%)	259 (40.2%)	
<b>Exposure to tobacco in the home</b>			0.34
Yes	55 (32.5%)	233 (36.1%)	
No	114 (67.5%)	412 (63.9%)	
<b>Head of the family working</b>			0.33
Yes	151 (89.3%)	593 (91.9%)	
No	18 (10.7%)	52 (8.1%)	
<b>Influenza vaccine in the current season</b>			0.20
Yes	3 (1.8%)	24 (3.7%)	
No	166 (98.2%)	621 (96.3%)	
<b>Educational level of parents<sup>a</sup></b>			0.27
No or primary	16 (10.1%)	50 (8.0%)	
Secondary or higher	143 (89.9%)	575 (92.0%)	
<b>≥1 dose of PCV13 (7–59 months)</b>			<0.01
7–23 months	38 (53.5%)	180 (71.4%)	<0.01

(Continued)

Table 1. (Continued)

Characteristic	Cases	Controls	P value
	(N = 169)	(N = 645)	
24–59 months	37 (37.8%)	230 (58.5%)	<0.01

PCV13 = 13-valent pneumococcal conjugate vaccine

<sup>a</sup>This information was not available for 10 cases and 20 controls

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183191.t001>

Table 2. Crude and adjusted effectiveness of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccination against IPD caused by PCV13 serotypes including and excluding serotype 3 in the prevention of invasive pneumococcal disease in children aged 7–59 months according to vaccination schedule, number of doses received and age.

Serotypes coverage, vaccination schedule and age groups	Cases Vaccinated/N (%)	Controls Vaccinated/N (%)	Crude VE (95% CI)	p value	Adjusted VE (95% CI)	p value
<b>All PCV13 serotypes<sup>a</sup></b>						
≥1 dose	29/85 (34.1%)	189/298 (63.4%)	69.4% (48.3–81.9)	<0.001	75.8% (54.1–87.2)	<0.001
7–23 months	10/31 (32.3%)	82/121 (67.8%)	75.1% (43.9–88.9)	0.001	80.7% (45.3–93.2)	0.002
24–59 months	19/54 (35.2%)	107/177 (60.5%)	64.4% (29.6–82.0)	0.003	75.3% (45.4–88.9)	0.001
≥2 doses before 12 months or 2 doses on or after 12 months or 1 dose on or after 24 months	13/69 (18.8%)	67/176 (38.1%)	65.9% (24.8–84.5)	0.01	90.0% (63.9–97.2)	<0.001
7–23 months	6/27 (22.2%)	51/90 (56.7%)	76.7% (36.6–91.4)	0.004	92.8% (55.4–98.8)	0.005
24–59 months	7/42 (16.7%)	16/86 (18.6%)	32.5% (-127.7–80.0)	0.53	83.5% (-19.5–97.7)	0.07 <sup>b</sup>
≥2 doses before 12 months and 1 dose after 12 months	15/71 (21.1%)	116/225 (51.6%)	70.3% (42.2–84.8)	<0.001	78.9% (52.8–90.5)	<0.001
7–23 months	3/24 (12.5%)	31/70 (44.3%)	79.4% (22.1–94.5)	0.02	91.2% (16.2–99.9)	0.03
24–59 months	12/47 (25.5%)	85/155 (54.8%)	65.9% (26.0–84.3)	0.01	73.4% (36.4–88.9)	0.003
<b>All PCV13 serotypes, excluding serotype 3<sup>a</sup></b>						
≥1 dose	9/50 (18.0%)	112/175 (64.0%)	87.7% (72.3–94.5)	<0.001	95.8% (84.0–98.9)	<0.001
7–23 months	6/22 (2.7%)	63/86 (73.3%)	83.5% (55.5–93.9)	<0.001	95.5% (54.5–99.5)	0.01
24–59 months	3/28 (10.7%)	49/89 (55.1%)	92.8% (67.4–98.4)	<0.001	97.1% (79.8–99.6)	<0.001
≥2 doses before 12 months or 2 doses on or after 12 months or 1 dose on or after 24 months	5/46 (10.9%)	46/109 (42.2%)	83.9% (48.8–95.0)	0.002	97.9% (75.3–99.8)	0.002
7–23 months	4/20 (20.0%)	38/61 (62.3%)	80.7% (35.2–94.2)	0.008	92.7% (35.3–99.2)	0.02
24–59 months	1/26 (3.8%)	8/48 (16.7%)	-	-	-	-
≥2 doses before 12 months and 1 dose after 12 months	3/44 (6.8%)	63/126 (50.0%)	91.8% (71.9–97.6)	<0.001	97.5% (83.9–99.6)	<0.001
7–23 months	1/17 (5.9%)	25/48 (52.1%)	93.4% (45.4–99.2)	0.01	96.9% (58.7–99.8)	0.01
24–59 months	2/27 (7.4%)	38/78 (48.7%)	90.7% (57.6–98.0)	0.002	95.1% (68.0–99.3)	0.002

CI = Confidence interval; IPD = Invasive pneumococcal disease; PCV13 = 13-valent pneumococcal conjugate vaccine; VE = vaccine effectiveness.

<sup>a</sup>Any child who received PCV7, PCV10 or a mix of either with PCV13 was excluded. <sup>b</sup>Statistical power: 88%

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183191.t002>



**Table 3. Crude and adjusted effectiveness of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccination against IPD caused by PCV13-non-PCV7 serotypes including and excluding serotype 3 in children aged 7–59 months according to vaccination schedule, number of doses received and age.**

Serotypes coverage, vaccination schedule and age groups	Cases Vaccinated/N (%)	Controls Vaccinated/N (%)	Crude VE (95% CI)	p value	Adjusted VE (95% CI)	p value
<b>PCV13-non-PCV7 serotypes<sup>a</sup></b>						
≥1 dose	31/70 (44.3%)	165/253 (65.2%)	56.9% (25.5–75.1)	0.003	64.2% (31.9–81.2)	0.002
7–23 months	9/22 (40.9%)	55/86 (63.9%)	59.0% (-4.3–83.9)	0.06	54.3% (-37.7–84.8)	0.16 <sup>b</sup>
24–59 months	22/48 (45.8%)	110/167 (65.9%)	55.8% (13.0–77.6)	0.02	66.9% (28.6–84.7)	0.005
≥2 doses before 12 months or 2 doses on or after 12 months or 1 dose on or after 24 months	13/52 (25.0%)	50/138 (36.2%)	46.8% (-21.9–76.7)	0.14	76.1% (26.3–92.2)	0.01
7–23 months	5/18 (27.8%)	34/65 (52.3%)	65.6% (-8.7–89.1)	0.07	89.8% (24.2–98.6)	0.03
24–59 months	8/34 (23.5%)	16/73 (21.9%)	13.3% (-175.2–72.7)	0.81	70.4% (-102.3–95.7)	0.21 <sup>c</sup>
≥2 doses before 12 months and 1 dose after 12 months	14/53 (26.4%)	93/181 (51.4%)	59.4% (16.6–80.3)	0.01	70.0% (30.1–87.1)	0.01
7–23 months	3/16 (18.8%)	21/52 (40.4%)	62.3% (-53.7–90.7)	0.17	58.7% (-126.9–92.5)	0.31 <sup>d</sup>
24–59 months	11/37 (29.7%)	72/129 (55.8%)	58.3% (3.5–82.0)	0.04	71.4% (25.6–89.0)	0.01
<b>PCV13-non-PCV7 serotypes, excluding serotype 3<sup>a</sup></b>						
≥1 dose	9/33 (27.3%)	74/113 (65.5%)	81.3% (53.8–92.5)	<0.001	95.7% (75.7–99.3)	<0.001
7–23 months	5/13 (38.5%)	36/51 (70.6%)	70.8% (3.2–91.2)	0.04	90.1% (34.8–98.5)	0.02
24–59 months	4/20 (20.0%)	38/62 (61.3%)	89.7% (51.9–97.8)	0.004	95.3% (64.0–99.4)	0.003
≥2 doses before 12 months or 2 doses on or after 12 months or 1 dose on or after 24 months	4/28 (14.3%)	28/67 (41.8%)	76.5% (6.6–94.1)	0.04	95.5% (38.4–99.7)	0.02
7–23 months	3/11 (27.3%)	21/36 (58.3%)	66.9% (-49.5–92.7)	0.15	95.0% (-0.1–99.8)	0.05 <sup>e</sup>
24–59 months	1/17 (5.9%)	7/31 (22.6%)	-	-	-	-
≥2 doses before 12 months and 1 dose after 12 months	2/26 (7.7%)	39/78 (50.0%)	90.5% (56.6–97.9)	0.002	97.9% (69.9–99.9)	0.005
7–23 months	1/9 (11.1%)	15/30 (50.0%)	87.0% (-19.6–98.6)	0.07	93.1% (2.3–99.5)	0.04
24–59 months	1/17 (5.9%)	24/48 (50.0%)	92.5% (38.3–99.1)	0.02	98.5% (58.4–99.9)	0.01

CI = Confidence interval; IPD = Invasive pneumococcal disease; PCV13 = 13-valent pneumococcal conjugate vaccine; PCV7 = 7-valent pneumococcal conjugate vaccine; VE = vaccine effectiveness.

<sup>a</sup>Any child who received only PCV7 or PCV10 was excluded.

Statistical power: <sup>b</sup> 71%

Statistical power: <sup>c</sup> 69%

Statistical power: <sup>d</sup> 52%

Statistical power: <sup>e</sup> 90%

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183191.t003>

the distribution of IPD-causing serotypes was very different from that found in Catalonia, because serotype 3 was not frequent and HIV infection is very frequent; however in non-HIV infected children, the VE for PCV13-non-PCV7 serotypes was 92% (95% CI, 40–99), very close to the 95.5% (95% CI, 38.4–99.7) obtained in our study when serotype 3 was excluded from the analysis.



**Table 4. Crude and adjusted effectiveness of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccination against IPD in children aged 7–59 months by specific serotype, vaccination schedule, and number of doses received.**

Serotypes coverage, vaccination schedule and age groups	Cases Vaccinated/ N (%)	Controls Vaccinated/N (%)	Crude VE (95% CI)	p value	Adjusted VE (95% CI)	p value
<b>Serotype 1<sup>a</sup></b>						
≥1 dose	3/14 (21.4%)	30/45 (66.7%)	88.4% (42.6–97.7)	0.01	89.0% (42.7–97.9)	0.01
≥2 doses before 12 months or 2 doses on or after 12 months or 1 dose on or after 24 months	0/11 (0.0%)	6/21 (28.6%)	-	-	-	-
≥2 doses before 12 months and 1 dose after 12 months	1/12 (8.3%)	19/34 (55.9%)	91.9% (31.1–99.0)	0.02	91.0% (12.2–99.1)	0.04
<b>Serotype 3<sup>a</sup></b>						
≥1 dose	22/37 (59.5%)	91/140 (65.0%)	19.6% (-68.8–61.7)	0.56	25.9% (-65.3–66.8)	0.46 <sup>c</sup>
≥2 doses before 12 months or 2 doses on or after 12 months or 1 dose on or after 24 months	9/24 (37.5%)	22/71 (31.0%)	4.4% (-179.6–67.3)	0.93	63.3% (-56.2–91.4)	0.17 <sup>d</sup>
≥2 doses before 12 months and 1 dose after 12 months	12/27 (44.4%)	54/103 (52.4%)	7.5% (-127.9–62.4)	0.87	12.8% (-127.9–66.6)	0.78 <sup>e</sup>
<b>Serotype 14<sup>b</sup></b>						
≥1 dose	1/12 (8.3%)	34/46 (73.9%)	95.7% (65.2–99.5)	0.003	96.9% (70.4–99.7)	0.003
≥2 doses before 12 months or 2 doses on or after 12 months or 1 dose on or after 24 months	0/11 (0.0%)	14/26 (53.8%)	-	-	-	-
≥2 doses before 12 months and 1 dose after 12 months	1/12 (8.3%)	20/32 (62.5%)	92.0% (31.1–99.1)	0.02	94.2% (41.8–99.4)	0.01
<b>Serotype 19A<sup>a</sup></b>						
≥1 dose	6/14 (42.9%)	35/50 (70.0%)	67.7% (-7.7–90.3)	0.07	86.0% (51.2–99.7)	0.01
≥2 doses before 12 months or 2 doses on or after 12 months or 1 dose on or after 24 months	4/12 (33.3%)	20/35 (57.1%)	68.9% (-38.1–93.0)	0.12	85.6% (6.7–99.8)	0.04
≥2 doses before 12 months and 1 dose after 12 months	1/9 (11.1%)	14/29 (48.3%)	83.3% (-62.3–98.3)	0.12	84.1% (-97.1–98.7)	0.15 <sup>f</sup>

CI = Confidence interval; IPD = Invasive pneumococcal disease; VE = vaccine effectiveness.

<sup>a</sup>Any child who received only PCV7 or PCV10 was excluded.

<sup>b</sup>Any child who received PCV7, PCV10 or a mix of either with PCV13 was excluded.

Statistical power: <sup>c</sup> 23%

Statistical power: <sup>d</sup> 67%

Statistical power: <sup>e</sup> 7%

Statistical power: <sup>f</sup> 64%

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183191.t004>

The VE of serotype 19A, the third most frequent serotype in our study, was 86.0% (95% CI, 51.2–99.7) for children receiving ≥1 doses of PCV13 and the results were similar for children receiving ≥2 doses before 12 months, two doses on or after 12 months or one dose on or after 24 months (85.6%; 95% CI, 6.7–99.8). The fact that the VE confidence intervals in children receiving ≥2 doses before 12 months and one dose after 12 months included zero might be explained by the low number of cases. In the study by Miller et al. [21] the VE against serotype 19 was 70% (95% CI, 10–90) and in the study by Van Der Linden et al. [23] it was 88% (95% CI, 25–99). In the study by Deceuninck et al. [22] the VE observed against serotype 19A was not statistically-significant (68%; 95% CI, -13 to 91). In the indirect cohort study by Andrews et al. [27] in England, Wales and Northern Ireland, the VE was 67% (95% CI, 33–84) for this serotype.

Studies carried out in Western European countries from 2010 to 2014 [28], in Germany during 1992 to 2014 [29], in the United States during 2004 to 2013 [30], in Portugal from 2012 to 2014 [31] and in England and Wales from 2008 to 2014 [32] have assessed the impact of PCV13 vaccination on the population and their results confirm those of case-control and indirect cohort studies [28–32]. In most countries that introduced the PCV13, large reductions in the incidence of IPD have been observed for all vaccine serotypes and for PCV13-non-PCV7 serotypes [28–32]. The reductions were even higher in the cases of serotype 19A in both children and adults aged >65 years, confirming herd immunity for this serotype [28–33]. Previous immunogenicity studies had forecast a high level of effectiveness against this serotype [27,34].

An important finding of our study is that the VE against all PCV13 serotypes and against PCV13-non-PCV7 serotypes increased for all vaccination schedules and age groups when serotype 3 cases were excluded from the analysis. Before the PCV13 was licensed, some authors had suggested that this serotype was less immunogenic than the other PCV13 serotypes [35]. In a Canadian study carried out after complete PCV13 vaccination in children, the level of opsonophagocytic antibodies was lower against serotype 3 than against other serotypes, suggesting the future level of protection would also be also low [36]. In a study carried out in Spain and Poland, the immune response against serotype 3 was also clearly lower than that obtained against other serotypes, particularly serotype 19A [37]. In a double-blinded trial comparing the efficacy of the PCV7 with that of PCV13 in preventing *S. pneumoniae* nasopharyngeal colonization, different levels of colonization were found in vaccinated and unvaccinated children for the serotypes studied, except for serotype 3 [38].

No VE of PCV13 was found for serotype 3 in two case-control studies [21,23] and one indirect cohort study [27]. Significant protection (79.5%; 95% CI, 30.3–93.1) by PCV13 against serotype 3 was observed only in the matched case-control study by Moore et al. [24], but this was lower than that found for serotypes 7F (96.5%; 95% CI, 82.7–100) and 19A (85.6%; 95% CI, 70.6–93.5). As in the present study, Andrews et al. [27] found that the VE of all serotypes was statistically significant except for serotype 3 (VE 26%, 95% CI, -69 to 68). According to these authors, the immune correlate of protection of this serotype (2.83 µg/mL, which was rarely attained with vaccination), was higher than the threshold of 0.35 µg/mL established for the PCV7 serotypes.

In most western European countries, IPD caused by serotype 3 has been stable or has increased after the introduction of the PCV13 [28,39]. In Canada and Japan, a similar trend has been observed [33,40]. Interestingly, the impact study by Moore et al. [30] found no reduction in the disease incidence caused by serotype 3 in the population, although the same authors had found that PCV13 was effective against serotype 3 in a case-control study [24]. The study by Waight et al. in the United Kingdom found some reduction in the incidence of IPD caused by serotype 3 in all age groups, but in children aged <5 years, the confidence intervals were very wide (68%; 95% CI, 0.6–89) [32].

In the present study, 44.4% (12/27) of children with IPD caused by serotype 3 had received  $\geq 2$  vaccine doses before 12 months and one dose after 12 months. These results are in accordance with those found in Greece [41], where a third of serotype 3 cases who presented pneumonia with pleural effusion were completely vaccinated.

This case-control study, like all observational studies, could be subject to selection and information biases: selection bias was minimized because controls were matched with cases by age, sex, risk medical conditions, hospital and date of case admission, and information bias was minimized because data were obtained in the same way in cases and controls. It seems unlikely that information bias may invalidate our results because information on the vaccination status was obtained from health records completed before study recruitment. In addition,

variables that could confound the results were introduced into the conditional regression analysis. However, some residual confounding cannot be ruled out.

A strength of the study was the diagnosis by PCR: nearly half the cases would not have been detected if only cultures had been used and, therefore, the cases included would not have been representative of hospitalized cases of IPD.

A limitation of the study is that the VE against clinical forms other than pneumonia or complicated pneumonia and against serotypes other than serotypes 1, 3, 14 and 19A could not be estimated due to the low number of cases.

In conclusion, we found that the effectiveness of  $\geq 1$  doses of PCV13 against IPD caused by PCV13 serotypes in children aged 7–59 months was good ( $\geq 75.8\%$ ) and that the effectiveness increased for all types of vaccination schedules and age groups when serotype 3 cases were excluded from the analysis. The VE of  $\geq 1$  dose for serotypes 1, 14 and 19A, the most frequent in our area after serotype 3, is high, ranging between 86% and 96.9%.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Ángela Domínguez, Pilar Ciruela, Juan José García-García, Fernando Moraga-Llop, Magda Campins, Carmen Muñoz-Almagro, Luis Salleras.

**Data curation:** Pilar Ciruela, Sergi Hernández, Núria Soldevila, Conchita Izquierdo.

**Formal analysis:** Ángela Domínguez, Núria Soldevila.

**Funding acquisition:** Ángela Domínguez, Pilar Ciruela, Juan José García-García.

**Investigation:** Ángela Domínguez, Pilar Ciruela, Sergi Hernández, Juan José García-García, Núria Soldevila, Conchita Izquierdo, Fernando Moraga-Llop, Alvaro Díaz, Mariona F. de Sevilla, Sebastià González-Peris, Magda Campins, Sonia Uriona, Johanna Martínez-Osorio, Anna Solé-Ribalta, Gemma Codina, Cristina Esteva, Ana María Planes, Carmen Muñoz-Almagro, Luis Salleras.

**Methodology:** Ángela Domínguez, Pilar Ciruela, Juan José García-García, Fernando Moraga-Llop, Magda Campins, Carmen Muñoz-Almagro, Luis Salleras.

**Project administration:** Ángela Domínguez, Pilar Ciruela, Juan José García-García, Fernando Moraga-Llop, Magda Campins, Carmen Muñoz-Almagro, Luis Salleras.

**Resources:** Conchita Izquierdo, Alvaro Díaz, Gemma Codina, Cristina Esteva, Ana María Planes, Carmen Muñoz-Almagro.

**Software:** Núria Soldevila.

**Supervision:** Ángela Domínguez, Pilar Ciruela, Juan José García-García, Fernando Moraga-Llop, Magda Campins, Carmen Muñoz-Almagro, Luis Salleras.

**Validation:** Ángela Domínguez, Pilar Ciruela, Sergi Hernández, Núria Soldevila, Mariona F. de Sevilla, Sebastià González-Peris, Magda Campins, Sonia Uriona, Johanna Martínez-Osorio, Anna Solé-Ribalta.

**Visualization:** Ángela Domínguez, Pilar Ciruela, Sergi Hernández, Juan José García-García, Núria Soldevila, Conchita Izquierdo, Fernando Moraga-Llop, Alvaro Díaz, Mariona F. de Sevilla, Sebastià González-Peris, Magda Campins, Sonia Uriona, Johanna Martínez-Osorio, Anna Solé-Ribalta, Gemma Codina, Cristina Esteva, Ana María Planes, Carmen Muñoz-Almagro, Luis Salleras.

**Writing – original draft:** Ángela Domínguez, Luis Salleras.

**Writing – review & editing:** Pilar Ciruela, Sergi Hernández, Juan José García-García, Núria Soldevila, Conchita Izquierdo, Fernando Moraga-Llop, Alvaro Díaz, Mariona F. de Sevilla, Sebastià González-Peris, Magda Campins, Sonia Uriona, Johanna Martínez-Osorio, Anna Solé-Ribalta, Gemma Codina, Cristina Esteva, Ana María Planes, Carmen Muñoz-Almagro.

## References

1. Liu L, Oza S, Hogan D, Chu Y, Perin J, Zhu J, et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–15: an updated systematic analysis with implications for the sustainable development goals. *Lancet*. 2016; 388: 3027–3035. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31593-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31593-8) PMID: 27839855
2. Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C, et al. Pneumococcal capsules and their types: past, present, and future. *Clin Microbiol Rev*. 2015; 28: 871–899. <https://doi.org/10.1128/CMR.00024-15> PMID: 26085553
3. Bryant KA, Block SL, Baker SA, Gruber WC, Scott DA. Safety and immunogenicity of a 13-valent-pneumococcal conjugated vaccine. *Pediatrics*. 2010; 125: 866–875. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-1405> PMID: 20435707
4. Feavers I, Knezavic I, Powell M, Griffiths E. Challenges in the evaluation and licensing of new pneumococcal vaccines, 7–8 July 2008, Ottawa, Canada. *Vaccine*. 2009; 27: 3681–3688. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.03.087> PMID: 19442421
5. World Health Organization. Pneumococcal vaccines WHO position paper— 2012 – recommendations. *Vaccine*. 2012; 30: 4717–4718. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.04.093> PMID: 22621828
6. Picazo J, Ruiz-Contreras J, Casado-Flores J, Negreira S, Baquero F, Hernández-Sampelayo T, et al. Effect of the different 13-valent pneumococcal conjugate vaccination uptakes on the invasive pneumococcal disease in children: analysis of a hospital-based and population-based surveillance study in Madrid, Spain, 2007–2015. *PLoS One* 2017; 12: e0172222.
7. Guevara M, Barricarte A, Torroba L, Herranz M, Gil-Setas A, Gil F, et al. Direct, indirect and total effects of 13-valent pneumococcal conjugate vaccination on invasive pneumococcal disease in children in Navarra, Spain, 2001 to 2014: cohort and case-control study. *Euro Surveill*. 2016; 21: pii = 30186.
8. Moraga-Llop F, García-García JJ, Díaz-Conradi A, Ciruela P, Martínez-Osorio J, González-Peris S, et al. Vaccine failures in patients properly vaccinated with 13-valent pneumococcal conjugated vaccine in Catalonia, a region with low vaccinations coverage. *Pediatr Infect Dis J*. 2016; 35: 460–463. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001041> PMID: 26658626
9. Savulescu C, Krizova P, Lepoutre A, Mereckiene J, Vestrheim DF, Ciruela P, et al. Effect of high-valency pneumococcal conjugate vaccines on invasive pneumococcal disease in children in SplDnet countries: an observational multicentre study. *Lancet Respir Med*. 2017; 5: 648–656. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30110-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30110-8) PMID: 28359798
10. Ciruela P, Izquierdo C, Muñoz-Almagro C, Broner S, Hernandez S, Selva L, et al. Changing epidemiology of invasive pneumococcal disease after vaccination with PCV13 in Catalonia (2006–2013). Oral presentation, 25th ECCMID, 2015. Available from: [https://www.escmid.org/escmid\\_publications/escmid\\_elibrary/?q=Changing+epidemiology+of+invasive+pneumococcal+disease+after+vaccination+with+PCV13+in+Catalonia&id=2173&L=0&x=0&y=0](https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/?q=Changing+epidemiology+of+invasive+pneumococcal+disease+after+vaccination+with+PCV13+in+Catalonia&id=2173&L=0&x=0&y=0)
11. Salleras L, Domínguez A, Ciruela P, Izquierdo C, Navas E, Torner N, et al. Changes in serotypes causing invasive pneumococcal disease (2005–2007 vs. 1997–1999) in children under 2 years of age in a population with intermediate coverage of the 7-valent pneumococcal conjugated vaccine. *Clin Microbiol Infect*. 2009; 15: 997–1001. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02938.x> PMID: 19689466
12. Ciruela P, Izquierdo C, Broner S, Hernández S, Muñoz-Almagro C, Pallarés R, et al. [Epidemiology of invasive pneumococcal disease in Catalonia. 2012–2014 report]. Agència de Salut Pública de Catalunya. 11 March 2016. Available from: [http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/home\\_canal\\_salut/professionals/temes\\_de\\_salut/vigilancia\\_epidemiologica/documents/arxius/malaltia\\_neumococcia\\_invasiva\\_informe\\_2012\\_2014.pdf](http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/home_canal_salut/professionals/temes_de_salut/vigilancia_epidemiologica/documents/arxius/malaltia_neumococcia_invasiva_informe_2012_2014.pdf) Cited 28 March 2017.
13. Registre del conjunt mínim bàsic de dades (CMBD) dels hospital d'aguts. Servei Català de la Salut. Available from: <http://catsalut.gencat.cat/ca/proveidors-professionals/registres-catalegs/registres/cmbd/informes-annuals/> Cited 28 March 2017.
14. Del Amo E, Selva L, de Sevilla MF, Ciruela P, Brotons P, Triviño M, et al. Estimation of the invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children by the use of direct capsular typing in clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015; 34: 705–711. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2280-y> PMID: 25413925

15. Tarragó D, Fenoll A, Sánchez-Tatay D, Arroyo LA, Muñoz-Almagro C, Esteva C, et al. Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14: 828–834. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02028.x> PMID: 18844683
16. Selva L, del Amo E, Brotons P, Muñoz-Almagro C. Rapid and easy identification of capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by use of fragment analysis by automated fluorescence-based capillary electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 3451–3457. <https://doi.org/10.1128/JCM.01368-12> PMID: 22875895
17. American Academy of Pediatrics. Pneumococcal infections. In: Kimberlin DW, Brady MT, Jackson MA, Long SS, eds. *Red Book: 2015 Report of the Committee on Infectious Diseases*. 30<sup>th</sup> ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics; 2015. pp. 626–638.
18. Schlesselman J. *Case-control studies: design, conduct, analysis*. New York, NY: Oxford University Press; 1982. pp. 144–170.
19. Domínguez A, Ciruela P, Garcia-Garcia JJ, Moraga F, F de Sevilla M, Selva L, et al. Effectiveness of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in the prevention of invasive pneumococcal disease in children aged 7–59 months. A matched case-control study. *Vaccine*. 2011; 29: 9020–9025. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.034> PMID: 21939724
20. Katz MH. *Multivariable Analysis. A practical guide for clinicians and public health researchers*. 3<sup>rd</sup> ed. New York, NY: Cambridge University Press; 2011. pp. 88–92.
21. Miller E, Andrews NJ, Waight PA, Slack MP, George RC. Effectiveness of the new serotypes in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Vaccine*. 2011; 29: 9127–9131. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.112> PMID: 21983361
22. Deceuninck G, de Serres G, Boulianne N, Lefebvre B, de Wals P. Effectiveness of three pneumococcal conjugate vaccines to prevent invasive pneumococcal disease in Quebec, Canada. *Vaccine*. 2015; 33: 2684–2689. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.04.005> PMID: 25887086
23. Van der Linden M, Falkenhorst G, Perniciaro S, Fitzner C, Imöhl M. Effectiveness of pneumococcal conjugate vaccines (PCV7 and PCV13) against invasive pneumococcal disease among children under two years of age in Germany. *PLoS One*. 2016; 11: e0161257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161257> PMID: 27526117
24. Moore MR, Link-Gelles R, Shaffner W, Lynfield R, Holtzman C, Harrison LH, et al. Effectiveness of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine for prevention of pneumococcal disease in children in the USA: a matched case-control study. *Lancet Resp Med*. 2016; 4: 399–406.
25. Su WJ, Lo HY, Chang CH, Chang LY, Chiu CH, Lee PI, et al. Effectiveness of pneumococcal conjugate vaccines of different valences against invasive pneumococcal disease among children in Taiwan: a nationwide study. *Pediatr Infect Dis J*. 2016; 35: e124–e133. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001054> PMID: 26974752
26. Cohen C, Von Mollendorf C, de Gouveia L, Lengana S, Meiring S, Quan V, et al. Effectiveness of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in South African children: a case-control study. *Lancet Glob Health*. 2017; 5: e359–e369. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30043-8](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30043-8) PMID: 28139443
27. Andrews NJ, Waight PA, Burbidge P, Pearce E, Roalfe L, Zancolli M, et al. Serotype-specific effectiveness and correlates of protection for the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine: a postlicensure indirect cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2014; 14: 839–846. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70822-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70822-9) PMID: 25042756
28. Tin Tin Htar M, Christopoulou D, Schmitt HJ. Pneumococcal serotype evolution in Western Europe. *BMC Infect Dis*. 2015; 15: 419. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1147-x> PMID: 26468008
29. Van der Linden M, Falkenhorst G, Perniciaro S, Imöhl M. Effects of infant pneumococcal conjugate vaccination on serotype distribution in invasive pneumococcal disease among children and adults in Germany. *PLoS One*. 2015; 10: e0131494. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131494> PMID: 26132078
30. Moore MR, Link-Gelles R, Schaffner W, Lynfield R, Lexau C, Bennett NM, et al. Effect of use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children on invasive pneumococcal disease in children and adults in the USA: analysis of multisite, population-based surveillance. *Lancet Infect Dis*. 2015; 15: 301–309. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)71081-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)71081-3) PMID: 25656600
31. Horácio AN, Silva-Costa C, Lopes JP, Ramirez M, Melo-Cristiano J. Serotype 3 remains the leading cause of invasive pneumococcal disease in adults in Portugal (2012–2014) despite continued reductions in other 13-valent conjugate vaccine serotypes. *Front Microbiol*. 2016; 7: 1616. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01616> PMID: 27790208
32. Waight PA, Andrews NJ, Ladhani SN, Sheppard CL, Slack MP, Miller E. Effect of the 13-valent pneumococcal vaccine on invasive pneumococcal disease in England and Wales 4 years after its

- introduction: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2015; 15: 535–543. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)70044-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70044-7) PMID: 25801458
33. Demczuk WH, Martin I, Griffith A, Lefebvre B, McGeer A, Lovgren M, et al. Serotype distribution of invasive *Streptococcus pneumoniae* in Canada after the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine, 2010–2012. *Can J Microbiol.* 2013; 59: 778–788. <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0614> PMID: 24313450
  34. Wijmenga–Monsuur AJ, van Westen E, Knol MJ, Jongerius RM, Zancolli M, Goldblatt D, et al. Direct comparison of immunogenicity induced by 10- or 13-valent pneumococcal conjugate vaccine around the 11-month booster in Dutch infants. *PLoS One.* 2015; 10: e0144739. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144739> PMID: 26658902
  35. Snape MD, Klinger CL, Daniels ED, John TM, Layton H, Rollinson L, et al. Immunogenicity and reactogenicity of a 13-valent-pneumococcal conjugate vaccine administered at 2, 4 and 12 months of age: a double-blind randomized active-controlled trial. *Pediatr Infect Dis J.* 2010; 29: e80–e90. PMID: 21155091
  36. Vanderkooi OG, Scheifele DW, Girgenti D, Halperin SA, Patterson SD, Gruber WC, et al. Safety and immunogenicity of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in healthy infants and toddlers given with routine pediatric vaccinations in Canada. *Pediatr Infect Dis J.* 2012; 31: 72–77. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318233049d> PMID: 21960186
  37. Martínón-Torres F, Wysocki J, Center KJ, Czajka H, Majda-Stanislawski E, Omeñaca F, et al. Circulating antibody 1 and 2 years after vaccination with the 13-valent pneumococcal conjugated vaccine in pre-term compared with term infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2017; 36: 326–332. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001428> PMID: 27902652
  38. Dagan R, Patterson S, Juergens C, Greenberg D, Givon-Lavi N, Porat N, et al. Comparative immunogenicity and efficacy of 13-valent and 7-valent pneumococcal conjugate vaccines in reducing nasopharyngeal colonization: a randomized double-blinded trial. *Clin Infect Dis.* 2013; 57: 952–962. <https://doi.org/10.1093/cid/cit428> PMID: 23804191
  39. Slotved HC, Dalby T, Harboe ZB, Valentiner-Branth P, Casadevante VF, Espenhain L, et al. The incidence of invasive pneumococcal serotype 3 disease in the Danish population is not reduced by PCV-13 vaccination. *Heliyon.* 2016; 2: e00198. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00198> PMID: 27957553
  40. Fukusumi M, Chang B, Tanabe Y, Oshima K, Maruyama T, Watanabe H, et al. Invasive pneumococcal disease among adults in Japan, April 2013 to March 2015: disease characteristics and serotype distribution. *BMC Infect Dis.* 2017; 17: 2.
  41. Antachopoulos C, Tsoia MN, Tzanakaki G, Xirogianni A, Dedousi O, Markou G, et al. Parapneumonic pleural effusions caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 in children immunized with 13-valent conjugated pneumococcal vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2014; 33: 81–83. <https://doi.org/10.1097/INF.000000000000041> PMID: 24172850





## 4.2. ARTICLE 2:

### Autors

Díaz-Conradi A, **Hernández S**, García-García JJ, Muñoz-Almagro C, Moraga-Llop F, Ciruela P, Izquierdo C, Campins M, de Sevilla MF, González-Peris S, Uriona S, Martínez-Osorio J, Solé-Ribalta A, Codina G, Esteva C, Planes AM, Soldevila N, Salleras L, Domínguez Á.

### Títol

Complicated pneumococcal pneumonia with pleural effusion or empyema in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine era.

### Revista

Pediatric Pulmonology

### Referència

Pediatr Pulmonol. 2019;54(5):517-524. doi:10.1002/ppul.24279

### Factor d'impacte

2,534 (2019)

### Quartil

Q1 (Pediatrics, Perinatology and Child Health)





# Complicated pneumococcal pneumonia with pleural effusion or empyema in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine era

Alvaro Díaz-Conradi MD, PhD<sup>1</sup>  | Sergi Hernández MSc<sup>2</sup> |  
Juan José García-García MD, PhD<sup>3,4,5</sup> | Carmen Muñoz-Almagro MD, PhD<sup>3,4,5,6</sup> |  
Fernando Moraga-Llop MD<sup>7</sup> | Pilar Ciruela MD, PhD<sup>2,3</sup> | Conchita Izquierdo MD, PhD<sup>2</sup> |  
Magda Campins MD, PhD<sup>7,8</sup> | Mariona F. de Sevilla MD, PhD<sup>3,4,5</sup> |  
Sebastià González-Peris MD<sup>7</sup> | Sonia Uriona MD<sup>7,8</sup> | Johanna Martínez-Osorio MD<sup>5</sup> |  
Anna Solé-Ribalta MD<sup>5</sup> | Gemma Codina MD, PhD<sup>7</sup> | Cristina Esteva MD, PhD<sup>3,4,5</sup> |  
Ana María Planes MD, PhD<sup>7</sup> | Nuria Soldevila BSc<sup>3,9</sup> | Luis Salleras MD, PhD<sup>3,9</sup> |  
Angela Domínguez MD, PhD<sup>3,9</sup>

<sup>1</sup> Hospital de Nens de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Agència de Salut Pública de Catalunya, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain

<sup>3</sup> CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain

<sup>4</sup> Malalties Prevenibles amb vacunes, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Esplugues, Barcelona, Spain

<sup>5</sup> Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>6</sup> Departament de Medicina, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain

<sup>7</sup> Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

<sup>8</sup> Grup de Recerca en Epidemiologia i Salut Pública, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Barcelona, Spain

<sup>9</sup> Departament de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

## Correspondence

Alvaro Díaz-Conradi, MD, PhD, Department of Paediatrics, Fundació Hospital de Nens de Barcelona, C/Consell de cent 437, 08009 Barcelona, Spain.  
Email: adiaz@hospitaldenens.com

## Funding information

Plan Nacional I+D+I, ISCIII-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria, Grant numbers: P1 11/02081, PI 11/2345; Fondo Europeo de

## Abstract

**Aim:** The aim was to analyze the epidemiological, microbiological and clinical characteristics of patients with complicated pneumococcal pneumonia with pleural effusion (PE) or empyema.

**Method:** Prospective study in three Catalan hospitals in persons aged <18 years diagnosed with complicated pneumonia with PE or empyema with isolation of *Streptococcus pneumoniae* in blood or pleural fluid by culture or real-time PCR between January 2012 and June 2016. Patients were divided into <2 years and 2-17 years age groups. Epidemiological, microbiological, and clinical data of patients were compared annually in both groups. PCV13 vaccination coverage increased from 48.2% in 2012 to 74.5% in 2015.

**Results:** We included 143 patients. The incidence of pneumococcal pneumonia was 6.83 cases  $\times 10^{-5}$  persons/year in cases with PE or empyema and 2.09 cases  $\times 10^{-5}$  person-years in cases without (rate ratio [RR]: 3.27; 2.25-4.86;  $P < 0.001$ ). Empyema was more frequent than PE (79.7% vs 20.3%,  $P < 0.005$ ). Of 143 cases studied, 93 (65.0%,  $P < 0.001$ ) were diagnosed by real-time-PCR, 43 (30.1%) by culture and RT-PCR and 7 (4.9%) by culture only. PCV13 serotypes were more frequent in complicated than in uncomplicated pneumonia (116/142, 81.7% vs 27/45, 60.0%;  $P = 0.003$ ), especially serotype 1 (41/142, 28.9% vs 6/45, 13.3%,  $P = 0.036$ ). From 2012 to 2015 there was a significant reduction in serotype 1 (16/43, 37.2% vs 3/27, 11.1%,  $P = 0.026$ ), and a trend to an increase in non-PCV13 serotypes (6/43, 14% vs 9/27, 33.3%,  $P = 0.054$ ).

**Conclusions:** A directly proportional relationship was observed between the reduction in pneumonia complicated with PE or empyema and a significant

Desarrollo Regional (FEDER) and AGAUR,  
Grant number: Grant 2017 SGR 1342

reduction in PCV13 serotypes, especially serotype 1, coinciding with increased PCV13 coverage.

#### KEYWORDS

empyema, PCV13, pleural effusion, pneumonia, *Streptococcus pneumoniae*

## 1 | INTRODUCTION

*Streptococcus pneumoniae* is the most common cause of community-acquired pneumonia of bacterial etiology in children aged <5 years, excluding neonates, worldwide and is frequently associated with pleural effusion (PE) or empyema.<sup>1-3</sup> After the introduction of the 7-valent conjugate vaccine in Spain in 2001, there was a replacement in the prevalent serotypes, with serotypes 1, 3, and 19A emerging as the most frequent cause of empyema.<sup>4</sup> Specifically, serotype 1, ST306 became the most prevalent strain in cases of empyema of pneumococcal etiology.<sup>5</sup> After the introduction of the 13-valent vaccine, which added six serotypes (1, 3, 5, 7F, 6A, and 19A) to the PCV7 (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, and 23F), to the systematic vaccination schedule of the community of Madrid (Spain) in 2010, a decrease in vaccine serotypes was observed,<sup>6</sup> as in other parts of the world.<sup>2,3,7</sup>

The aim of this study was to analyze the epidemiological, microbiological and clinical characteristics of patients with complicated pneumococcal pneumonia with PE or empyema between January 2012 and June 2016 in a region without routine pneumococcal vaccination.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | IPD surveillance system

Catalonia is a region in the northeast of Spain with a population of 7 518 903 in 2015, including 164 718 children aged <2 years, 347 344 aged 2-4 years, and 1 374 255 aged 5-17 years.<sup>8</sup>

### 2.2 | Setting, population, and design

A prospective observational study was carried out in three Catalan hospitals (Hospital Sant Joan de Déu [HSJD], Hospital Maternoinfantil Vall d'Hebron and Hospital de Nens de Barcelona), which account for 32% of pediatric hospitalizations in Catalonia. Patients aged <18 years diagnosed with invasive pneumococcal disease (IPD) were included between January 1, 2012 and June 30, 2016. At that time, the PCV13 was not financed by the public health system and was only available in the private market. Therefore, vaccination depended on the pediatrician's advice and parental willingness, with the exception of persons at high risk for pneumococcal disease, for whom the vaccine was financed.

### 2.3 | Data collection and definition

We collected epidemiological (age, sex, pneumococcal vaccination status, previous antibiotic treatment), clinical (existence of underlying disease; clinical features as complicated or uncomplicated pneumonia, pediatric intensive care unit [PICU] admission, antibiotic treatment, days of hospitalization and clinical outcome), and microbiological characteristics (culture in sterile samples, real-time polymerase chain reaction [PCR] in sterile samples), antibiotic sensitivity and serotype. IPD was defined as clinical signs of infection together with isolation of *S pneumoniae* by culture and/or detection of pneumococcal DNA by real-time PCR in sterile fluids (blood, cerebrospinal fluid [CSF], pleural fluid, or joint fluid). Pneumococcal pneumonia was defined as the isolation of *S pneumoniae* in blood, pleural fluid, tissue or pulmonary abscess with a clinical presentation and radiographic changes compatible with pneumonia. Uncomplicated pneumonia was defined as pulmonary consolidation with/without pleural effusion <10 mm non-loculated or <25% of the opacified hemithorax. Complicated pneumonia was defined as pulmonary consolidation with one of the following characteristics: pleural effusion >10 mm, loculated pleural fluid, empyema, necrotizing pneumonia, or lung abscess.<sup>7</sup> Empyema was defined as evidence of pus in the pleural space associated with pneumonia (defined by the macroscopic aspect, the number of leukocytes in pleural fluid [ $>50\,000/\mu\text{L}$ ] or the detection of *S pneumoniae* in pleural fluid, either by culture or by real-time PCR). PE was defined as pneumonia with pleural effusion not meeting the three criteria for empyema previously described. Biochemical analysis of pleural fluid and the microbiological study were made in the laboratory of each hospital, except for the capsular typing and clonal study, which was made in the HSJD laboratory. The strains isolated were sent to the National Pneumococcal Reference Center, where the serotyping was completed and an antimicrobial susceptibility study carried out. Clinical and epidemiological data were obtained by investigators in each center. PCV13 administration data were obtained using the vaccination card and medical records. A case was defined as pneumonia complicated with PE or empyema. The epidemiological, microbiological and clinical data of patients aged <2 years (Group 1) and  $\geq 2$  years (Group 2) were compared.

### 2.4 | Microbiological methods

All pneumococcal isolates were identified using the same microbiological methods throughout the study period, including the optochin

sensitivity test and an antigenic test targeting the capsular polysaccharide (Slidex pneumo-kit, BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). *S pneumoniae* DNA was detected by real-time PCR according to published assays.<sup>9,10</sup> This included amplification of the pneumolysin (ply) or autolysin (lytA) genes, and the wzg (cpsA) gene. Only samples positive for the ply/lytA and wzg genes in real-time PCR were included in the study. Serotyping of strains isolated by culture was made with the Quellung reaction, using antisera provided by the Serum Institut (Copenhagen, Denmark), or by dot-blot serotyping.<sup>11</sup> When the diagnosis was made only by RT-PCR, pneumococcal serotypes were detected according to previously reported methodologies. This procedure allows the identification of 34 serotypes/serogroups (1, 2, 3, 4, 5, 6A/6B, 6C, 7C/(7B/40), 7F/7A, 9N/9L, 9V/9A, 10A, 10F/(10C/33C), 11A/11D, 12F/(12A/44/46), 13, 16F, 17F, 18/(18A/18B/18C/18F), 19A, 19F, 20(20A/20B), 21, 22F/22A), 23A, 23B, 24/(24A/24B/24F), 31, 34, 35A/(35C/42), 35B, 35F/47F, 38/25F, 39) if real-time PCR is positive with less than 30 cycles, and the identification of 21 serotypes/serogroups (1, 3, 4, 6A/B, 7F/A, 8, 9V/A/N/L, 14, 18C/B, 19A, 19F/B/C, 23A/F) in samples with a positive result between 30 and 35 cycles.<sup>12</sup> The minimum inhibitory concentration (MIC) of several antibiotics, including penicillin and cefotaxime was tested by microdilution according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) recommendations and criteria. Meningeal breakpoints of penicillin resistance were considered for the epidemiological analysis.<sup>13</sup> Isolates with intermediate or high level resistance were defined as non-susceptible.

## 2.5 | Estimation of incidence rates

Due to the seasonal distribution of pneumococcus,<sup>14,15</sup> the evolution of incidence rates (IR) and serotypes was studied in the cases collected from 2012 to 2015, dismissing the first semester of 2016 in the

Figures 1 and 2. The reference population to estimate the annual incidence rates was calculated from the population data of the Statistical Institute of Catalonia and the percentage of hospital discharges from the three participating centers for each year of the study according to the data contributed by the Minimum Basic Data Set of Hospital Discharges,<sup>16</sup> estimating a reference population for the three hospitals of 422 666 in 2012 and 452 927 in 2015.

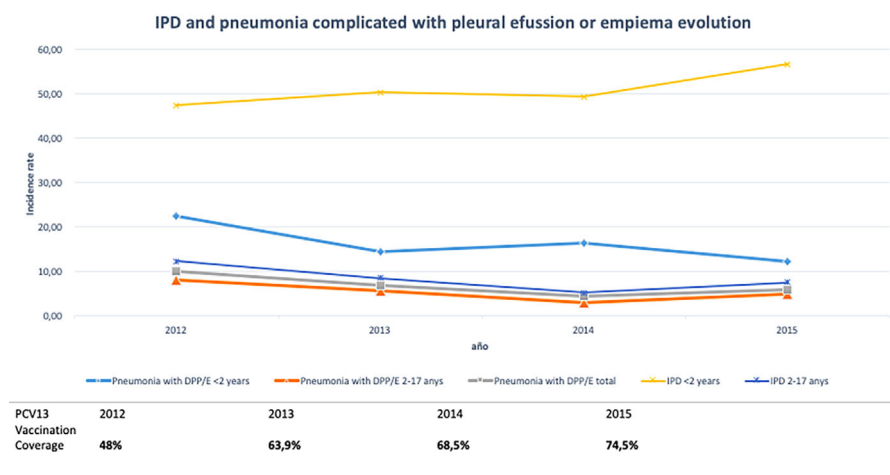
The denominator used to calculate the incidence rate of complicated pneumonia is the number of pneumonia (all cause) as captured in the hospital records database cases.

## 2.6 | Vaccination coverage

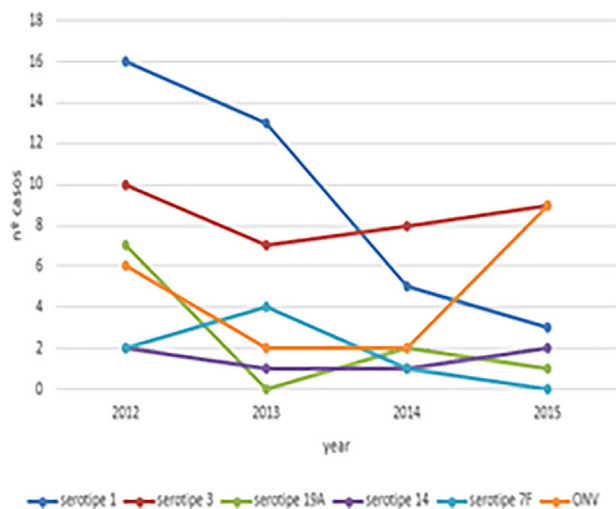
The estimated global vaccination coverage during the four years was 63.5% (48.2% in 2012, 63.9% in 2013, 68.5% in 2014, and 74.5% in 2015), according to the vaccination status of controls in a case-control study conducted by our group during the same study period.<sup>17</sup> In Table 1, there is a full spectrum of PCV coverage in cases with complicated pneumonia with Empyema and/or Pleural effusion, attending of no PCV, PCV7, PCV10, and PCV13. Cases with one or more doses of different vaccine types have been included in the vaccine group with the highest number of serotypes. During this period, PCV13 vaccination in Catalonia followed the recommendations of the Spanish Association of Pediatrics.<sup>18</sup> Vaccine failure was defined according to the Council for the International Organizations of Medical Sciences and the World Health Organization Working Group as IPD produced by PCV13 serotypes in a correctly vaccinated subject.<sup>19</sup>

## 2.7 | Statistical analysis

Differences in categorical variables were analyzed using the Pearson Chi-square test or Fisher's exact test and for continuous



**FIGURE 1** Cases of complicated pneumonia with pleural effusion or empyema from 2012 to 2015 and incidence of global IPD in the same period in children <18 years. PCV13 immunization coverage from 2012 to 2015. IPD <2 years: Invasive pneumococcal disease in the group 1; IPD 2-17 years: Invasive pneumococcal disease in the group 2; IPD: Invasive pneumococcal disease; PCV13: Pneumococcal conjugate vaccine 13-valent



**FIGURE 2** Evolution of the most frequent serotypes causing pneumonia with pleural effusion or empyema in 2012-2015

variables the Student's *t*-test. Incidence rate ratios (RR) were calculated between the different clinical presentations of pneumonia. Annual IR were calculated and binomial tests were used to analyze the differences between proportions. The 95% confidence intervals (CI) were calculated and *P* values  $\leq 0.05$  were considered statistically significant. A bilateral distribution was assumed for all values of *P*. The statistical analysis was made using SPSS for Windows, version 18.0 (SPSS) and Epidat 4.1.

## 2.8 | Ethical aspects

The study was approved by the Clinical Research Ethics Committees of the Fundaci3n Sant Joan de D3u and the Hospital Universitari Vall d'Hebron in accordance with current legislation and was carried out in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and the standards of good clinical practice (Table 2).

**TABLE 1** Full spectrum of PCV coverage in cases with complicated pneumonia with empyema and/or pleural effusion<sup>a</sup>

	Group 1 <2 years, n = 31 (%)	Group 2 2-17 years, n = 112 (%)
Non vaccinated(%)	18 (58.1)	57 (50.9)
>1 dose PCV7 (%)	0	23 (20.5)
>1 dosePCV10(%)	1 (3.2)	4 (3.6)
>1 dose PCV13 (%)	12 (38.7)	27 (24.1)
Unknown	0	1 (0.9)

PCV7, pneumococcal conjugate vaccine 7-valent; PCV10, pneumococcal conjugate vaccine 10-valent; PCV13, pneumococcal conjugate vaccine 13-valent.

<sup>a</sup>Cases with one or more doses of different vaccine types have been included in the vaccine group with the highest number of serotypes.

**TABLE 2** Pneumococcal serotypes causing pneumonia with and without pleural effusion (PE) or empyema

	PE or empyema, n = 142 (%)	No PE or empyema, n = 45 (%)	<i>P</i> -value
Serotype 1	41 (28.9)	6 (13.3)	<b>0.036</b>
Serotype 3	40 (28.2)	9 (20.0)	0.278
Serotype 19 A	10 (7.0)	5 (11.1)	0.381
Serotype 14	9 (6.3)	3 (6.7)	1.000
Serotype in the 13 PCV vaccine	116 (81.7)	27 (60.0)	<b>0.003</b>

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Epidemiological data, clinical presentation, and hospital course

Between January 2012 and June 2016, 263 patients with IPD were identified, of whom 194 developed pneumococcal pneumonia and required hospitalization; 151 patients presented complicated pneumococcal pneumonia (77.8%), 8 of whom were excluded from the study as they only presented necrotizing pneumonia. The remaining 143 patients (73.7%) presented complicated pneumococcal pneumonia with PE or empyema, and were finally included in the study. Thirty-one patients were aged <2 years (Group 1) and 112 were aged 2-17 years (Group 2). The proportion of cases with empyema was higher than that of PE both in the total population (79.7%, *P* < 0.005) and in group 1 (70.9%, *P* = 0.029) and group 2 (82.1%, *P* < 0.005). Sixty-five (45.5%) cases were recorded in the winter (*P* = 0.316). The mean hospital stay was longer in group 1, (Interquartile interval: 13.94, standard deviation 8.67) versus 11.35 (standard deviation 5.35); *P* = 0.044) (Table 3). The total incidence of pneumonia with PE or empyema decreased significantly between 2012 and 2015 (RR: 0.59, 0.35-0.97, *P* = 0.003). However, in 2015 there was a non-significant change in the trend with respect to the previous year (RR: 1.35, 0.73-2.45, *P* = 0.311) (Figure 1).

During 2012-2015, the incidence of pneumococcal pneumonia complicated by PPE/E in children aged <18 years requiring hospitalization (6.83 cases  $\times 10^{-5}$  person/years) was greater than the incidence of pneumococcal pneumonia without PE or empyema (2.09 cases  $\times 10^{-5}$  person/years) (rate ratio [RR]: 3.27; 2.25-4.86; *P* < 0.001). Significant differences were also observed in the age groups. In group 1, the rates were 16.39 cases  $\times 10^{-5}$  person/years and 7.89 cases  $\times 10^{-5}$  person/years, respectively (RR: 2.07, 1.03-4.38, *P* = 0.028) and in group 2 the rates were 5.46 cases  $\times 10^{-5}$  person/years and 1.39 cases  $\times 10^{-5}$  person/years, respectively (RR: 3.92, 2.48-6.41, *P* < 0.001). The incidence of pneumococcal pneumonia complicated by PPE/E was higher in group 1 than in group 2 (RR: 3.00, 1.89-4.65, *P* < 0.001) as was the incidence of pneumococcal pneumonia without PE or empyema (RR: 5.66, 2.65-11.58, *P* < 0.001). There were no statistically significant differences between-group differences in sex, comorbidity, or previous ambulatory antibiotic treatment. Group 1 patients required PICU more

**TABLE 3** Demographic characteristics and clinical presentation of children with pneumococcal pneumonia according to age

	Group 1 <2 years, n = 31 (%)	Group 2 2-17 years, n = 112 (%)	P
Sex, male, n (%)	20 (64.5)	64 (57.1)	0.461
Season: winter (%)	10 (32.3)	55 (49.1)	0.095
Comorbidity n (%)	1 (3.2)	1 (0.9)	0.388
>1 dose PCV13 <sup>a</sup> : n (%)	12 (38.7)	27 (24.1)	0.171
Outpatient treatment	7 (22.6)	16 (14.3)	0.266
Diagnosis <sup>b</sup>			
Only RT-PCR	18 (58.1)	73 (67.0)	0.358
Only culture	3 (9.7)	4 (3.6)	0.173
RT-PCR + culture	10 (32.3)	33 (29.5)	0.764
Complicated pneumonia <sup>c</sup>			
Empyema	15 (48.5)	65 (58)	0.338
PPE	9 (29)	17 (15.2)	0.077
E + NP	4 (12.9)	17 (15.2)	1.000
PPE + NP	0	3 (2.7)	NA
PPE + E	3 (9.7)	7 (6.25)	0.452
E+PPE+NP	0	3 (2.7)	NA
Mechanical ventilation	4 (12.9)	3 (2.7)	<b>0.040</b>
Barotrauma	5 (16.1)	8 (7.1)	0.124
Intensive care, n (%)	8 (25.8)	14 (12.5)	0.069
Serotypes			
Serotype 1	1 (3.3)	40 (35.7)	<b>&gt;0.001</b>
Serotype 3	9 (30.0)	31 (27.7)	0.802
Serotype 19A	5 (16.7)	5 (4.5)	<b>0.035</b>
Serotype 14	1 (3.3)	8 (7.1)	0.684
Serotypes in PCV13 vaccine	19 (63.3)	97 (86.6)	<b>0.003</b>
Non-sensitive strains <sup>d</sup>			
Penicillin	8/14 (57.1)	6.33 (18.2)	<b>0.008</b>
Cefotaxime	4/14 (28.6)	4.33 (12.1)	0.215
Antibiotic in hospital n (%)			
Ampicillin	9 (29.0)	42 (37.5)	0.479
Cefotaxime	12 (38.7)	37 (33.0)	0.555
Ceftriaxone	6 (19.4)	34 (30.4)	0.227
Penicillin G	13 (41.9)	20 (17.9)	<b>0.005</b>
Amoxi-clav	10 (32.3)	17 (15.2)	<b>0.031</b>
Clindamycin	4 (12.9)	15 (13.4)	1.000
Amoxicillin	2 (6.45)	8 (7.14)	1.000
Vancomycin	3 (9.68)	6 (5.36)	0.407
Hospitalization, days median (SD)	13.94 (8.67)	11.36 (5.35)	<b>0.044</b>
Sequelae, n (%)			
Pulmonary	2 (6.39)	19 (16.96)	0.249
Other	1 (3.22)	0	NA
Case fatality rate N (%)	0	0	NA

<sup>a</sup>Patients with one or more doses of different types of vaccine have been included in the vaccine group with the highest number of serotypes.

<sup>b</sup>Blood RT-CPR was not obtained in 9 patients in group 1 and 28 in group 2.

<sup>c</sup>E, empyema; PE, pleural effusion; NP, necrotizing pneumonia.

<sup>d</sup>Meningeal cut-off points according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

frequently (8/31, 25.8%) than group 2 patients (14/112, 12.5%) ( $P < 0.069$ ). The most frequent complications were acute respiratory failure with mechanical ventilation (4/31, 12.9%) and barotrauma (3/31, 10.7%) in group 1 and necrotizing pneumonia (23/112, 20.5%) followed by barotrauma (8/112, 7.1%) in group 2. Group 1 patients more frequently required mechanical ventilation (4/31, 12.9%) than group 2 patients (3/112, 2.7%) ( $P \leq 0.040$ ). One patient in group 1 developed hemolytic-uremic syndrome.

The most frequently used antibiotics were penicillin G sodium (41.9%), followed by cefotaxime (38.7%) and ampicillin (29.0%) in group 1, and ampicillin (37.5%), cefotaxime (33.0%), and ceftriaxone (30.4%) in group 2. The frequency of use of penicillin G sodium and amoxicillin-clavulanic acid was significantly higher in group 1 in both cases ( $P = 0.005$  and  $P = 0.031$ , respectively). No patient died of pneumonia with PE or empyema.

### 3.2 | Microbiological results

Of the 143 cases, 91 (65%;  $P < 0.001$ ) were diagnosed only by real-time PCR, 43 (30.1%) by culture and real-time-PCR, and 7 (4.9%) by culture alone. There were no significant differences in the diagnostic technique according to age group.

Of the 194 cases with pneumonia, the serotype was determined in 187 (4 cases of pneumonia without PE or empyema and 142 cases of pneumonia with PE or empyema).

Serotype 1 was more frequent in complicated cases of pneumonia cases (41/143, 28.6%) than in pneumonia without PE or empyema (6/44, 13.6%);  $P = 0.036$ . There were also significant differences in the frequency of PCV13 serotypes, which were more frequent among complicated pneumonia cases (116/143, 81.1%) than in uncomplicated cases (27/44, 61.4%);  $P = 0.003$ . The most frequent serotypes were explained in the Table 3.

The analysis of the evolution of the most frequent serotypes causing pneumonia complicated with PE or empyema between 2012 and 2015 showed there was a significant decrease in the proportion of serotype 1 (16/43, 37.2% vs 3/27, 11.1%,  $P = 0.026$ ), together with a trend to an increase in non-vaccine serotypes (6/43, 14.0% vs 9/27, 33.3%,  $P = 0.054$ ). The variations in the proportion of serotypes 3 (10/43, 23.3% vs 9/27, 33.3%,  $P = 0.356$ ), 19A (7/43, 16.3% vs 1/27, 3.7%  $P = 0.140$ ), 14 (2/43, 4.7% vs 2/27, 7.4%,  $P = 0.637$ ) were not significant (Figure 2).

The antibiotic sensitivity analysis was made in the 47 cases in which the isolated strain was available in culture, since detections using RT-PCR do not allow this: 14 cases belonged to group 1 and 33 to group 2. Statistically significant differences between-group were observed when comparing sensitivity to penicillin: the number of strains not sensitive to penicillin was 8/14 (57.1%) in group 1 and 6/33 (18.2%) in group 2 (OR = 6.0, 1.51-23.84;  $P = 0.008$ ). No statistically significant differences were observed in the sensitivity to cefotaxime.

### 3.3 | Vaccination

There were 15 patients in the two groups who were considered as vaccine failures, since they were diagnosed with pneumonia

complicated with PE or empyema due to PCV13 serotypes (13 due to serotype 3, one due to serotype 14, and another due to serotype 19A). None had comorbidities and were considered previously health.

## 4 | DISCUSSION

Usually non-complicated pneumococcal pneumonia does not need hospitalization, being treated with oral antibiotics at home. In complicated pneumonias with PE or empyema the pleural fluid allows the detection of *S pneumoniae* by culture or real-time PCR when pneumococci are not detected in blood. That is the reason pneumococci is detected more frequently in complicated pneumonia with pleural effusion than in no-complicated pneumonia.<sup>7</sup> Empyema affects somewhat older children (Group 2). This continues to be a reflection of the clinical and age group tropism of the different *S pneumoniae* serotypes.<sup>20</sup> In the case of serotype 1, the presence in carriers, although low, is the main cause of empyema, and studies have shown that serotype 1 is extremely invasive. During the pre-PCV13 era it was demonstrated that, in Catalonia, pneumococcal empyema increased, especially due to clone 306 of serotype 1, which was very aggressive.<sup>4,5</sup> In our study, the most frequent serotype in group 2 was serotype 1, which affects especially the older group but, strikingly, was not present in children aged <2 years. Probably the lower that PCV13 (serotype 1) coverage in group 2 is the main cause. Another possible explanations may lie in its epidemic character and its lack of colonizing power.<sup>5</sup>

The overall incidence of pneumococcal pneumonia in children aged <2 years, 2-4 years, and 5-19 years in Catalonia was 22.9, 18.6, and 3.3/100 000 person/years, respectively.<sup>15</sup>

The progressive decrease in the incidence of pneumonia complicated by PE or empyema over the study period was consistent with the progressive increase in the rate of PCV13 coverage. This indicates that the PCV13 serotypes are mostly responsible for cases of pneumonia complicated with PE or empyema.

The evolution of serotypes causing the majority of pneumococcal pneumonias complicated by PE or empyema shows there was a reduction in serotypes 1 and 19A, the latter not significantly, but not serotype 3. Many studies have shown that serotype 3 continues to produce invasive pneumococcal disease despite being included in the PCV13.<sup>7,21,22</sup> Antachopoulos et al<sup>23</sup> reported a high incidence of complicated pneumonia caused by serotype 3, and a third of these patients had received complete PCV13 vaccination. A study carried out in Spain reported that serotype 3 was one of the most prevalent causes of parapneumonic empyema and was associated with a high rate of complications.<sup>17</sup> A recent study made in Portugal by Silva-Dacosta et al<sup>35</sup> determine that the most frequent serotypes causing complicated pneumonia with PE or empyema between 2010 and 15 in children were 3, 1, and 19A, together accounting for 62% (68/109) of cases. Nineteen cases attributable to 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) serotypes (mostly serotype 3) were detected among 22 children age-appropriately vaccinated with PCV13. So, they suggest reduced effectiveness of PCV13 against serotype 3 in complicated



pneumonia with PE or empyema. These studies demonstrate how, as the cause of empyema, serotypes 1 and 19A decreased after vaccination, while serotype 3 decreased less. In our case, serotype 3 was the most frequent serotype, besides being the cause of most vaccine failures, as reported by other authors.<sup>24,25</sup> This may be due to the low immunogenicity of this serotype, but further study is required to explain these results. The second factor that makes these serotypes more frequent is their virulence, as well as possible vaccine failures, as occurs with serotype 3.<sup>26–28</sup> The most frequent complications were acute respiratory failure requiring PICU and mechanical ventilation in group 1 and necrotizing pneumonia with subsequent barotrauma in group 2, coinciding with other authors.<sup>7,8,20,27,29–31</sup>

Recently published studies on complicated and uncomplicated pneumococcal pneumonia show a reduction in cases after the introduction of the PCV13 vaccine.<sup>7,20,22,32</sup> Although PCV13 serotypes fell by 74% in the United States after the introduction of the PCV13, no clear replacement of serotypes not included in the PCV13 vaccine has been demonstrated.<sup>7</sup> We found no replacement by non-PCV13 serotypes, although monitoring is needed for this possibility. In England and Wales, Ladhani et al found a replacement of vaccine serotypes by non-PCV13 serotypes, specifically serotypes 8, 12F, and 9N, although at present this has only been shown in adults.<sup>33</sup> In Israel, also has been described a high incidence of serotype 12F after sequential introduction of 7 and 13-valent pneumococcal conjugate vaccines.<sup>34</sup>

Like many other studies, the strains analyzed in our study were almost all sensitive to penicillin,<sup>7,20,22</sup> supporting the use of penicillin or parenteral ampicillin as the first choice empirical treatment for complicated pneumococcal pneumonia.

This study has some limitations. First, only patients attended in three hospitals were included, although these hospitals serve 32% of the pediatric population in Catalonia. Second, cultures and RT-PCR were not made in all patients, since PCR in blood was only requested if the culture was negative: this may represent a bias to the assessment of the sensitivity of real-time PCR in blood. Third, data referring to surgical treatments were not collected, and therefore we cannot state whether specific surgical treatment may have influenced the evolution. Finally, because this was a hospital-based study, we were unable to quantify uncomplicated pneumococcal pneumonias treated at home, and therefore our conclusions may be valid only for hospitalized cases.

## 5 | CONCLUSIONS

We observed a decline in complicated pneumonia with PE or empyema predominantly due to declining serotype 1 (37.2% vs 11.1%,  $P = 0.026$ ) in young children which correlates to rising PCV13 vaccine coverage in the population between 2012 and 2015.

The greatest burden of disease was caused by PCV13 serotypes. Therefore, increased vaccination coverages could reduce this burden.

Surveillance of invasive pneumococcal disease should continue to determine the pneumococcal serotypes isolates as cause of pneumococcal pneumonia in coming years.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are very grateful with the documentalist Miss Elvira Santamaria for her contribution to the elaboration of the manuscript. This work was supported by the Plan Nacional I+D+I, ISCIII-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria (Projects P1 11/02081, PI 11/2345) and cofounded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and AGAUR (Grant 2017 SGR 1342).

## ORCID

Alvaro Díaz-Conradi  <http://orcid.org/0000-0002-0631-3142>

## REFERENCES

- Bradley JS, Byington CL, Shah SS, et al. The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: clinical practice guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2011;53:e25–e76.
- Seeger FJ, Seeger K, Maier A, et al. Therapy of 645 children with parapneumonic effusion and empyema-A German nationwide surveillance study. *Pediatr Pulmonol*. 2017;52:540–547.
- Almazrou Y, Shibl AM, Alkhlaif R, et al. Epidemiology of invasive pneumococcal disease in Saudi Arabian children younger than 5 years of age. *J Epidemiol Glob Health*. 2016;6:95–104.
- Muñoz-Almagro C, Jordan I, Gene A, Latorre C, Garcia-Garcia JJ, Pallares R. Emergence of invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes in the era of 7-valent conjugate vaccine. *Clin Infect Dis*. 2008;46:174–182.
- Obando I, Muñoz-Almagro C, Arroyo LA, et al. Pediatric parapneumonic empyema. *Spain. Emerg Infect Dis*. 2008;14:1390–1397.
- Ruiz-Contreras J, Del Amo M, Picazo J. Effects of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on invasive pneumococcal disease in infants aged 0 to 90 days in Madrid, Spain. *J Pediatr Infect Dis Soc*. 2018;7:175–176.
- Olarte L, Barson WJ, Barson RM, et al. Pneumococcal pneumonia requiring hospitalization in US children in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine era. *Clin Infect Dis*. 2017;64:1699–1704.
- Idescat. Idescat Annual Report 2017. Accessed 2018 May 7. Available online at: <https://www.idescat.cat/novetats/?id=2949&lang=en>
- Centers for Disease Control and Prevention. Chapter 10: PCR for Detection and Characterization of Bacterial Meningitis Pathogens: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae*. Accessed 2018 May 7. Available online at: <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt10-pcr.html>
- Tarragó D, Fenoll A, Sánchez-Tatay D, et al. Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:828–834.
- Fenoll A, Jado I, Vicioso D, Casal J. Dot blot assay for the serotyping of pneumococci. *J Clin Microbiol*. 1997;35:764–766.
- Selva L, del Amo E, Brotons P, Muñoz-Almagro C. Rapid and easy identification of capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by use of fragment analysis by automated fluorescence-based capillary electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 2012;50:3451–3457.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015. Accessed 2018 May 10. Available online at: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_5.0\\_Breakpoint\\_Table\\_01.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf).



14. Ciruela P, Broner S, Izquierdo C, et al. Invasive pneumococcal disease rates linked to meteorological factors and respiratory virus circulation (Catalonia, 2006-2012). *BMC Public Health*. 2016;16:400.
15. Ciruela P, Izquierdo C, Broner S, et al. Epidemiologia de la malaltia pneumocòccica invasiva a Catalunya. Informe 2012-2014. Accessed 2018 Apr 8. Available online at: [http://canalsalut.gencat.cat/web/content/home\\_canal\\_salut/professionals/temes\\_de\\_salut/vigilancia\\_epidemiologica/documents/arxiu/malaltia\\_neumococcia\\_invasiva\\_informe\\_2012\\_2014.pdf](http://canalsalut.gencat.cat/web/content/home_canal_salut/professionals/temes_de_salut/vigilancia_epidemiologica/documents/arxiu/malaltia_neumococcia_invasiva_informe_2012_2014.pdf)
16. Divisió d'Anàlisi de la Demanda i l'Activitat. Activitat assistencial de la xarxa sanitària de Catalunya. Any 2011. Registre del conjunt mínim bàsic de dades (CMBD). Accessed 2018 Apr 24. Available online at: [http://catsalut.gencat.cat/web/content/minisite/catsalut/proveïdors\\_professionals/registres\\_catalegs/registres/cmbd/informes\\_anuals/cmbd\\_2011.pdf](http://catsalut.gencat.cat/web/content/minisite/catsalut/proveïdors_professionals/registres_catalegs/registres/cmbd/informes_anuals/cmbd_2011.pdf)
17. Domínguez A, Ciruela P, Hernández S, et al. Effectiveness of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in preventing invasive pneumococcal disease in children aged 7-59 months. A matched case-control study. *PLoS ONE*. 2017;12:e0183191.
18. Moreno-Pérez D, Álvarez García FJ, Arístegui Fernández J, et al. [Immunisation schedule of the Spanish Association of Paediatrics: 2013 recommendations]. *An Pediatr (Barc)*. 2013;78:59.e1-59.27.
19. Heining U, Bachtiar NS, Bahri P, et al. The concept of vaccination failure. *Vaccine*. 2012;30:1265-1268.
20. Wiese AD, Griffin MR, Zhu Y, Mitchel EFJ, Grijalva CG. Changes in empyema among U.S. children in the pneumococcal conjugate vaccine era. *Vaccine*. 2016;34:6243-6249.
21. Slotved HC, Dalby T, Harboe ZB, et al. The incidence of invasive pneumococcal serotype 3 disease in the Danish population is not reduced by PCV-13 vaccination. *Heliyon*. 2016;2:e00198.
22. Syrogiannopoulos GA, Michoula AN, Tsimitselis G, Vassiou K, Chryssanthopoulou DC, Grivea IN. Pneumonia with empyema among children in the first five years of high coverage with 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Infect Dis (Lond)*. 2016;48:749-753.
23. Antachopoulos C, Tsolia MN, Tzanakaki G, et al. Parapneumonic pleural effusions caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 in children immunized with 13-valent conjugated pneumococcal vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33:81-83.
24. Angoulvant F, Levy C, Grimprel E, et al. Early impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on community-acquired pneumonia in children. *Clin Infect Dis*. 2014;58:918-924.
25. Tin Tin Htar M, Christopoulou D, Schmitt H-J. Pneumococcal serotype evolution in Western Europe. *BMC Infect Dis*. 2015;15:419.
26. Yeh SH, Gurtman A, Hurley DC, et al. Immunogenicity and safety of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in infants and toddlers. *Pediatrics*. 2010;126:e493-e505.
27. Moraga-Llop F, Garcia-Garcia JJ, Díaz-Conradi A, et al. Vaccine failures in patients properly vaccinated with 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in Catalonia, a region with low vaccination coverage. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35:460-463.
28. Snape MD, Klinger CL, Daniels ED, et al. Immunogenicity and reactogenicity of a 13-valent-pneumococcal conjugate vaccine administered at 2, 4, and 12 months of age: a double-blind randomized active-controlled trial. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29:e80-e90.
29. Carter E, Waldhausen J, Zhang W, Hoffman L, Redding G. Management of children with empyema: pleural drainage is not always necessary. *Pediatr Pulmonol*. 2010;45:475-480.
30. Hernández-Bou S, García-García JJ, Esteva C, Gené A, Luaces C, Muñoz Almagro C. Pediatric parapneumonic pleural effusion: epidemiology, clinical characteristics, and microbiological diagnosis. *Pediatr Pulmonol*. 2009;44:1192-1200.
31. McKee AJ, Ives A, Balfour-Lynn IM. Increased incidence of bronchopulmonary fistulas complicating pediatric pneumonia. *Pediatr Pulmonol*. 2011;46:717-721.
32. Pírez MC, Algorta G, Chamorro F, et al. Changes in hospitalizations for pneumonia after universal vaccination with pneumococcal conjugate vaccines 7/13 valent and haemophilus influenzae type b conjugate vaccine in a Pediatric Referral Hospital in Uruguay. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33:753-759.
33. Ladhani SN, Collins S, Djennad A, et al. Rapid increase in non-vaccine serotypes causing invasive pneumococcal disease in England and Wales, 2000-17: a prospective national observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:441-451.
34. Rokney A, Ben-Shimol S, Korenman Z, et al. Emergence of *Streptococcus pneumoniae* serotype 12F after sequential introduction of 7- and 13-valent vaccines, Israel. *Emerg Infect Dis*. 2018;24:453-461.
35. Silva-Costa C, João Brito M, Pinho Marcos D, et al. Pediatric complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 in 13-valent pneumococcal conjugate vaccinees, Portugal, 2010-2015. *Emerg Infect Dis*. 2018;24:1307-1314.

**How to cite this article:** Díaz-Conradi A, Hernández S, García-García JJ, et al. Complicated pneumococcal pneumonia with pleural effusion or empyema in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine era. *Pediatric Pulmonology*. 2019;1-8. <https://doi.org/10.1002/ppul.24279>

### 4.3. ARTICLE 3:

#### **Autors**

**Hernández S**, Muñoz-Almagro C, Ciruela P, Soldevila N, Izquierdo C, Codina MG, Díaz A, Moraga-Llop F, García-García JJ, Domínguez Á.

#### **Títol**

Invasive pneumococcal disease and influenza activity in a pediatric population: impact of PCV13 vaccination in epidemic and nonepidemic influenza periods.

#### **Revista**

Journal of Clinical Microbiology

#### **Referència**

J Clin Microbiol. 2019;57(8):e00363-19. doi:10.1128/JCM.00363-19

#### **Factor d'impacte**

5,897 (2019)

#### **Quartil**

Q1 (Microbiology (medical))





# Invasive Pneumococcal Disease and Influenza Activity in a Pediatric Population: Impact of PCV13 Vaccination in Epidemic and Nonepidemic Influenza Periods

**Sergi Hernández,<sup>a</sup> Carmen Muñoz-Almagro,<sup>b,c,d,e</sup> Pilar Ciruela,<sup>a,b</sup> Núria Soldevila,<sup>b,f</sup> Conchita Izquierdo,<sup>a</sup> Maria Gemma Codina,<sup>g</sup> Alvaro Díaz,<sup>h</sup> Fernando Moraga-Llop,<sup>g</sup> Juan José García-García,<sup>b,c,d</sup> Ángela Domínguez,<sup>f,b</sup> Working Group of Projects PI11/02081 and PI11/2345**

<sup>a</sup>Agència de Salut Pública de Catalunya, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain

<sup>b</sup>CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>c</sup>Malalties Prevenibles amb Vacunes, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, Spain

<sup>d</sup>Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>e</sup>Departament de Medicina, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain

<sup>f</sup>Departament de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>g</sup>Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

<sup>h</sup>Hospital de Nens, Barcelona, Spain

**ABSTRACT** The objective of this study was to analyze the incidence, clinical presentation, and severity of invasive pneumococcal disease (IPD)-causing serotypes and the impact of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccination during epidemic and nonepidemic influenza periods in Catalonia, Spain. This was a prospective study in persons aged <18 years diagnosed with IPD between 2012 and 2015 in three Catalan pediatric hospitals. IPD was defined as clinical infection together with isolation of *Streptococcus pneumoniae* by culture and/or detection by reverse transcription-PCR in a normally sterile sample. Incidence rate ratios (IRRs) and the fraction of IPD prevented associated with 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) were calculated. The bivariate analysis used the  $\chi^2$  test and the multivariate analysis nonconditional logistic regression. A total of 229 cases of IPD were recorded. The incidence was higher during influenza epidemic periods (IRR, 2.7; 95% confidence interval [CI], 2.05 to 3.55;  $P < 0.001$ ), especially for pneumonia (IRR, 3.25; 95% CI, 2.36 to 4.47;  $P < 0.001$ ), with no differences in the distribution of pneumococcal serotypes. Complications during admission and sequel at discharge were greater during epidemic periods (adjusted odds ratio [aOR], 2.00; 95% CI, 1.06 to 3.77;  $P = 0.03$ ) than at nonepidemic periods (aOR, 3.38; 95% CI, 1.37 to 8.29;  $P = 0.01$ ). The prevented fraction for the population (PFp) of IPD in children aged 7 to 59 months was 48% to 49.4%. The PFp was higher in influenza epidemic than non-epidemic periods and increased when  $\geq 2$  doses of PCV13 or  $\geq 1$  after 24 months were administered. Influenza virus circulation increases the incidence of IPD in persons aged <18 years. In influenza epidemic periods, IPD cases were more severe. Increased PCV13 coverage might increase the fraction of IPD prevented in epidemic and nonepidemic periods.

**KEYWORDS** 13-valent pneumococcal conjugate vaccine, invasive pneumococcal disease, highly invasive serotypes, influenza virus, seasonality

Invasive pneumococcal disease (IPD) is a major cause of morbidity and mortality in adults and children and fluctuates seasonally during the winter months in temperate countries (1, 2). Seasonality affects both the disease incidence and the clinical presen-

**Citation** Hernández S, Muñoz-Almagro C, Ciruela P, Soldevila N, Izquierdo C, Codina MG, Díaz A, Moraga-Llop F, García-García JJ, Domínguez Á, Working Group of Projects PI11/02081 and PI11/2345. 2019. Invasive pneumococcal disease and influenza activity in a pediatric population: impact of PCV13 vaccination in epidemic and nonepidemic influenza periods. *J Clin Microbiol* 57:e00363-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.00363-19>.

**Editor** Daniel J. Diekema, University of Iowa College of Medicine

**Copyright** © 2019 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Sergi Hernández, [hernandez.sergi@gmail.com](mailto:hernandez.sergi@gmail.com).

**Received** 6 March 2019

**Returned for modification** 8 April 2019

**Accepted** 2 June 2019

**Accepted manuscript posted online** 12 June 2019

**Published** 26 July 2019

[This article was published on 26 July 2019 with the title "Invasive Pneumococcal Disease and Influenza Activity in a Pediatric Population: Impact of PCV13 Vaccination in Pandemic and Nonpandemic Influenza Periods." The title was updated in the version posted on 31 July 2020.]

tation. Reports have described an increased incidence of bacteremic pneumonia but not of other clinical presentations during the winter months (3–5).

Environmental factors, such as temperature, humidity, pollution, and hours of daylight, help explain the seasonality (2, 6). Likewise, the circulation of respiratory viruses during the winter months, especially the influenza virus, respiratory syncytial virus (RSV), and metapneumovirus, have been associated with an increased incidence of IPD, especially in children (2, 7). Although the mechanisms of interaction between respiratory viruses and *Streptococcus pneumoniae* at the host level have been widely described (8–11), the proportion of episodes of IPD attributable to the circulation of respiratory viruses is not clear (12, 13).

After the 2009 influenza pandemic, many studies showed that the influenza virus not only increases the incidence of invasive pneumococcal pneumonia but also may be a factor influencing severity (4, 14–16).

Influenza virus infection favors the nasopharyngeal colonization of *S. pneumoniae* in children (3), which is a critical step in the subsequent development of IPD. However, the relationship between influenza virus and IPD-causing *S. pneumoniae* serotypes is unclear. Some reports have linked prior influenza virus infection with a subsequent episode of IPD caused by highly invasive serotypes (7), while other authors link it with IPD produced by less invasive serotypes (17–19). Influenza epidemics have been shown to affect the distribution of IPD-causing serotypes (20).

The introduction of the pneumococcal conjugated heptavalent vaccine (PCV7) in 2001 (21), the 10-valent conjugate vaccine (PCV10) in 2009 (22), and the 13-valent conjugate vaccine (PCV13) in 2010 (23) was associated with a significant reduction in IPD and a change in the distribution of the main disease-causing *S. pneumoniae* serotypes (24). (25). In Catalonia, Spain, the PCV13 was not included in the childhood vaccination schedule financed by the public health system until July 2016. In the 2012 to 2015 study period, the estimated PCV13 coverage in children aged 7 to 59 months in Catalonia was 63% (26).

The aim of this study was to analyze variations in the incidence, clinical presentation, severity, and serotypes associated with IPD in Catalonia after the introduction of the 13-valent conjugate vaccine and the impact of vaccination, measured as the fraction of IPD prevented in the population, during epidemic and nonepidemic influenza periods.

## MATERIALS AND METHODS

**Data confidentiality and ethical aspects.** No diagnostic tests were made or samples taken from any participant in addition to those required by routine care. The study complies with the principles of the Declaration of Helsinki and the legal structure in respect to international human rights and biomedicine and protection of personal data laws.

The Ethics Committee of Hospital Sant Joan de Déu approved the study. Informed consent signed by parents or legal guardians was given for all participants. All data were treated as confidential, and records were accessed anonymously.

**Study design.** A prospective study was conducted in persons aged <18 years diagnosed with IPD between 1 January 2012 and 31 December 2015 attended in three pediatric hospitals in Catalonia, Spain, namely, Hospital Sant Joan de Déu, Hospital Materno-infantil Vall d'Hebrón, and Hospital de Nens de Barcelona. These hospitals are responsible for 20%, 8.5%, and 3%, respectively, of total hospital discharges in Catalonia of children aged <18 years, according to data from the Minimum Basic Data Set of Hospital Discharges (CMBDAH) (27), and the estimated reference population in this age group of the three hospitals was from 422,666 in 2012 to 452,927 in 2015.

**Selection of cases.** Patients aged <18 years hospitalized due to IPD during the study period in the participating centers were included. IPD was defined as clinical infection together with the isolation by culture and/or detection of *LytA* gene DNA and an additional capsular gene of *S. pneumoniae* by reverse transcription-PCR (RT-PCR) in a normally sterile sample.

RT-PCR was carried out according to a standardized work protocol. Pediatricians requested RT-PCR in cases of clinical suspicion in a patient with clinical and hospital admission criteria. RT-PCR was performed in the most appropriate sterile sample, namely, cerebrospinal fluid, pleural fluid, or plasma (never in whole blood or in blood culture bottles), according to the clinical signs.

**Identification, serotyping, and classification of *S. pneumoniae*.** All strains isolated by culture were serotyped using the Quellung reaction or dot blot by the National Centre for Microbiology, Majadahonda, Madrid, which allows 97 serotypes to be identified.

Capsular typing of all culture-negative and PCR-positive samples was performed using two methods depending on the amount of *S. pneumoniae* DNA available. If the amount was low (detection of *LyfA* gene DNA and an additional capsular gene of *S. pneumoniae* by RT-PCR with the cycle threshold [ $C_T$ ] of

>30 cycles), a previously described, real-time multiplex PCR technique that detects all pneumococcal capsular types and differentiates serotypes 1, 3, 4, 5, 6A/C, 6B/D, 7F/A, 8, 9V/A/N/L, 14, 15B/C, 18C/B, 19A, 19F/B/C, 23A, and 23F was used (28). If the amount of *S. pneumoniae* DNA was high (PCR-positive samples with  $C_T$  of  $\leq 30$  cycles), sequential multiplex PCR combined with fragment analysis and automated fluorescent capillary electrophoresis to differentiate serotypes [1, 2, 3, 4, 5, 6A/6B, 6C, 6,7C/(7B/40), 7F/7A, 9N/9L, 9V/9A, 10A, 10F/(10C/33C), 11A/11D, 12F/(12A/44/46), 13, 16F, 17F, 18/(18A/18B/18C/18F), 19A, 19F, 20(20A/20B), 21, 22F/22A), 23A, 23B, 24/(24A/24B/24F), 31, 34, 35A/(35C/42), 35B, 35F/47F, 38/25F, and 39] was used (29).

Since PCR does not differentiate between serotypes 6A and 6C; 7F and 7A; 9V, 9A, and 9N; and 19F, 19B, and 19C, these serotypes were considered vaccine serotypes 6A, 7F, 9V, and 19F, respectively. PCR-positive samples that were negative for the serotypes included in the sequential multiplex PCR (including all vaccine serotypes) were classified as other nonvaccine serotypes (ONVS).

The serotypes found were classified into two groups according to their invasiveness, namely, highly invasive serotypes (HIS; serotypes 1, 3, 4, 5, 7F, 8, 9N, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, and 22F) and the remaining serotypes (non-HIS), as described by various authors (30–34).

**Demographic, clinical, and epidemiological variables.** The following demographic, clinical, and epidemiological variables were recorded for each case: age, sex, date of birth, date of onset of symptoms, date of hospitalization, clinical form of IPD (meningitis, septic shock, pneumonia, complicated pneumonia, musculoskeletal infection, occult bacteremia, and others), in-hospital complications, mechanical ventilation, intensive care unit (ICU) admission and length of stay, risk medical conditions (sickle cell anemia; congenital or acquired asplenia; human immunodeficiency virus; cochlear implant; congenital immunodeficiency; chronic heart disease; chronic lung diseases, including asthma if treated with a risk dose of oral corticosteroids; cerebrospinal fluid fistula; chronic renal failure, including nephrotic syndrome; immunosuppressive treatment or radiotherapy; solid organ transplant; transplantation of hematopoietic progenitors; and diabetes mellitus), date and evolution at discharge (discharge without sequelae, sequelae, and death), and the history of vaccination with any pneumococcal conjugate vaccine.

**Definition of influenza epidemic periods.** Influenza epidemic periods were established according to the data provided by the Pla d'Informació de les Infeccions Respiratòries Agudes a Catalunya (PIDIRAC) which, during the winter season (weeks 40 to 20) obtains daily information on morbidity due to acute respiratory infections through the population registry, including data from sentinel doctors throughout Catalonia (35). The epidemic threshold for influenza virus is established as  $>100$  cases/ $10^5$  inhabitants, and influenza epidemic periods were defined as weeks in which this incidence was reached and the two subsequent weeks (7).

**Reference population and estimated vaccination coverage.** The reference population of the three hospitals used to measure weekly incidence rates (IRs) during the epidemic and nonepidemic influenza periods was calculated according to population data from the Statistical Institute of Catalonia and determined by calculating the percentage of discharges of each hospital and each age group of the study in relation to the total number of hospital discharges in Catalonia for these age groups (27) and extrapolating the data to the entire population. The estimated reference population aged  $<18$  years of the three hospitals was stable during the study period and varied from 422,666 (31.5% of the Catalan population aged  $<18$  years) in 2012, to 442,032 (31.8% of the Catalan population aged  $<18$  years) in 2013, to 453,419 (32.6% of the Catalan population aged  $<18$  years) in 2014, and 452,927 (32.5% of the Catalan population aged  $<18$  years) in 2015. No other pediatric hospitals in the region were growing or contracting during the study period.

The vaccination coverage of the reference population aged 7 to 59 months was estimated yearly according to the vaccination data obtained in children aged 7 to 59 months treated for causes other than IPD in the study hospitals, as described elsewhere (26). The vaccinated population was defined as children who had received  $\geq 1$  dose of PCV13 or as children who had received  $\geq 2$  doses of PCV13 or  $\geq 1$  dose after 24 months in order to evaluate the possible differences related to the number of PCV13 doses received.

**Statistical analysis.** The incidence rate ratios (IRRs) of IPD were calculated between epidemic and nonepidemic periods. For categorical variables, differences between periods were analyzed using Pearson's chi-square test or Fisher's exact test, and for continuous variables the Student's *t* test was used. The 95% confidence intervals (CIs) were calculated, and *P* values of  $\leq 0.05$  were considered statistically significant. A bilateral distribution was assumed for all *P* values.

Multivariate analysis was performed using nonconditional logistic regression to estimate the association between the severity of cases in epidemic and nonepidemic periods. The following variables were introduced into the model: ICU admission, complications, mechanical ventilation, sequelae at discharge, death, and age. The lack of collinearity of the independent variables was verified using the variance inflation factor (36).

To analyze the impact of PCV13 on the incidence of IPD in children aged 7 to 59 months during influenza epidemic periods, the fraction of IPD prevented in the total period and in the epidemic and nonepidemic periods was calculated using the formula: prevented fraction in the population = (IR in unvaccinated – IR in total population)/IR in unvaccinated (37).

The IR in the unvaccinated population was calculated by dividing the number of unvaccinated IPD cases caused by PCV13 serotypes in children aged 7 to 59 months by the estimated unvaccinated population according to the estimated vaccine coverage published (27) and the reference estimated population in the same age group.

**TABLE 1** Characteristics of cases of invasive pneumococcal disease in epidemic and nonepidemic influenza periods

Variable		Values <sup>a</sup> by period		P Value
		Epidemic influenza	Nonepidemic influenza	
Sex	Female	36 (39.6)	58 (42.0)	0.71
	Male	55 (60.4)	80 (58.0)	
Age in months (mean and SD)		52.02 (36.90)	39.46 (36.97)	0.012
Risk medical conditions	No	89 (97.8)	125 (90.6)	0.032
	Yes	2 (2.2)	13 (9.4)	
≥1 dose of PCV13 (0–4 yr)	No	40 (65.6)	58 (52.7)	0.104
	Yes	21 (34.4)	52 (47.3)	
≥2 dose of PCV13 or ≥1 dose after 24 months (0–4 yr)	No	41 (67.2)	60 (54.5)	0.107
	Yes	20 (32.8)	50 (45.5)	
PCV13 serotypes	No	26 (29.5)	51 (38.1)	0.192
	Yes	62 (70.5)	83 (61.9)	
PCV13 serotypes (unvaccinated cases)	No	16 (23.9)	19 (23.2)	0.919
	Yes	51 (76.1)	63 (76.8)	
PCV13 serotypes (≥1 dose of PCV13)	No	10 (47.6)	32 (62.7)	0.236
	Yes	11 (52.4)	19 (37.7)	
PCV13 serotypes (≥2 doses of PCV13 or ≥1 dose after 24 months)	No	10 (47.6)	31 (63.3)	0.226
	Yes	11 (52.4)	18 (36.7)	
HIS serotypes	No	27 (30.7)	55 (41.0)	0.118
	Yes	61 (69.3)	79 (59.0)	
Serotype 3	No	67 (76.1)	110 (82.1)	0.282
	Yes	21 (23.9)	24 (17.9)	
Serotype 1	No	68 (77.3)	110 (82.1)	0.379
	Yes	20 (22.7)	24 (17.9)	
Serotype 19A	No	80 (90.9)	125 (93.3)	0.517
	Yes	8 (9.1)	9 (6.7)	
Serotype 14	No	85 (96.6)	126 (94.0)	0.396
	Yes	3 (3.4)	8 (6.0)	

<sup>a</sup>Values are *n* (%) unless otherwise indicated. HIS, highly invasive serotypes.

The IR in the total population was calculated by dividing the number of all IPD cases caused by PCV13 serotypes in children aged 7 to 59 months by the estimated population according to the reference estimated population in the same age group.

The analysis was performed using the SPSS v.24 statistical package.

## RESULTS

During the study period, 229 cases of IPD were recorded in persons aged <18 years, of which 71 cases (31.0%) were collected in 2012, 58 (25.3%) in 2013, 44 (19.2%) in 2014, and 56 (24.5%) in 2015; 137 (59.8%) patients were attended by Hospital Sant Joan de Déu, 66 (28.8%) by Hospital Maternoinfantil Vall d'Hebrón, and 26 (11.4%) by Hospital de Nens de Barcelona; 135 (59%) patients were male and 94 (41%) female; and 36.7% (84) of patients were aged <2 years, 38.0% (87) 2 to 4 years, and 25.3% (58) 5 to 17 years (Table 1). The clinical manifestations were the following: pneumonia, 165 cases (72.0%); occult bacteremia, 22 (9.6%); meningitis, 19 (8.3%); musculoskeletal infection, 7 (3.1%); bacteremic mastoiditis, 7 (3.1%); sepsis, 6 (2.6%); bacteremic orbital cellulitis, 2 (0.9%); and pancreatitis, 1 (0.4%). A total of 48.1% of cases (110) were diagnosed by PCR alone and 26.6% (61 cases) by culture alone, and in 25.3% of cases (58), both techniques were positive.

Of the 229 cases recorded, 222 (96.9%) were serotyped; 145 (65.3%) were caused by PCV13-serotypes, of which 20.8% (30 cases) received ≥1 dose of PCV13 and 20% (29 cases) received ≥2 doses of PCV13 or ≥1 dose after 24 months. Of the 77 cases (34.7%) caused by non-PCV13 serotypes, 42 (54.5%) received ≥1 dose of PCV13 and 41 (53.2%) received ≥2 doses of PCV13 or ≥1 dose after 24 months.

A smaller proportion of cases with medical risk conditions were detected during epidemic influenza periods than in nonepidemic periods (2.2% versus 9.4%, *P* = 0.032).

There were no differences in the vaccination status of cases during influenza epidemic and nonepidemic periods according to cases who had received ≥1 dose of PCV13 (*P* = 0.104) and cases who had received ≥2 doses of PCV13 or ≥1 dose after 24 months (*P* = 0.107).



**TABLE 2** Distribution of cases and incidence rates of invasive pneumococcal disease in epidemic and nonepidemic influenza periods according to clinical presentation and age group<sup>a</sup>

Clinical presentation	Age group (yrs)	Values by period				Incidence rate ratio (95% CI)	P value
		Epidemic influenza		Nonepidemic influenza			
		n	IR	n	IR		
Meningitis	<2	6	0.09	8	0.03	3.07 (0.88–10.10)	0.051
	2–4	0	0.00	4	0.01	NC	NC
	5–17	0	0.00	1	0.00	NC	NC
	Total	6	0.01	13	0.00	1.891 (0.589–5.333)	0.214
Pneumonia	<2	13	0.20	31	0.11	1.72 (0.825–3.38)	0.113
	2–4	34	0.24	39	0.07	3.572 (2.187–5.808)	<0.001
	5–17	26	0.05	22	0.01	4.843 (2.639–8.964)	<0.001
	Total	73	0.10	92	0.03	3.251 (2.358–4.469)	<0.001
Occult bacteremia	<2	1	0.02	13	0.05	0.315 (0.007–2.099)	0.255
	2–4	2	0.01	3	0.01	2.732 (0.228–23.847)	0.31
	5–17	1	0.00	2	0.00	2.049 (0.035–39.355)	0.581
	Total	4	0.01	18	0.01	0.911 (0.224–2.764)	0.909
Other forms	<2	2	0.03	10	0.04	0.820 (0.087–3.846)	0.858
	2–4	3	0.02	2	0.00	6.146 (0.704–73.589)	0.061
	5–17	3	0.01	3	0.00	4.098 (0.549–30.593)	0.11
	Total	8	0.01	15	0.01	2.185 (0.802–5.491)	0.089
Total	<2	22	0.33	62	0.23	1.454 (0.851–2.399)	0.14
	2–4	39	0.27	48	0.08	3.329 (2.125–5.188)	<0.001
	5–17	30	0.05	28	0.01	4.390 (2.535–7.626)	<0.001
	Total	91	0.13	138	0.05	2.702 (2.050–3.546)	<0.001

<sup>a</sup>NC, not calculable; IR, incidence rate (per 10<sup>5</sup> person-weeks).

There were no differences in demographic or risk factors between vaccinated and unvaccinated cases in the same epidemic and nonepidemic influenza period, either in cases who had received  $\geq 1$  dose of PCV13 or in cases who had received  $\geq 2$  doses of PCV13 or  $\geq 1$  dose after 24 months (see Table S1 and S2 in the supplemental material).

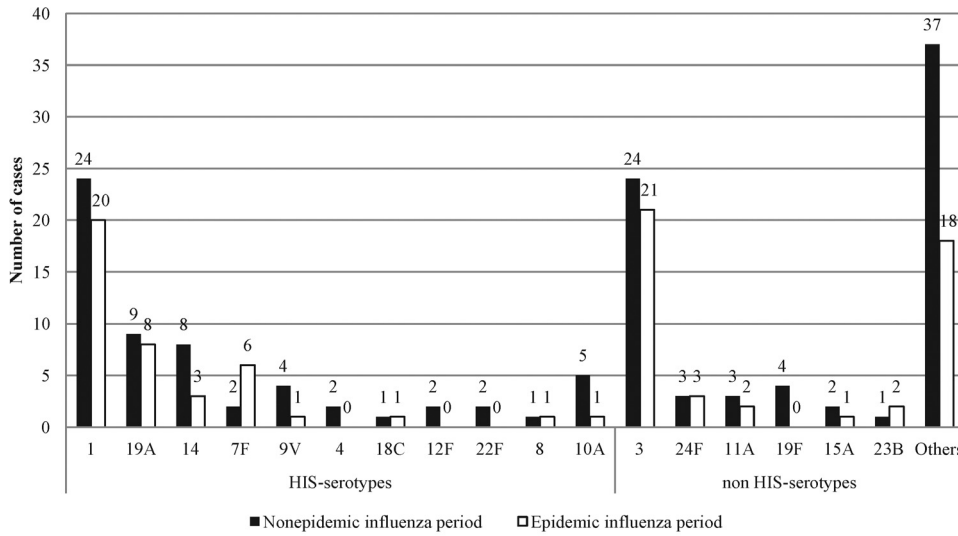
**Incidence of IPD in epidemic and nonepidemic influenza periods.** Of the 209 weeks of the study period, 41 weeks corresponded to influenza epidemic periods (weeks 4 to 13 in 2012, 3 to 12 in 2013, 2 to 10 in 2014, and 3 to 14 in 2015). The incidence of IPD per person-week was greater in influenza epidemic periods (0.13 cases/10<sup>5</sup> person-weeks) than in nonepidemic periods (0.05 cases/10<sup>5</sup> person-weeks; IRR, 2.7; 95% CI, 2.05 to 3.55;  $P < 0.001$ ). Significant differences were found in the 2- to 4-year (IRR, 3.33; 95% CI, 2.12 to 5.19;  $P < 0.001$ ) and 5- to 17-year (IRR, 4.39; 95% CI, 2.53 to 7.63;  $P < 0.001$ ) age groups but not in the <2-year age group (Table 2).

The IR of pneumonia increased during influenza epidemic periods, both globally (IRR, 3.25; 95% CI, 2.36 to 4.47;  $P < 0.001$ ) and in the 2- to 4-year (IRR, 3.57; 95% CI, 2.19 to 5.80;  $P < 0.001$ ) and 5- to 17-year (IRR, 4.84; 95% CI, 2.64 to 8.86;  $P < 0.001$ ) age groups.

**Distribution of serotypes in epidemic and nonepidemic influenza periods.** The most frequently found serotypes were serotype 3 (45 cases, 19.7%), serotype 1 (44 cases 19.2%), serotype 19A (17 cases, 7.4%), and serotype 14 (11 cases, 4.8%) (Fig. 1). The distribution of these serotypes was similar in both periods (Table 1).

There were no significant differences in the distribution of vaccine and nonvaccine serotypes between epidemic and nonepidemic periods in the total cases (odds ratio [OR], 1.46; 95% CI, 0.82 to 2.60;  $P = 0.192$ ), in unvaccinated cases (OR, 0.96; 95% CI, 0.45 to 2.06;  $P = 0.919$ ), in cases with  $\geq 1$  doses of PCV13 (OR, 1.85; 95% CI, 0.66 to 5.17;  $P = 0.236$ ), and in cases with  $\geq 2$  doses of PCV13 or  $\geq 1$  dose after 24 months (OR, 1.89; 95% CI, 0.67 to 5.33;  $P = 0.226$ ) (Table 1). In 2015, the proportion of IPD cases caused by nonvaccine serotypes increased with respect to 2012 (54.7% versus 22.9%; OR, 4.08; 95% CI, 1.87 to 8.87;  $P = 0.001$ ) in influenza epidemic

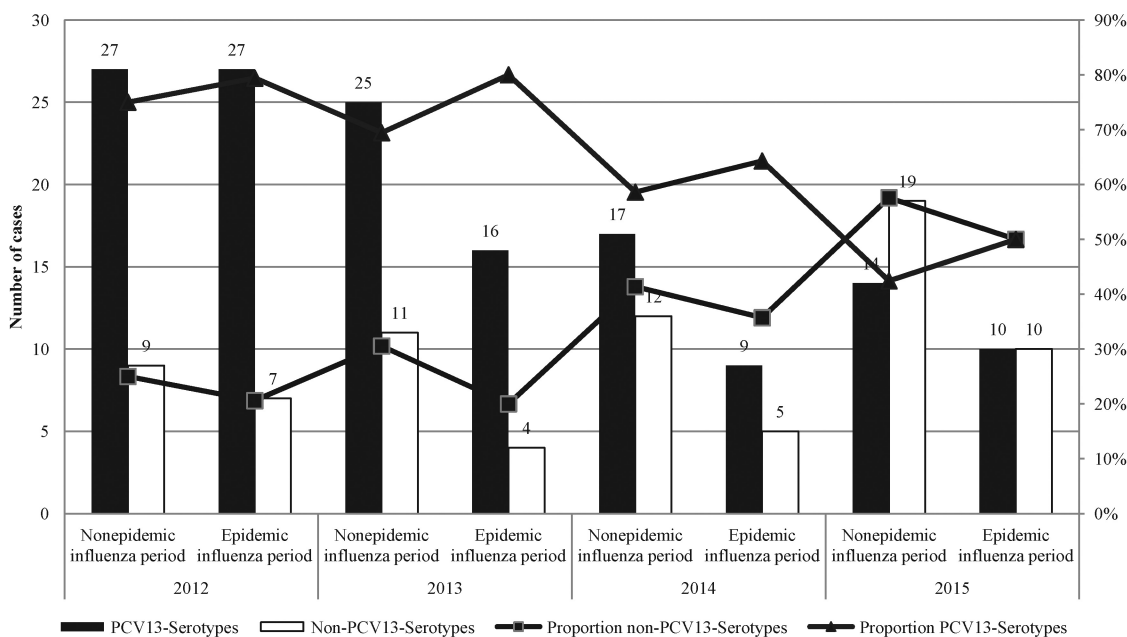




**FIG 1** Distribution of HIS and non-HIS serotypes causing invasive pneumococcal disease in epidemic and nonepidemic influenza periods. HIS, *n* = 222; "Others," nonepidemic influenza period: 24 (2), 27 (1), 31 (2), 12F/A/44/46 (2), 16F (2), 24A (2), 33F (2), 6A/C (2), 6B (2), 38 (1), 15B (1), 25F (1), 35B (1), 35F (1), and 6A (1); Other nonvaccine serotypes (14); Others epidemic influenza period: 27 (1), 13 (1), 19B/F/C (1), 23A (1), and 23F (1); Other nonvaccine serotypes (13).

periods (50.0% versus 20.6%; OR, 3.86; 95% CI, 1.15 to 12.91; *P* = 0.025) and nonepidemic periods (75.6% versus 25%; OR, 4.07; 95% CI, 1.46 to 11.32; *P* = 0.006) (Fig. 2).

The proportion of IPD-causing HIS-serotypes was slightly higher in epidemic influenza periods (69.3% versus 59.0%; OR, 1.57; 95% CI, 0.89 to 2.77; *P* = 0.118) (Table 1). The increase in the incidence of IPD per person/week during epidemic and nonepidemic periods was observed in both HIS and non-HIS serotypes (IRR, 3.164; 95% CI, 2.227 to 4.475; *P* < 0.001 and IRR, 2.012; 95% CI, 1.220 to 3.244; *P* = 0.005, respectively) (Table 3). There were no variations in the proportion of cases caused by HIS serotypes



**FIG 2** Distribution of vaccine and nonvaccine serotypes causing invasive pneumococcal disease according to year and nonepidemic and epidemic influenza periods.

**TABLE 3** Distribution of HIS and non-HIS serotypes causing invasive pneumococcal disease in epidemic and nonepidemic influenza periods according to clinical presentation<sup>a</sup>

Serotype	Clinical presentation	Values by period				Incidence rate ratio (95% CI)	P value
		Epidemic influenza		Nonepidemic influenza			
		n	IR	n	IR		
HIS	Meningitis	1	0.001	3	0.001	1.366 (0.026–17.11)	0.757
	Pneumonia	56	0.078	65	0.022	3.530 (2.425–5.126)	<0.001
	Occult bacteremia	1	0.001	6	0.002	0.683 (0.015–5.629)	0.804
	Other	3	0.004	5	0.002	2.459 (0.382–12.637)	0.248
	Total	61	0.085	79	0.027	3.164 (2.227–4.475)	<0.001
Non-HIS	Meningitis	4	0.006	10	0.007	1.639 (0.375–5.683)	0.410
	Pneumonia	15	0.021	24	0.008	2.561 (1.249–5.086)	0.007
	Occult bacteremia	3	0.004	12	0.004	1,024 (0.186–3.796)	0.925
	Other	5	0.007	9	0.003	2.276 (0.599–7.564)	0.162
	Total	27	0.037	55	0.019	2.012 (1.220–3.244)	0.005

<sup>a</sup>HIS, highly invasive serotypes; IR, incidence rate (per 10<sup>5</sup> person-weeks).

during influenza and noninfluenza epidemic periods in the following different age groups <2 years (42.4% versus 55.0%; OR, 1.62; 95% CI, 0.54 to 4.61;  $P = 0.471$ ), 2 to 4 years (71.8% versus 68.1%; OR, 1.19; 95% CI, 0.47 to 3.02;  $P = 0.89$ ), and 5 to 17 years (75.9% versus 78.6%; OR, 0.85; 95% CI, 0.25 to 2.96;  $P = 0.94$ ).

There were no differences in the proportion of cases with medical conditions and HIS/non-HIS serotypes globally (5.0% versus 9.8%;  $P = 0.173$ ) in epidemic influenza periods (1.6% versus 3.7%;  $P = 0.522$ ) and in nonepidemic influenza periods (7.6% versus 12.7%;  $P = 0.323$ ).

**IPD severity in epidemic and nonepidemic influenza periods.** ICU admission was required by 15.4% of cases during influenza epidemic periods and 22.5% in nonepidemic periods (aOR, 0.31; 95% CI, 0.12 to 0.80;  $P = 0.02$ ) (Table 4). However, the proportions of cases with in-hospital complications and sequelae at discharge/death were higher during epidemic than nonepidemic periods, namely, 75.8% versus 55.8% (aOR, 2.00; 95% CI, 1.06 to 3.77;  $P = 0.03$ ) and 22% versus 8.7% (aOR, 3.38; 95% CI, 1.37 to 8.29;  $P = 0.01$ ), respectively. Cases of pneumonia with sequelae at discharge/death were associated with influenza epidemic periods (aOR, 3.70; 95% CI, 1.26 to 10.86;  $P = 0.02$ ).

There was an association between IPD cases due to HIS serotypes and sequelae at discharge/death during influenza epidemic periods (aOR, 4.88; 95% CI, 1.57 to 15.18;  $P = 0.006$ ).

The severity of IPD caused by non-HIS serotypes showed no significant differences between epidemic and nonepidemic influenza periods.

**Impact of PCV13 on the incidence of IPD during epidemic influenza periods.**

During the study period, there was an increase both in vaccination coverage in children aged 7 to 59 months and in the prevented fraction for the population (PFp) of IPD in children aged 7 to 59 months (Fig. 3). When the vaccinated population was considered children who had received  $\geq 1$  dose of PCV13, the vaccination coverage was 48.3% in 2012, 64.0% in 2013, 68.5% in 2014, and 74.6% in 2015 (63.6% vaccination coverage for all the study period), and the PFp was 30.5% in 2012, 44.6% in 2013, 53.1% in 2014, and 55.0% in 2015 (49.4% for all the study period). When the vaccinated population was considered children who had received  $\geq 2$  doses of PCV13 or  $\geq 1$  after 24 months, the vaccination coverage was 47.6% in 2012, 59.6% in 2013, 66.9% in 2014, and 70.3% in 2015 (63.1% vaccination for all the study period), and the PFp was 31.9% in 2012, 37.8% in 2013, 50.7% in 2014, and 55.5% in 2015 (48.0% for all the study period) (Fig. 3).

Considering the vaccinated population as children who had received  $\geq 1$  dose of PCV13, the PFp of IPD associated with PCV13 vaccination in children was higher during influenza epidemic periods, both globally (3.47% more in epidemic periods than in

**TABLE 4** Severity of invasive pneumococcal disease in persons aged <18 years in epidemic and nonepidemic influenza periods according to clinical presentation and invasive power of serotypes<sup>a</sup>

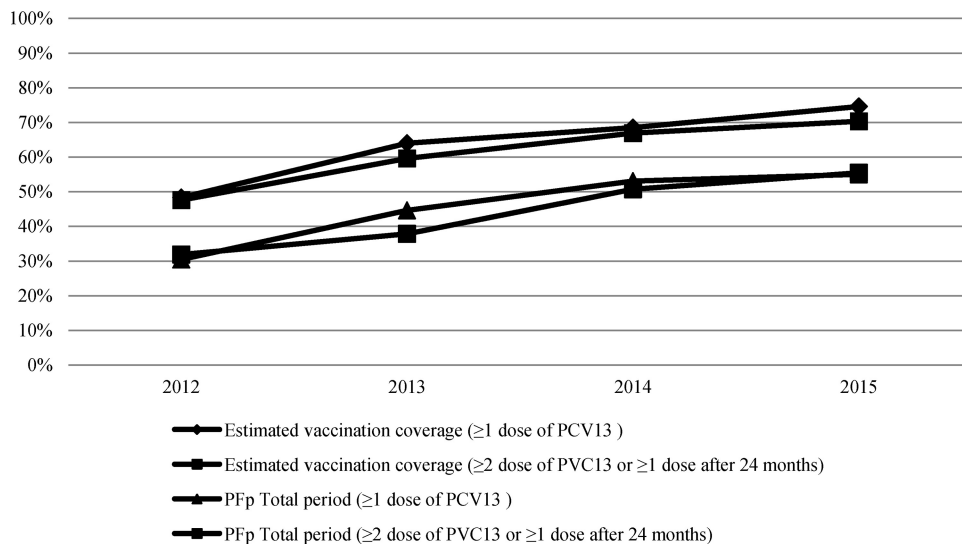
Severity according to category	No. (%) of cases by period		Crude OR (95% CI)	P value	Adjusted OR (95% CI)	P value
	Epidemic influenza	Nonepidemic influenza				
Total cases	91	138				
ICU	14 (15.4)	31 (22.5)	0.63 (0.31–1.26)	0.19	0.31 (0.12–0.80)	0.02
Complication	69 (75.8)	77 (55.8)	2.48 (1.38–4.46)	0.002	2.00 (1.06–3.77)	0.03
Mechanical ventilation	5 (5.5)	5 (3.6)	1.55 (0.43–5.50)	0.50	3.24 (0.68–15.37)	0.14
Sequelae at discharge/death <sup>b</sup>	20 (22.0)	12 (8.7)	2.96 (1.37–6.40)	0.006	3.38 (1.37–8.29)	0.01
Pneumonia	73	92				
ICU	8 (11.0)	13 (14.1)	0.75 (0.29–1.91)	0.54	0.33 (0.09–1.27)	0.16
Complications	62 (84.9)	66 (71.7)	2.22 (1.01–4.87)	0.047	1.91 (0.84–4.36)	0.08
Mechanical ventilation	4 (5.5)	3 (3.3)	1.72 (0.37–7.94)	0.49	4.44 (0.58–33.92)	0.15
Sequelae at discharge/death	15 (20.5)	6 (6.5)	3.71 (1.36–10.11)	0.01	3.70 (1.26–10.86)	0.02
Other nonpneumonia	18	46				
ICU	6 (33.3)	18 (39.1)	0.78 (0.25–2.44)	0.67	0.26 (0.04–1.59)	0.14
Complications	7 (38.9)	11 (23.9)	2.02 (0.63–6.49)	0.23	2.96 (0.40–21.89)	0.29
Mechanical ventilation	1 (5.6)	2 (4.3)	1.29 (0.11–15.22)	0.84	1.27 (0.08–20.18)	0.86
Sequelae at discharge/death	5 (27.8)	6 (13.0)	2.56 (0.67–9.81)	0.17	2.46 (0.38–16.01)	0.34
HIS serotypes	61	79				
ICU	7 (11.5)	15 (19.0)	0.55 (0.21–1.45)	0.55	0.25 (0.06–0.98)	0.05
Complications	53 (86.9)	55 (69.6)	2.89 (1.19–7.00)	0.02	2.20 (0.87–5.57)	0.09
Mechanical ventilation	3 (4.9)	3 (3.8)	1.31 (0.25–6.73)	0.75	3.56 (0.41–31.13)	0.25
Sequelae at discharge/death	16 (26.2)	6 (7.6)	4.33 (1.58–11.87)	0.004	4.88 (1.57–15.18)	0.006
Non-HIS serotypes	27	55				
ICU	6 (22.2)	16 (29.1)	0.70 (0.27–2.05)	0.70	0.46 (0.11–2.01)	0.30
Complications	15 (55.6)	21 (38.2)	2.02 (0.79–5.15)	0.14	2.12 (0.73–6.20)	0.17
Mechanical ventilation	2 (7.4)	2 (3.6)	2.12 (0.28–15.93)	0.46	2.84 (0.28–28.79)	0.38
Sequelae at discharge/death	3 (11.1)	6 (10.9)	1.02 (0.24–4.44)	0.98	0.98 (0.17–5.60)	0.98

<sup>a</sup>HIS, highly invasive serotypes; ICU, intensive care unit.

<sup>b</sup>Pulmonary (19), neurological (6), hearing loss (2), deaths (2), venous thrombosis (1), and hypertension (1).

nonepidemic periods) and in the 7- to 23-month and the 24- to 59-month age groups (4.18% and 3.79%, respectively).

Pneumonia showed the greatest difference between epidemic and nonepidemic periods; the PFp during epidemic periods compared with nonepidemic periods was



**FIG 3** Evolution of estimated vaccination coverage and prevented fraction in the population during the study period in children aged 7 to 59 months.

7.20% higher in children aged 7 to 59 months, 5.03% higher in children aged 7 to 23 months, and 8.91% higher in children aged 24 to 59 months (Table 5).

Considering the vaccinated population as children who had received  $\geq 2$  doses of PCV13 or  $\geq 1$  after 24 months, the PFp of IPD in children aged 7 to 59 months associated with PCV13 vaccination was higher during influenza epidemic periods (9.17% more in epidemic periods than in nonepidemic periods) and in the 7- to 23-month and the 24- to 59-month age groups (10.59% and 9.64%, respectively).

Meningitis only showed differences in the PFp between epidemic and nonepidemic periods in the 7- to 59-month group (22.62% more in epidemic periods than in nonepidemic periods).

Pneumonia showed differences between epidemic and nonepidemic periods; the PFp during epidemic periods compared with nonepidemic periods was 17% higher globally, 10.17% higher in children aged 7 to 23 months, and 25.20% higher in children aged 24 to 59 months (Table 6).

The differences in the PFp of IPD in children aged 7 to 59 months associated with PCV13 vaccination between epidemic and nonepidemic periods were higher, both globally, in pneumonia and in all age groups, when the vaccinated population was considered children who had received  $\geq 2$  doses of PCV13 or  $\geq 1$  after 24 months.

## DISCUSSION

This study highlights the increase in the incidence of IPD in persons aged  $< 18$  years in influenza epidemic periods. Stratification by age showed the association was strongest in children aged 2 to 4 years and especially in the 5- to 17-year age group, but there was no significant association in children aged  $< 2$  years. The annual PIDIRAC reports show that during all the years studied, the highest cumulative incidence of influenza infections was in the  $< 4$ -year age group (35). Some reports have found an association between IPD and influenza (2, 13) but without having specifically analyzed children aged  $< 2$  years. Weinberger et al. (12) found a strong association between the circulation of the respiratory syncytial virus (RSV) and episodes of IPD in children aged  $< 2$  years. During the period 2012 to 2015, the reports published by the Microbiological Notification System of Catalonia (38) showed that 84.9% of cases of RSV infection recorded in Catalonia were in children aged  $< 2$  years and that the peak of RSV activity preceded the influenza epidemic. The temporal coincidence between RSV and IPD in children aged  $< 2$  years could explain the high IR observed during nonepidemic influenza periods, which was much higher than the total IR in that period (0.23 cases/ $10^5$  person-weeks versus 0.05 cases/ $10^5$  person-weeks), and why when considering epidemic influenza periods and nonepidemic periods in this age group we found no significant differences.

McCullers et al. (19) using animal models and Grijalva et al. (3) in a case-control study showed that the influenza virus increases the transmission of *S. pneumoniae* and, therefore, the risk of nasopharyngeal acquisition, a step prior to the development of IPD. However, although we found a higher IR of IPD in epidemic periods globally, the increase in the incidence during epidemic influenza periods compared with nonepidemic periods was only statistically significant for the clinical presentation of pneumonia. Weinberger et al. (39) and Ben-Shimol et al. (40) postulated that viral respiratory infection increases susceptibility to pneumonia, an approach that would coincide with our results.

The great variability in IPD-causing serotypes found in our study, with none being predominant during the epidemic or nonepidemic influenza periods, suggests there is no relationship between the influenza virus and a specific *S. pneumoniae* serotype. Likewise, during the study period, the subtypes of viruses that cause influenza epidemics have varied (35), although a specific relationship with certain viral subtypes cannot be ruled out. Launes et al. (20) found a significant decrease in the proportion of IPD caused by serotype 1 during the 2009 pandemic; however, in the subsequent seasonal influenza season, caused by the same influenza A subtype virus, *S. pneumoniae* sero-

**TABLE 5** Prevented fraction of invasive pneumococcal disease caused by serotypes included in the PCV13 in epidemic and nonepidemic influenza periods according to clinical presentation and age in children aged 7 to 59 months<sup>a</sup>

Clinical presentation	Age group (months)	Values by total period			Values by epidemic influenza periods			Values by nonepidemic influenza periods			Difference in PFP in epidemic and nonepidemic periods (%)
		IR in unvaccinated population	IR in total population	Prevented fraction in the population (%)	IR in unvaccinated population	IR total population	Prevented fraction in the population (%)	IR in unvaccinated population	IR total population	Prevented fraction in the population (%)	
Meningitis	7-23	0.031	0.009	71.4	0.053	0.015	71.4	0.026	0.007	71.4	0.00
	24-59	0.000	0.000	NC	0.000	0.000	NC	0.000	0.000	NC	NC
	Total	0.008	0.003	63.6	0.013	0.005	63.6	0.006	0.002	63.6	0.00
Pneumonia	7-23	0.207	0.083	60.0	0.369	0.136	63.2	0.167	0.070	58.2	5.03
	24-59	0.137	0.078	43.1	0.358	0.188	47.5	0.083	0.051	38.6	8.91
	Total	0.152	0.080	47.6	0.354	0.172	51.5	0.102	0.057	44.3	7.20
Occult bacteremia	7-23	0.031	0.009	71.4	0.000	0.000	NC	0.039	0.011	71.4	NC
	24-59	0.014	0.005	61.1	0.018	0.007	61.1	0.013	0.005	61.1	0.00
	Total	0.018	0.007	63.6	0.013	0.005	63.6	0.019	0.007	63.6	0.00
Other forms	7-23	0.021	0.009	57.1	0.053	0.015	71.4	0.013	0.007	42.8	28.60
	24-59	0.004	0.003	22.2	0.000	0.007	NC	0.004	0.002	61.1	NC
	Total	0.008	0.005	39.3	0.013	0.010	27.2	0.006	0.003	45.4	-18.20
Total	7-23	0.290	0.110	62.2	0.475	0.166	65.0	0.245	0.096	60.9	4.18
	24-59	0.155	0.086	44.3	0.376	0.202	46.3	0.101	0.058	42.5	3.79
	Total	0.185	0.094	49.4	0.393	0.191	51.5	0.134	0.070	48.0	3.47

<sup>a</sup>Children were considered vaccinated if they had received  $\geq 1$  dose of PCV13. NC, not calculable; IR, incidence rate (per 10<sup>5</sup> person-weeks); PFP, prevented fraction in the population.

**TABLE 6** Prevented fraction of invasive pneumococcal disease caused by serotypes included in the PCV13 in epidemic and nonepidemic influenza periods according to clinical presentation and age in children aged 7 to 59 months<sup>a</sup>

Clinical presentation	Age group (months)	Values by total period			Values by epidemic influenza periods			Values by nonepidemic influenza periods			Difference in PFP in epidemic and nonepidemic periods (%)
		IR in unvaccinated population	IR in total population	Prevented fraction in the population (%)	IR in unvaccinated population	IR in total population	Prevented fraction in the population (%)	IR in unvaccinated population	IR in total population	Prevented fraction in the population (%)	
Meningitis	7-23	0.009	0.003	67.9	0.000	0.000	NC	0.011	0.004	67.9	NC
	24-59	0.000	0.000	NC	0.000	0.000	NC	0.000	0.000	NC	NC
	Total	0.008	0.001	87.7	0.013	0.000	100.0	0.006	0.001	81.6	22.62
Pneumonia	7-23	0.166	0.074	55.4	0.329	0.136	58.7	0.126	0.059	53.3	10.17
	24-59	0.133	0.078	41.2	0.347	0.188	45.7	0.080	0.051	36.5	25.20
	Total	0.144	0.077	46.9	0.349	0.172	50.8	0.095	0.054	43.4	17.00
Occult bacteremia	7-23	0.018	0.006	67.9	0.000	0.000	NC	0.023	0.007	67.9	NC
	24-59	0.014	0.005	59.8	0.017	0.007	59.8	0.013	0.005	59.8	0.00
	Total	0.015	0.006	63.1	0.013	0.005	63.1	0.016	0.006	63.1	0.00
Other forms	7-23	0.009	0.006	35.8	0.047	0.015	67.9	0.000	0.004	NC	NC
	24-59	0.003	0.003	19.6	0.000	0.007	NC	0.004	0.002	59.8	NC
	Total	0.005	0.004	26.2	0.013	0.010	26.2	0.003	0.002	26.2	0.00
Total	7-23	0.203	0.089	56.2	0.376	0.151	59.9	0.161	0.074	54.1	10.59
	24-59	0.150	0.086	42.4	0.364	0.202	44.5	0.097	0.058	40.6	9.64
	Total	0.167	0.087	48.0	0.375	0.186	50.4	0.117	0.063	46.1	9.17

<sup>a</sup>Children were considered vaccinated if they had received  $\geq 2$  doses of PCV13 or  $\geq 1$  dose after 24 months. NC, not calculable; IR, incidence rate (per 10<sup>5</sup> person-weeks); PFP, prevented fraction in the population.

type 1 was detected in the same proportion as before. The results of our study support the idea that the circulation of influenza viruses is not related to the incidence of vaccine or nonvaccine serotypes.

Some reports (17, 18) indicate that influenza virus infection has a greater effect on non-HIS serotypes. This would mean that the influenza virus increases the susceptibility of the host to bacterial infections. Thus, while HIS serotypes could cause IPD under any circumstances, non-HIS serotypes would increase the ability to produce IPD in the presence of the influenza virus. Weinberger et al. (18) found this same association only in adults without comorbidities. A Catalan study made before the introduction of the 13-valent vaccine found an association between IPD caused by non-HIS serotypes and coinfection with different respiratory viruses (17). Grijalva et al. (3) reported that the acquisition of a new *S. pneumoniae* serotype after influenza virus infection was observed in patients previously colonized by another serotype. In our study, although the proportion of IPD-causing HIS serotypes was higher in epidemic than in nonepidemic influenza periods, there was no statistically significant association and the increase in incidence during influenza epidemic periods was significant for both HIS and non-HIS serotypes. The fact that our study did not permit an analysis of the previous state of colonization or accurate determination of the antecedents of infection by the influenza virus or other respiratory viruses may have cushioned the specific effect of the influenza virus on IPD cases caused by non-HIS-serotypes. Likewise, serotype 3 was considered a non-HIS serotype, whereas we considered it as an HIS-serotype, as indicated by authors who evaluated the invasive capacity of the serotype, including episodes detected only by PCR with negative culture (33) and after the introduction of PCV13 (34). Other authors (14, 15) also found no differences between the serotypes causing IPD during the epidemic and nonepidemic influenza periods in children or adults, which suggests that the interaction between the influenza virus and the various pneumococcal serotypes is complex and depends on numerous factors and not only on the invasive capacity of the serotype.

Four parameters were taken into account to assess the severity of IPD, namely, ICU stay, in-hospital complications, mechanical ventilation, and sequelae at discharge/death. ICU stay was associated with nonepidemic influenza periods due to the greater number of episodes of meningitis and sepsis recorded, as opposed to epidemic periods, in which most cases were pneumonia. Cases with in-hospital complications and sequelae at discharge were much more frequent during epidemic periods. The low prevalence of medical risk conditions in cases during influenza epidemic periods and the fact that there were no significant differences between the serotypes causing IPD according to influenza activity suggest that the increase in severity in cases of IPD during epidemic periods could be due to a synergistic effect between *S. pneumoniae* and the influenza virus (41, 42). In the adjusted model, in cases of pneumonia, although an association between epidemic influenza periods and sequelae at discharge/death was found, no association was observed between complications and influenza epidemic periods. This could be due to the large increase in serotypes causing pneumonia with empyema or pleural effusion and necrotizing pneumonia recorded in recent years (7, 43), which have resulted in complicated pneumonia being the most frequent clinical presentation in both periods. The severity of cases of IPD caused by HIS serotypes was associated with influenza activity only in the proportion of cases with sequelae at discharge/death.

Our results show that the PFp of IPD in children aged 7 to 59 months associated with the PCV13 vaccine was higher during epidemic periods than in nonepidemic periods, with the greatest difference being in cases of pneumonia. These results seem logical because influenza virus infection may increase the incidence of pneumococcal pneumonia caused by both vaccine and nonvaccine serotypes. There are few studies on the impact of PCV13 in the influenza season. McGarry et al. (5) calculated, in a predictive model, that PCV13 would prevent 63% to 67% of cases of invasive pneumococcal pneumonia, depending on the incidence of the influenza virus during the epidemic period. This percentage is higher than our results suggest, which may be because our



vaccination coverage for the entire study period was only around 63% in children aged 7 to 59 months since PCV13 was not administered systematically and was not financed by the Catalan health system until July 2016. The results shown in Fig. 3, although the number of cases analyzed separately each year was low, support this idea since they show that the PFP increases in tandem with the vaccination coverage. Another possible explanation would be the low effectiveness of PCV13 against serotype 3 (26), the most frequent serotype during influenza epidemic periods, together with the increase in the proportion of nonvaccine serotypes.

Domínguez et al. (26) found that the vaccination effectiveness of PCV13 in preventing IPD was higher when  $\geq 2$  doses of PCV13 or  $\geq 1$  after 24 months were administered than when  $\geq 1$  dose of PCV13 was administered (90.0% versus 75.8%). In our study, the differences in the PFP found between epidemic and nonepidemic periods were higher when the vaccinated population was considered children who had received  $\geq 2$  doses of PCV13 or  $\geq 1$  after 24 months compared with children who had received  $\geq 1$  dose of PCV13. It is plausible to assume that in epidemic influenza periods, when the incidence of IPD increases, the protective effect of PCV13 will be higher when administering a vaccine schedule that offers greater effectiveness than in nonepidemic influenza periods, when this environment factor that favors the acquisition of IPD does not exist.

Although vaccination coverages have increased throughout the study period, Loughlin et al. (44) postulate that evidence of indirect protection in unimmunized children was observed as vaccine uptake reached 75% in the target community. The estimated vaccination coverage in our study was  $< 75\%$  during the 4 years; therefore, we can assume that the PFP found is the result of direct protection but will also increase due to herd immunity after the introduction of the PCV13 vaccine into the Catalan vaccination schedule.

This study has some limitations. First, unlike other studies (3), the carrier status of *S. pneumoniae* before the development of IPD was not known. Likewise, there was no microbiological confirmation of prior infection by the influenza virus or other respiratory viruses. However, in the periods considered epidemic, there was evidence of an increase in the circulation of influenza viruses with respect to other respiratory viruses (33), so it seems plausible to assume that some IPD cases in the epidemic period appeared after influenza infection.

In conclusion, our results show that during influenza epidemic periods the incidence of all forms of IPD in persons aged  $< 18$  years increased, especially after the age of 2 years and in cases of pneumonia. No association was observed between the increase in incidence rates of IPD in influenza epidemic periods and any specific pneumococcal serotype. In influenza epidemic periods, increases were observed in complications and in sequelae at discharge in cases of IPD.

The PFP of cases of IPD caused by PCV13 serotypes was higher in influenza epidemic periods than in nonepidemic periods, and this difference increased when  $\geq 2$  doses of PCV13 or  $\geq 1$  after 24 months were administered. The increase in vaccination coverage after the addition of PCV13 to the vaccines financed by the Catalan health system will probably increase the PFP in both epidemic and nonepidemic influenza periods, although the increase could be limited by the large proportion of cases of IPD caused by serotype 3 and, possibly, by an increase in other nonvaccine serotypes. Therefore, it remains essential to monitor IPD in order to detect possible serotype replacement after PCV13 vaccination.

#### SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/JCM.00363-19>.

**SUPPLEMENTAL FILE 1**, PDF file, 0.2 MB.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Fernando Moraga-Llop reports participation in expert meetings and symposiums organized by Pfizer and GSK. Carmen Muñoz-Almagro reports grants from Pfizer



laboratories and personal fees from GSK Laboratories, outside the submitted work. Magda Campins reports participation as an investigator in clinical trials from GSK and in expert meetings and symposiums organized by Pfizer and GSK. Juan José García-García reports personal fees from Pfizer. All other authors declare no competing interests.

This work was supported by the National Plan of R+D+I 2008 to 2011 and ISCIII Sub-Directorate General for Evaluation and Promotion of Research (projects PI11/02081 and PI11/2345) and cofunded by European Regional Development Fund (ERDF) and the Catalan Agency for the Management of Grants for University Research (AGAUR grants 2017/SGR 1342, 2014/SGR 505, and 2014/SGR 0742).

The members of the Working Group of Projects PI11/02081 and PI11/2345 are Conchita Izquierdo, Pilar Ciruela, Sergi Hernández (Public Health Agency of Catalonia), Àngela Dominguez, Luis Salleras, Nuria Soldevila (University of Barcelona), Anna Solé-Ribalta, Carmen Muñoz-Almagro, Cristina Esteva, Johanna Martínez-Osorio, Juan José García-García, Mariona F. de Sevilla, (Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, University of Barcelona, Barcelona), Ana María Planes, Fernando Moraga-Llop, Gemma Codina, Magda Campins, Sebastià González-Peris, Sonia Uriona, (Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona), and Alvaro Díaz (Hospital de Nens, Barcelona).

## REFERENCES

- World Health Organization. 2014. Pneumococcal disease. World Health Organization, Geneva, Switzerland. <https://www.who.int/immunization/diseases/pneumococcal/en/>.
- Ciruela P, Broner S, Izquierdo C, Hernández S, Muñoz-Almagro C, Pallarés R, Jané M, Domínguez A. 2016. Invasive pneumococcal disease rates linked to meteorological factors and respiratory virus circulation (Catalonia, 2006–2012). *BMC Public Health* 16:400. <https://doi.org/10.1186/s12889-016-3061-6>.
- Grijalva CG, Griffin MR, Edwards KM, Williams JV, Gil AI, Verastegui H, Hartinger SM, Vidal JE, Klugman KP, Lanata CF. 2014. The role of influenza and parainfluenza infections in nasopharyngeal pneumococcal acquisition among young children. *Clin Infect Dis* 58:1369–1376. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu148>.
- Ampofo K, Herbener A, Blaschke AJ, Heyrend C, Poritz M, Korgenski K, Rolfs R, Jain S, Carvalho M, Pimenta FC, Daly J, Mason EO, Byington CL, Pavia AT. 2010. Association of 2009 pandemic influenza A (H1N1) infection and increased hospitalization with parapneumonic empyema in children in Utah. *Pediatr Infect Dis J* 29:905–909. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181df2c70>.
- McGarry LJ, Gilmore KE, Rubin JL, Klugman KP, Strutton DR, Weinstein MC. 2013. Impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) in a pandemic similar to the 2009 H1N1 in the United States. *BMC Infect Dis* 13:229. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-229>.
- Kim PE, Musher DM, Glezen WP, Barradas MCR, Nahm WK, Wright CE. 1996. Association of invasive pneumococcal disease with season, atmospheric conditions, air pollution, and the isolation of respiratory viruses. *Clin Infect Dis* 22:100–106. <https://doi.org/10.1093/clinids/22.1.100>.
- Ampofo K, Bender J, Sheng X, Korgenski K, Daly J, Pavia AT, Byington CL. 2008. Seasonal invasive pneumococcal disease in children: Role of preceding respiratory viral infection. *Pediatrics* 122:229–237. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-3192>.
- Ellis GT, Davidson S, Crotta S, Branzk N, Papayannopoulos V, Wack A. 2015. TRAIL+ monocytes and monocyte-related cells cause lung damage and thereby increase susceptibility to influenza–Streptococcus pneumoniae coinfection. *EMBO Rep* 16:1203–1218. <https://doi.org/10.15252/embr.201540473>.
- Cooper GE, Pounce ZC, Wallington JC, Bastidas-Legarda LY, Nicholas B, Chidomere C, Robinson EC, Martin K, Tocheva AS, Christodoulides M, Djukanovic R, Wilkinson TM, Staples KJ. 2016. Viral inhibition of bacterial phagocytosis by human macrophages: redundant role of CD36. *PLoS One* 11:e0163889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163889>.
- Hoffmann J, Machado D, Terrier O, Pouzol S, Messaoudi M, Basualdo W, Espínola EE, Guillen RM, Rosa-Calatrava M, Picot V, Bénét T, Endtz H, Russomando G, Paranhos-Baccalà G. 2016. Viral and bacterial coinfection in severe pneumonia triggers innate immune responses and specifically enhances IP-10: a translational study. *Sci Rep* 6:38532. <https://doi.org/10.1038/srep38532>.
- Avadhanula V, Rodríguez CA, Devincenzo JP, Wang Y, Webby RJ, Ulett GC, Adderson EE. 2006. Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner. *J Virol* 80:1629–1636. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.4.1629-1636.2006>.
- Weinberger DM, Klugman KP, Steiner CA, Simonsen L, Viboud C. 2015. Association between respiratory syncytial virus activity and pneumococcal disease in infants: a time series analysis of US hospitalization data. *PLoS Med* 12:e1001776. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001776>.
- Nicoli EJ, Trotter CL, Turner KM, Colijn C, Waight P, Miller E. 2013. Influenza and RSV make a modest contribution to invasive pneumococcal disease incidence in the UK. *J Infect* 66:512–520. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.02.007>.
- Fleming-Dutra KE, Taylor T, Link-Gelles R, Garg S, Nhung MA, Finelli L, Jain S, Shay D, Chaves SS, Baumbach J, Hancock EB, Beall B, Bennett N, Zansky S, Petit S, Yousey-Hindes K, Farley MM, Gershman K, Harrison LH, Ryan P, Lexau C, Lynfield R, Reingold A, Schaffner W, Thomas A, Moore MR. 2013. Effect of the 2009 influenza A (H1N1) pandemic on invasive pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 207:1135–1143. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit008>.
- Nelson GE, Gershman KA, Swerdlow DL, Beall BW, Moore MR. 2012. Invasive pneumococcal disease and pandemic (H1N1) 2009, Denver, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis* 18:208–216. <https://doi.org/10.3201/eid1802.110714>.
- Weinberger DM, Simonsen L, Jordan R, Steiner C, Miller M, Viboud C. 2012. Impact of the 2009 influenza pandemic on pneumococcal pneumonia hospitalizations in the United States. *J Infect Dis* 205:458–465. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir749>.
- Launes C, de-Sevilla MF, Selva L, Garcia-Garcia JJ, Pallares R, Muñoz-Almagro C. 2012. Viral coinfection in children less than five years old with invasive pneumococcal disease. *Pediatr Infect Dis J* 31:650–653. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31824f25b0>.
- Weinberger DM, Harboe ZB, Viboud C, Krause TG, Miller M, Mølbak K, Konradsen HB. 2013. Serotype-specific effect of influenza on adult invasive pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 208:1274–1280. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit375>.
- McCullers JA, McAuley JL, Browall S, Iverson AR, Boyd KL, Henriques Normark B. 2010. Influenza enhances susceptibility to natural acquisition of and disease due to Streptococcus pneumoniae in ferrets. *J Infect Dis* 202:1287–1295. <https://doi.org/10.1086/656333>.
- Launes C, García-García JJ, Triviño M, Peris N, Pallarés R, Muñoz-Almagro C. 2014. Respiratory viruses, such as 2009 H1N1 influenza virus, could trigger temporal trends in serotypes causing pneumococcal disease. *Clin Microbiol Infect* 20:O1088–90. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12744>.

21. European Medicines Agency. 2011. Summary of *Prevenar 7* product characteristics. European Medicines Agency, London, United Kingdom. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000323/WC500041558.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000323/WC500041558.pdf).
22. European Medicines Agency. 2009. Summary of Synflorix product characteristics. European Medicines Agency, London, United Kingdom. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000973/WC500054346.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000973/WC500054346.pdf).
23. European Medicines Agency. 2014. Summary of *Prevenar 13* product characteristics. European Medicines Agency, London, United Kingdom. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/001104/wc500057247.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/001104/wc500057247.pdf).
24. Steens A, Bergsaker MA, Aaberge IS, Rønning K, Vestrheim DF. 2013. Prompt effect of replacing the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine with the 13-valent vaccine on the epidemiology of invasive pneumococcal disease in Norway. *Vaccine* 31:6232–6238. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.032>.
25. Ciruela P, Izquierdo C, Broner S, Hernández S, Muñoz-Almagro C, Pallarés R, Jane M. 2016. Epidemiology of invasive pneumococcal disease in Catalonia, 2012–2014 report. *Agència de Salut Pública de Catalunya, Barcelona, Spain*.
26. Domínguez A, Ciruela P, Hernández S, García-García JJ, Soldevila N, Izquierdo C, Moraga-Llop F, Díaz A, F de Sevilla M, González-Peris S, Campins M, Uriona S, Martínez-Osorio J, Solé-Ribalta A, Codina G, Esteve C, Planes AM, Muñoz-Almagro C, Salleras L. 2017. Effectiveness of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in preventing invasive pneumococcal disease in children aged 7–59 months. A matched case-control study. *PLoS One* 12:e0183191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183191>.
27. Servei Català de la Salut. 2016. Registre del conjunt mínim bàsic de dades (CMBD) dels hospital d'aguts. Servei Català de la Salut, Barcelona, Spain. <http://catsalut.gencat.cat/ca/proveidors-professionals/registres-catalegs/registres/cmbd/informes-anuals/>.
28. Tarragó D, Fenoll A, Sánchez-Tatay D, Arroyo LA, Muñoz-Almagro C, Esteve C, Hausdorff WP, Casal J, Obando I. 2008. Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 14:828–834. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02028.x>.
29. Selva L, del Amo E, Brotons P, Muñoz-Almagro C. 2012. Rapid and easy identification of capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by use of fragment analysis by automated fluorescence-based capillary electrophoresis. *J Clin Microbiol* 50:3451–3457. <https://doi.org/10.1128/JCM.01368-12>.
30. Brueggemann AB, Peto TE, Crook DW, Butler JC, Kristinsson KG, Spratt BG. 2004. Temporal and geographic stability of the serogroup-specific invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children. *J Infect Dis* 190:1203–1211. <https://doi.org/10.1086/423820>.
31. Sleeman KL, Griffiths D, Shackley F, Diggle L, Gupta S, Maiden MC, Moxon ER, Crook DW, Peto TE. 2006. Capsular serotype-specific attack rates and duration of carriage of *Streptococcus pneumoniae* in a population of children. *J Infect Dis* 194:682–688. <https://doi.org/10.1086/505710>.
32. del Amo E, Brotons P, Monsonis M, Triviño M, Iñigo M, Selva L, Sa-Leão R, Muñoz-Almagro C. 2014. High invasiveness of pneumococcal serotypes included in the new generation of conjugate vaccines. *Clin Microbiol Infect* 20:684–689. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12422>.
33. del Amo E, Selva L, de Sevilla MF, Ciruela P, Brotons P, Triviño M, Hernández S, García-García JJ, Domínguez A, Muñoz-Almagro C. 2015. Estimation of the invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children by the use of direct capsular typing in clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34:705–711. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2280-y>.
34. Lindstrand A, Galanis I, Darenberg J, Morfeldt E, Naucler P, Blennow M, Alfvén T, Henriques-Normark B, Örtqvist Å. 2016. Unaltered pneumococcal carriage prevalence due to expansion of non-vaccine types of low invasive potential 8 years after vaccine introduction in Stockholm, Sweden. *Vaccine* 34:4565–4571. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.07.031>.
35. Agència de Salut Pública de Catalunya. 2016. Pla d'informació de les infeccions respiratòries agudes a Catalunya (PIDIRAC). Agència de Salut Pública de Catalunya, Barcelona, Spain. <http://canalsalut.gencat.cat/ca/professionals/vigilancia-epidemiologica/pla-dinformacio-de-les-infeccions-respiratories-agudes-a-catalunya-pidirac/>.
36. Katz MH. 2011. Multivariable analysis. A practical guide for clinicians and public health researchers, 3rd ed, p 88–92. Cambridge University Press, New York, NY.
37. Spasoff RA. 1999. *Epidemiologic Methods for Health Policy*. Oxford University Press, New York, NY.
38. Agència de Salut Pública de Catalunya. 2017. Sistema de notificació microbiològica de Catalunya (SNMC). Agència de Salut Pública de Catalunya, Barcelona, Spain. <http://canalsalut.gencat.cat/ca/professionals/vigilancia-epidemiologica/sistema-de-notificacio-microbiologica-de-catalunya-snmc>.
39. Weinberger DM, Grant LR, Steiner CA, Weatherholtz R, Santosham M, Viboud C, O'Brien KL. 2014. Seasonal drivers of pneumococcal disease incidence: impact of bacterial carriage and viral activity. *Clin Infect Dis* 58:188–194. <https://doi.org/10.1093/cid/cit721>.
40. Ben-Shimol S, Greenberg D, Hazan G, Shemer-Avni Y, Givon-Lavi N, Dagan R. 2015. Seasonality of both bacteremic and non-bacteremic pneumonia coincides with viral lower respiratory tract infections in early childhood, in contrast to non-pneumonia invasive pneumococcal disease, in the pre-pneumococcal conjugate vaccine era. *Clin Infect Dis* 60:1384–1387. <https://doi.org/10.1093/cid/civ023>.
41. Weinberger DM, Harboe ZB, Viboud C, Krause TG, Miller M, Mølbak K, Konradsen HB. 2014. Pneumococcal disease seasonality: incidence, severity and the role of influenza activity. *Eur Respir J* 43:833–841. <https://doi.org/10.1183/09031936.00056813>.
42. Palacios G, Hornig M, Cisterna D, Savji N, Bussetti AV, Kapoor V, Hui J, Tokarz R, Briese T, Baumeister E, Lipkin WI. 2009. *Streptococcus pneumoniae* coinfection is correlated with the severity of H1N1 pandemic influenza. *PLoS One* 4:e8540. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008540>.
43. de Sevilla MF, García-García JJ, Esteve C, Moraga F, Hernández S, Selva L, Coll F, Ciruela P, Planes AM, Codina G, Salleras L, Jordan I, Domínguez A, Muñoz-Almagro C. 2012. Clinical presentation of invasive pneumococcal disease in Spain in the era of heptavalent conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 31:124–128. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318241d09e>.
44. Loughlin AM, Hsu K, Silverio AL, Marchant CD, Pelton SI. 2014. Direct and indirect effects of PCV13 on nasopharyngeal carriage of PCV13 unique pneumococcal serotypes in Massachusetts' children. *Pediatr Infect Dis J* 33:504–510. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000279>.



#### 4.4. ARTICLE 4:

##### **Autors**

**Hernández S**, Moraga-Llop F, Díaz A, de Sevilla MF, Ciruela P, Muñoz-Almagro C, Codina G, Campins M, García-García JJ, Esteva C, Izquierdo C, González-Peris S, Martínez-Osorio J, Uriona S, Salleras L, Domínguez Á.

##### **Títol**

Failures of 13-valent conjugated pneumococcal vaccine in age-appropriately vaccinated children 2-59 months of age, Spain.

##### **Revista**

Emerging Infectious Diseases.

##### **Referència**

Emerg Infect Dis. 2020;26(6):1147-1155. doi:10.3201/eid2606.190951

##### **Factor d'impacte**

6,259 (2019)

##### **Quartil**

Q1 (Epidemiology)



# Failures of 13-Valent Conjugated Pneumococcal Vaccine in Age-Appropriately Vaccinated Children 2–59 Months of Age, Spain

Sergi Hernández, Fernando Moraga-Llop, Alvaro Díaz, Mariona F. de Sevilla, Pilar Ciruela, Carmen Muñoz-Almagro, Gemma Codina, Magda Campins, Juan José García-García, Cristina Esteva, Conchita Izquierdo, Sebastià González-Peris, Johanna Martínez-Osorio, Sonia Uriona, Luis Salleras, Ángela Domínguez

Vaccination with the 13-valent conjugated pneumococcal disease (PCV13) has reduced invasive pneumococcal disease (IPD), but there have been reports of vaccine failures. We performed a prospective study in children aged 2–59 months who received diagnoses of IPD during January 2012–June 2016 in 3 pediatric hospitals in Catalonia, Spain, a region with a PCV13 vaccination coverage of 63%. We analyzed patients who had been age-appropriately vaccinated but who developed IPD caused by PCV13 serotypes. We detected 24 vaccine failure cases. The serotypes involved were 3 (16 cases); 19A (5 cases); and 1, 6B, and 14 (1 case each). Cases were associated with children without underlying conditions, with complicated pneumonia (OR 6.65, 95% CI 1.91–23.21), and with diagnosis by PCR (OR 5.18, 95% CI 1.84–14.59). Vaccination coverage should be increased to reduce the circulation of vaccine serotypes. Continuous surveillance of cases of IPD using both culture and PCR to characterize vaccine failures is necessary.

Author affiliations: Agència de Salut Pública de Catalunya, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain (S. Hernández, P. Ciruela, C. Izquierdo); Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona (F. Moraga-Llop, M. Campins, S. González-Peris); Hospital de Nens, Barcelona (A. Díaz); Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Barcelona (M.F. de Sevilla, C. Muñoz-Almagro, J.J. García-García, C. Esteva, J. Martínez-Osorio); Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, Spain (M.F. de Sevilla, C. Muñoz-Almagro, J.J. García-García); CIBER de Epidemiología y Salud Pública, Madrid, Spain (P. Ciruela, J.J. García-García, C. Esteva, L. Salleras, Á. Domínguez); Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona (C. Muñoz-Almagro); Vall d'Hebron Institut de Recerca, Barcelona (M. Campins, S. Uriona); Universitat de Barcelona, Barcelona (L. Salleras, Á. Domínguez)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2606.190951>

Conjugated pneumococcal vaccines have been shown to be effective in preventing invasive pneumococcal disease (IPD) in children. In February 2001, the European Medicines Agency (EMA) authorized the use of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7), which included antigens of serotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, and 23F (1) in children <2 years of age. The introduction of PCV7 led to a reduction in cases of IPD and in hospitalizations caused by vaccine serotypes (2,3). Cases of IPD with PCV7 vaccine failure represented ≈2% of all reported IPD cases and resulted mainly from bacteremia caused by serotypes 4, 6B, and 19F. Half the patients with vaccine failure had underlying diseases (4). In subsequent years, there was an increase in the number of IPD cases caused by non-PCV7 serotypes, mainly serotypes 1, 3, and 19A; pneumonia complicated by empyema, pleural effusion, or both was the most frequent presentation (5,6).

In April 2009 (7), and subsequently in December 2009 (8), the European Medicines Agency authorized the marketing of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV10), which included PCV7 serotypes plus serotypes 1, 5, and 7F. It also authorized the 13-valent conjugated pneumococcal vaccine (PCV13), which included PCV10 serotypes plus serotypes 3, 6A, and 19A. In 2010, the Vaccines Advisory Committee of the Spanish Association of Pediatrics recommended that children should receive PCV13, although the vaccine was not included in the recommended schedule of the National Health System and, therefore, parents had to pay for it. In Catalonia, Spain, PCV13 was included in the vaccination calendar financed by the public health system in July 2016. During 2012–2016, when this study was conducted, the estimated PCV13 coverage in children 7–59 months of age in Catalonia was 63% (9).



The introduction of PCV13 in children <5 years of age was associated with a decrease in IPD incidence caused by all vaccine serotypes, except for serotype 3, for which the decrease was not significant (10). Previous studies have shown that the immune response against serotype 3 after PCV13 vaccination is lower than that generated against other serotypes (11,12). Some case-control and cohort studies (9,13,14) have reported no effectiveness, whereas other studies have found the vaccine to be effective (15,16). Kaplan et al. (17) found that most cases of IPD caused by PCV13 serotypes in children receiving  $\geq 1$  dose of PCV13 were associated with serotype 19A and generally occurred in children <6 months of age or those with underlying conditions. However, studies have shown several cases of pneumonia complicated with empyema, pleural effusion, or both produced by serotype 3 in children vaccinated with PCV13 (18,19). We conducted a study to analyze the epidemiologic, clinical, and microbiological characteristics of cases of IPD arising from vaccine failure in children 2–59 months of age who were treated at 3 pediatric hospitals in Catalonia.

## Methods

### Study Design

We conducted a prospective study in children 2–59 months of age who received diagnoses of IPD during January 1, 2012–June 30, 2016 and were treated in 3 pediatric hospitals in Catalonia: Hospital Sant Joan de Déu, Hospital Maternoinfantil Vall d'Hebron, and Hospital de Nens de Barcelona. We estimated a reference population of 116,279 children <5 years of age (30.4% of the total population of this age in Catalonia) for the 3 hospitals (9).

We defined IPD as clinical findings of infection together with the isolation or detection of DNA from *Streptococcus pneumoniae* by real-time PCR in a normally sterile sample. We established the presence of *S. pneumoniae* DNA by amplification of the autolysin (*lytA*) gene and the *wzg* (*cpsA*) gene according to published assays (20–22). We included in the study only samples that were positive for the *lytA* and *wzg* genes in real-time PCR.

### Vaccination Status

We obtained the vaccination status of each case-patient from the vaccination card and the medical record of the primary care center or private center where the child was usually seen. We collected information on the number of PCV13 doses administered and the date of administration. We considered a dose valid if administered after 6 weeks of age, with a minimum

interval between doses appropriate to the summary of product characteristics (SmPC) (8) and  $\geq 15$  days before the onset of IPD.

Patients were considered age-appropriately vaccinated when they had received all doses of PCV13 corresponding to their age (even when the vaccination schedule was incomplete), according to SmPC (8) and the Spanish Association of Pediatrics recommendations (23). We considered patients age-incorrectly vaccinated when they had received  $\geq 1$  doses of PCV13 but did not comply with any vaccination schedule included in the SmPC or had received fewer doses than they should have at disease onset.

### Identification, Serotyping, and Classification of *S. pneumoniae*

Strains of *S. pneumoniae* isolated by culture were serotyped, using the Quellung reaction or dot blot, by the National Center for Microbiology, Majadahonda, Madrid (24). We performed capsular typing of all culture-negative and PCR-positive samples using 2 methods, depending on the amount of *S. pneumoniae* DNA available. If the amount was low (detection of *LytA* gene DNA and *wzg* [*cpsA*] gene of *S. pneumoniae* by real-time PCR with the cycle threshold [Ct] >30 cycles), we used a previously described real-time multiplex PCR technique that detects all pneumococcal capsular types and differentiates serotypes 1, 3, 4, 5, 6A/C, 6B/D, 7F/A, 8, 9V/A/N/L, 14, 15B/C, 18C/B, 19A, 19F/B/C, 23A and 23F (20). If the amount of *S. pneumoniae* DNA was high (PCR-positive samples with Ct  $\leq 30$  cycles), we used sequential multiplex PCR combined with fragment analysis and automated fluorescent capillary electrophoresis to differentiate serotypes: 1, 2, 3, 4, 5, 6A/6B, 6C, 6,7C/(7B/40), 7F/7A, 9N/9L, 9V/9A, 10A, 10F/(10C/33C), 11A/11D, 12F/(12A/44/46), 13, 16F, 17F, 18/(18A/18B/18C/18F), 19A, 19F, 20(20A/20B), 21, 22F/22A), 23A, 23B, 24/(24A/24B/24F), 31, 34, 35A/(35C/42), 35B, 35F/47F, 38/25F, 39 (25). Because this procedure does not differentiate between serotypes 6A and 6C, and serotypes 7F and 7A, in 2 of the cases recorded, these serotypes were considered as nonvaccine serotypes and classified as 6A/6C and 7F/7A.

### Definition of Vaccine Failure and Demographic, Clinical, and Epidemiologic Variables

We used the definition of PCV13 vaccine failure as described by Heininger et al. (26). This definition is the occurrence of IPD caused by a specific vaccine-preventable serotype in a person appropriately and fully vaccinated, taking into account the incubation period and the normal delay for protection to be acquired as a result of immunization.

The following demographic, clinical, and epidemiologic variables were recorded for each case-patient: age, sex, date of birth, date of symptom onset, hospitalization date, clinical form of IPD (meningitis, septic shock, uncomplicated pneumonia, complicated pneumonia, occult bacteremia and others), complications during admission, admission to the intensive care unit (ICU), and length of stay. We also recorded medical risk conditions (sickle cell anemia, congenital or acquired asplenia, human immunodeficiency virus infection, cochlear implant, congenital immunodeficiency, chronic heart disease, chronic lung diseases including asthma if treated with a risk dose of oral corticosteroids, cerebrospinal fluid fistula, chronic renal failure including nephrotic syndrome, immunosuppressive treatment or radiotherapy, solid organ or hematopoietic progenitor transplantation, and diabetes mellitus), and date and clinical outcome at discharge (discharge without sequelae, sequelae after 6 months, death).

### Statistical Analysis

We compared categorical variables using a Pearson  $\chi^2$  test or Fisher exact test and continuous variables using a Student *t* test. In cases of vaccine failure, we calculated the association of serotypes with age group and vaccination status for each specific serotype compared with the remaining serotypes. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. We assumed a bilateral distribution for all *p* values. We then calculated the odds ratios (ORs) and 95% CIs. We conducted the analyses using SPSS Statistics 19.0 (IBM, <https://www.ibm.com>).

### Data Confidentiality and Ethics Aspects

No diagnostic tests were made or samples taken from any participant in addition to those required by routine care. This study complies with the principles of the Declaration of Helsinki and the legal structure according to international human rights and biomedicine and personal data protection legislation. The Ethics Committee of Hospital Sant Joan de Déu approved the study. Informed consent signed by parents or legal guardians was given for all participants. All data were treated as confidential, and records were accessed anonymously.

### Results

During the study period, we recruited 188 patients 2–59 months of age who were admitted to the 3 participating centers with IPD. We identified the *S. pneumoniae* serotype causing IPD in 180 cases (95.7%), of which 104 (57.8%) were caused by PCV13 serotypes.

Serotype 3 was the most frequent serotype (42 cases, 23.3%), followed by serotype 1 (19 cases, 10.6%), 19A (17 cases, 9.4%), and 14 (13 cases, 7.2%). Of the 180 case-patients, 102 (56.7%) were not vaccinated, 66 (36.6%) were age-appropriately vaccinated, and 12 (6.7%) were age-incorrectly vaccinated.

### Characteristics of Cases of Vaccine Failure

We detected 24 cases of vaccine failure according to the study definition, representing 13.3% of all cases. The serotypes identified were serotype 3 (16 cases, 66.7%); serotype 19A (5 cases, 20.8%); and serotypes 1, 14, and 6B (1 case each). The overall mean age of the 24 case-patients was 31.3 months (range 9–58 months, SD 14.7). Of the 24 case-patients, 66.7% (16) were male, and 62.6% (15) were 24–59 months of age (Table 1). The main age group was 24–59 months in cases caused by serotype 3 (81.3% vs. 25.0%;  $p = 0.013$ ) and <24 months in cases caused by serotype 19A (80.0% vs. 26.3%;  $p = 0.047$ ). Of the 24 case-patients, 17 (70.8%) had completed the vaccination schedule, 11 (45.8%) had a 3 + 1 dose schedule, 4 (16.7%) a 2-dose schedule, and 2 (8.3%) a 1-dose schedule. Of the 7 (29.2%) age-appropriately vaccinated patients with an incomplete vaccination schedule, 4 (16.7%) had a 3 + 0 schedule, 2 (8.3%) 1 dose, and 1 (4.2%) 2 doses. Serotype 3 was loosely associated with vaccine failure in age-appropriately vaccinated patients who had completed their vaccination schedule (OR 45.0, 95% CI 3.41–594.12). Serotype 19A was loosely associated with vaccine failure in age-appropriately vaccinated patients with an incomplete vaccination schedule (OR 21.33, 95% CI 1.75–263.67). The most frequent clinical presentation was complicated pneumonia (21/24 cases, 87.5%) and the most frequent complication of these 21 cases was empyema (15/21 cases, 71.4%). Of the 24 cases, 79.2% (19 cases) were diagnosed by PCR alone, 12.5% (3 cases) by culture alone, and 8.3% (2 cases) by PCR and culture. No patient with vaccine failure had underlying conditions.

### Distribution of PCV13 Serotypes

Of the 104 cases of IPD caused by PCV13 serotypes, 23.1% (24 cases) were in age-appropriately vaccinated patients. The percentage of vaccine failure varied greatly according to the serotype: 38.1% (16/42) in serotype 3 cases, 29.4% (5/17) in serotype 19A cases, 7.7% (1/13) in serotype 14 cases, and 5.3% (1/19) in serotype 1 cases. Of the PCV13 serotypes, the proportion of serotype 3 in age-appropriately vaccinated patients was higher than in unvaccinated patients (66.7% vs. 27.8%;  $p = 0.001$ ) (Table 2).



## RESEARCH

**Table 1.** Characteristics of age-appropriately vaccinated patients 2–59 months of age with invasive pneumococcal disease caused by PCV13 serotypes, Catalonia, Spain, 2012–2016\*

Pt no.	Age, mo/sex	Year	Age at vaccination	Schedule	Clinical manifestation	Complications	Outcome	DT	Ser	Vaccine schedule
1	19/F	2012	12 mo	1	Complicated pneumonia	Pleural effusion	Cured	PCR	19A	UC
2	15/M	2012	3, 5 mo†	2 + 0	Complicated pneumonia	Empyema, pneumothorax	Cured	Culture, PCR	19A	UC
3	15/F	2012	2, 5, 8 mo	3 + 0	Complicated pneumonia	Empyema, necrotizing pneumonia, bronchoalveolar fistula, pneumothorax	Bronchopleural fistula	PCR	3	UC
4	23/M	2012	17 mo	1	Uncomplicated pneumonia		Cured	Culture	1	UC
5	24/M	2012	2, 4, 6, 18 mo	3 + 1	Complicated pneumonia	Empyema	Cured	PCR	19A	C
6	24/M	2012	12, 21 mo	2	Complicated pneumonia	Empyema	Cured	PCR	3	C
7	21/M	2012	3, 5, 7, 15 mo	3 + 1	Complicated pneumonia	Empyema	Cured	PCR	3	C
8	38/M	2012	30 mo	1	Bacteraemic mastoiditis	Epidural abscess, sigmoid sinus thrombosis	Hydrocephalus	PCR	3	C
9	9/F	2013	2, 3, 4 mo	3 + 0	Complicated pneumonia	Necrotizing pneumonia	Cured	PCR	19A	UC
10	12/M	2013	2, 4, 6 mo	3 + 0	Complicated pneumonia	Empyema, necrotizing pneumonia	Cured	PCR	6B	UC
11	50/F	2013	25 mo	1	Complicated pneumonia	Empyema	Cured	PCR	3	C
12	34/M	2013	3, 6, 9, 15 mo	3 + 1	Complicated pneumonia	Empyema, pneumothorax, bronchopleural fistula	Cured	Culture, PCR	3	C
13	15/M	2014	2, 4, 7 mo	3 + 0	Osteoarticular infection		Cured	Culture	19A	UC
14	43/M	2014	12, 15 mo	2	Complicated pneumonia	Empyema, necrotizing pneumonia, bronchopleural fistula	Cured	PCR	3	C
15	44/F	2014	3, 5, 7, 20 mo	3 + 1	Complicated pneumonia	Empyema	Cured	PCR	3	C
16	25/F	2015	2, 4, 6, 14 mo	3 + 1	Complicated pneumonia	Pleural effusion	Cured	Culture	14	C
17	29/M	2015	3, 5, 7, 18 mo	3 + 1	Complicated pneumonia	Necrotizing pneumonia	Cured	PCR	3	C
18	51/M	2015	2, 4, 6, 16 mo	3 + 1	Complicated pneumonia	Empyema	Cured	PCR	3	C
19	49/F	2015	12, 14 mo	2	Complicated pneumonia	Empyema	Cured	PCR	3	C
20	54/F	2015	3, 5, 7, 17 mo	3 + 1	Complicated pneumonia	Empyema	Cured	PCR	3	C
21	58/M	2016	14, 16 mo	2	Complicated pneumonia	Empyema, necrotizing pneumonia	Pneumatocele	PCR	3	C
22	35/M	2016	2, 5, 9, 18 mo	3 + 1	Complicated pneumonia	Empyema, necrotizing pneumonia	Cured	PCR	3	C
23	41/M	2016	3, 4, 7, 16 mo	3 + 1	Complicated pneumonia	Necrotizing pneumonia	Cured	PCR	3	C
24	23/M	2016	3, 5, 6, 15 mo	3 + 1	Complicated pneumonia	Pleural effusion	Cured	PCR	3	C

\*C, completed; DT, diagnostic technique; Pt, patient; Ser, serotype; UC, uncompleted.

†Patient resident in Andorra (routine immunization schedule 2+1) and transferred to a participating hospital.

### Characteristics of IPD According to Vaccine Failure

We found no differences in sex or age group between cases of IPD with and without vaccine failure (Table 3). Cases with vaccine failure were associated with complicated pneumonia (OR 6.65, 95% CI 1.91–23.21). Pneumonia with empyema was the most common

form of complicated pneumonia, both in cases of vaccine failure (71.4%) and in the remaining cases (77.5%). Cases of IPD with vaccine failure were associated with the diagnosis only by real-time PCR (OR 5.18, 95% CI 1.84–14.59). We observed no differences between the epidemiologic variables studied.

**Table 2.** Distribution of PCV13 serotypes causing invasive pneumococcal disease in patients 2–59 months of age in cases of vaccine failure and in unvaccinated patients, Catalonia, Spain, 2012–2016

PCV13 serotype	Vaccine failure, no. (%), n = 24	Unvaccinated patients, no. (%), n = 72	OR (95% CI)	p value
1	1 (4.2)	16 (22.2)	0.15 (0.02–1.21)	0.062
3	16 (66.7)	20 (27.8)	5.20 (1.93–14.04)	0.001
6A	0	1 (1.4)	0	0
6B	1 (4.2)	1 (1.4)	3.09 (0.19–51.35)	0.439
7F	0	3 (4.2)	0	0
9V	0	3 (4.2)	0	0
14	1 (4.2)	12 (16.7)	0.22 (0.03–1.77)	0.174
18C	0	1 (1.4)	0	0
19A	5 (20.8)	12 (16.7)	1.32 (0.41–4.21)	0.634
19F	0	2 (2.8)	0	0
23F	0	1 (1.4)	0	0

### Characteristics of IPD Caused by Serotype 3 in Unvaccinated Cases and Cases with Vaccine Failure

Of the 42 case-patients with IPD caused by serotype 3, a total of 20 (47.6%) had received no dose of PCV13, 16 (38.1%) were age-appropriately vaccinated, and 6 (14.3%) were age-incorrectly vaccinated according to the SmPC. We found no significant differences between IPD caused by serotype 3 in unvaccinated patients and age-appropriately vaccinated patients with respect to the distribution by sex, age group, clinical form, and complications (Table 4). None of the severity factors compared (days of hospital admission, stay and days of admission to the ICU, complications, and sequelae at discharge) was associated with either group.

### Discussion

Since the introduction of PCV13, several authors have reported cases of IPD caused by vaccine serotypes, both in patients who had received  $\geq 1$  dose of PCV13 and in age-appropriately vaccinated patients. In our study, cases with vaccine failure were associated mainly with serotype 3, the clinical presentation of complicated pneumonia, and patients without underlying conditions or other risk factors. This type of vaccine failure coincides with that found by Antachopoulos et al. in Greece (19) and confirms the results of Moraga-Llop et al. in Catalonia (18).

Kaplan et al. (17), in a study carried out in 8 US pediatric hospitals, found that vaccine failures were associated mainly with serotype 19A, age  $< 6$  months, and patients with underlying conditions. A retrospective study by Basaranoglu et al. (27) of IPD cases in children treated at a tertiary pediatric hospital in Ankara, Turkey, in 2015 reported 2 cases of vaccine failure associated with serotype 19F in patients with underlying neurologic disease. These studies differ from ours in 2 respects. First, they were carried out in a population for which pediatric PCV13 vaccination had been financed since 2010; thus, Basaranoglu et al.

(27) found that the vaccination coverage in children was 96%. Our study was conducted in a population with an estimated vaccination coverage of 63% (9). In addition, although several studies indicate that there has been no decrease in the incidence of serotype 3 after the introduction of PCV13 (9,28,29), only the study in adults by Fukusumi et al. (29) included cases diagnosed by real-time PCR; therefore, it cannot be ruled out that, in a population with higher vaccination rates, there were fewer vaccine failures because of herd immunity.

The second aspect is methodological. The studies by Kaplan et al. (17) and Basaranoglu et al. (27) included only cases diagnosed by culture. In our study, cases diagnosed by PCR were also included; in fact, cases of vaccine failure were associated with a diagnosis by PCR. Selva et al. (30) showed the importance of PCR in the diagnosis of IPD caused by serotype 3 in children  $< 5$  years of age with negative cultures. Almeida et al. (31), in a retrospective study conducted in patients  $< 18$  years of age admitted with pneumonia to a tertiary hospital in Portugal during 2012–2014 and diagnosed by PCR, found 4 cases of vaccine failure in patients who had received 4 doses of PCV13, which were all associated with serotype 3. Silva-Costa et al. (32) analyzed 152 pleural fluid samples from pediatric patients in Portugal during 2010–2015 to identify and serotype *S. pneumoniae*; 68% of cases were diagnosed only by PCR and, as in our study, the serotypes most frequently identified were 3, 1, and 19A. That study detected 19 cases of PCV13 vaccine failure, of which 17 were related to serotype 3. Serotype 3 was the most frequently identified serotype in children vaccinated with PCV13 in both studies and, although Silva-Costa et al. analyzed only cases of complicated pneumonia, a pathology associated with this serotype, our results, analyzing all clinical presentations of IPD, were identical. We also found a higher frequency of serotype 3 cases in patients with vaccine failure compared with unvaccinated patients, which

is an indicator of the importance of this serotype in the post-PCV13 era. When the 2 studies were carried out, the vaccination coverage in Portugal (61%) was similar to that of Catalonia (63%).

As in the study by Kaplan et al. (17), we found that serotype 19A was associated with cases of PCV13 vaccine failure in children <2 years of age, the most frequently isolated serotype in this age group in our setting (10). Dominguez et al. (9) found that PCV13 effectiveness in the prevention of IPD caused by serotype 19A was 86% for  $\geq 1$  dose. The similar results observed by Kaplan et al. (17) for this serotype in a population with routine PCV13 vaccination may be explained by the fact that in half of the cases (5/10) reported by Kaplan et al., patients also had some type of underlying condition, whereas in our study, no patient had an underlying condition.

Heininger et al. (26) classified vaccine failures according to their cause or origin. Our study found no failures related to usage issues because, in all cases, the dates of vaccine administration and the number of doses administered according to the technical specifications were verified. The data in our study included cases during January 2012–June 2016, so the vaccines administered did not belong to

the same batch. Although it is not known whether the preservation or storage of each vaccine was correct, given that vaccine failures occurred mostly in serotype 3 and in cases with complicated pneumonia, it seems unlikely that vaccine failures can be related to any of these factors, because in that case the case-mix of vaccine failures would be much more heterogeneous. Host-related vaccine failures also seem unlikely because no patient had a history of any underlying condition, including immunodeficiency. This finding is reinforced by the absence of differences between cases of IPD caused by serotype 3 in unvaccinated patients and in those with vaccine failure. It may be assumed that, if cases with vaccine failure had some type of immunodeficiency that would have induced a poor immunological response to the PCV13 vaccine, this effect would have manifested as a greater severity of IPD in cases with vaccine failure. The lack of significant differences in the epidemiologic variables between cases with and without vaccine failure makes it unlikely that vaccine failures were related to interference by other infectious agents. The fact that serotype 3 was associated with cases with vaccine failure, and specifically with age-appropriately vaccinated patients who had

**Table 3.** Characteristics of cases of invasive pneumococcal disease in patients 2–59 months of age with and without vaccine failure, Catalonia, Spain, 2012–2016

Variable	Vaccine failure, no. (%), n = 24	No vaccine failure, no. (%), n = 156	OR (95% CI)	p value
Sex				
F	8 (33.3)	58 (37.2)	Referent	
M	16 (66.7)	98 (62.8)	1.18 (0.48–2.94)	0.716
Age group				
2–23 mo	9 (37.5)	73 (46.8)	Referent	
24–59 mo	15 (62.5)	83 (53.2)	1.46 (0.60–3.55)	0.395
Clinical form				
Meningitis	0	16 (10.3)	0	0
Septic shock	0	4 (2.6)	0	0
Uncomplicated pneumonia	1 (4.2)	26 (16.7)	0.22 (0.03–1.68)	0.134
Complicated pneumonia	21 (87.5)	80 (51.3)	6.65 (1.91–23.21)	0.001
Occult bacteremia	0	20 (12.8)	0	0
Other	2 (8.3)*	10 (6.4)†	1.33 (0.27–6.46)	0.664
Pneumonia complication				
Empyema	15 (71.4)	62 (77.5)	0.73 (0.25–2.14)	0.561
Pleural effusion	3 (14.3)	23 (28.8)	0.41 (0.11–1.54)	0.263
Necrotizing pneumonia	8 (38.1)	18 (22.5)	2.12 (0.76–5.91)	0.146
Intensive care unit admission	2 (8.3)	35 (22.4)	0.31 (0.07–1.40)	0.173
Sequelae at discharge	3 (12.5)	20 (11.9)	0.96 (0.26–3.53)	1.000
Underlying disease	0	9 (5.8)	0	0
Diagnostic technique				
PCR only	19 (79.2)	66 (42.3)	6.62 (1.47–29.82)	0.014
Culture only	3 (12.5)	44 (28.2)	1.57 (0.25–9.84)	0.631
PCR + culture	2 (8.3)	46 (29.5)	Referent	
Breastfeeding	22 (91.7)	125 (81.2)	2.55 (0.57–11.47)	0.260
School or daycare attendance	20 (83.3)	102 (66.2)	2.55 (0.83–7.85)	0.104
Respiratory infection previous month	17 (70.8)	88 (57.1)	1.82 (0.71–4.65)	0.205
Recurrent otitis media	5 (20.8)	19 (12.3)	1.87 (0.62–5.59)	0.257

\*Osteoarticular infection (1); mastoiditis (1).

†Osteoarticular infection (5); mastoiditis (4); orbital cellulitis (1).

**Table 4.** Characteristics of cases of invasive pneumococcal disease caused by serotype 3 in patients 2–59 months of age with vaccine failure or unvaccinated, Catalonia, Spain, 2012–2016\*

Variable	Vaccine failure, no. (%), n = 16	Unvaccinated, no. (%), n = 20	OR (95% CI)	p value
Sex				
F	5 (31.3)	6 (30.0)	Referent	
M	11 (68.8)	14 (70.0)	0.94 (0.23–3.92)	0.936
Days of admission, mean (SD)	14.69 (9.81)	12.25 (6.07)	1.04 (0.95–1.13)	0.367
ICU days, mean (SD)	1.00	3.00 (1.14)	Not calculable	0.540
Age group				
0–23 mo	3 (18.8)	7 (35.0)	Referent	
24–59 mo	13 (81.3)	13 (65.0)	2.33 (0.49–11.06)	0.456
Clinical form				
Septic shock	0	1 (5.0)	0	0
Uncomplicated pneumonia	0	2 (10.0)	0	0
Complicated pneumonia	15 (93.8)	17 (85.0)	2.65 (0.25–28.24)	0.613
Mastoiditis	1 (6.3)	0	0	0
Empyema				
No	3 (20.0)	3 (17.6)	Referent	
Yes	12 (80.0)	14 (82.4)	0.86 (0.15–5.06)	1.000
Pleural effusion				
No	14 (93.3)	13 (76.5)	Referent	
Yes	1 (6.7)	4 (23.5)	0.23 (0.02–2.36)	0.338
Necrotizing pneumonia				
No	9 (60.0)	13 (76.5)	Referent	
Yes	6 (40.0)	4 (23.5)	2.17 (0.47–9.95)	0.450
ICU				
No	15 (93.8)	18 (90.0)	Referent	
Yes	1 (6.3)	2 (10.0)	0.60 (0.05–7.28)	1.000
Sequelae at discharge				
No	13 (81.3)	17 (85.0)	Referent	
Yes	3 (18.8)	3 (15.0)	1.31 (0.23–7.57)	1.000
Underlying disease				
No	16 (100.0)	19 (95.0)		
Yes	0	1 (5.0)		
PCR diagnosis only				
No	1 (6.3)	2 (10.0)	Referent	
Yes	15 (93.8)	18 (90.0)	1.67 (0.14–20.23)	1.000

\*ICU, intensive care unit.

completed their vaccination schedule, indicates that vaccine failures could be vaccine related because of low PCV13 effectiveness with respect to serotype 3. This conclusion is in line with the results published by other authors (9,13,33) who studied PCV13 effectiveness in case-control studies and with the results reported on PCV13 effectiveness by Andrews et al. (14,34) in indirect cohort studies. All those authors observed that the effectiveness for all PCV13 serotypes was high, except for serotype 3, where it was very limited. Vanderkooi et al. (11) observed that the level of opsonophagocytic antibodies against serotype 3 was lower than that for the other PCV13 serotypes and Martínón-Torres et al. (12) observed that serotype 3 had the lowest levels of immunogenicity after PCV13 vaccination. Van der Linden et al. (15), looking at cases diagnosed only by culture, reported a PCV13 effectiveness against serotype 3 in children <24 months of age of 74% (95% CI 2%–93%) for those who had received  $\geq 1$  dose of vaccine but a nonsignificant effectiveness of 63% (95% CI -393% to 97%)

for those who had received a postbooster dose.

A limitation of the study is that it was not possible to perform a serologic study to determine serotype-specific IgG concentrations. No specific studies were made to rule out immunodeficiency in cases with vaccine failure. However, the absence of a history of disease, the control of patients after discharge (which lasted 6 months in the case of discharge with sequelae), and the fact that IPD in cases with vaccine failure did not present greater severity than unvaccinated cases, support the validity of our results. Another limitation is that serotypes 25F and 38 were negative for the *wzg* (*cpsA*) gene. However, neither of these serotypes are PCV13 serotypes, and of the 89 strains serotyped using the Quellung reaction only 2 were serotype 38 and 1 serotype 25F.

In conclusion, after the introduction of the PCV13 vaccine in Spain, a significant number of IPD cases in Catalonia were recorded in the form of complicated pneumonia produced by PCV13 serotypes in age-appropriately vaccinated children without concurrent



conditions. Serotype 3 represented 66.7% of cases with vaccine failure and was associated with age-appropriately vaccinated patients who had completed their vaccination schedule and with the 24–59 months age group. Serotype 19A represented 20.8% of cases of vaccine failure and was associated with age-appropriately vaccinated patients with an incomplete vaccination schedule and children <2 years of age. In 93.8% of vaccine failures associated with serotype 3, the diagnosis was made only by PCR, which suggests the importance of this diagnostic technique in avoiding underdetection of this serotype. Our findings indicate that vaccine coverage should be increased to reduce the circulation of vaccine serotypes. However, there are doubts as to whether PCV13 vaccination will reduce serotype 3 cases to the same extent as other vaccine serotypes. Continuous surveillance of cases of IPD using not only culture but also PCR to characterize vaccine failures is necessary.

This work was supported by the Plan Nacional I+D+I, ISCIII-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria (project nos. PI11/02081 and PI11/2345) and cofunded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and the Catalan Agency for the Management of Grants for University Research AGAUR (grant nos. 2017 SGR 1342 and 2017 SGR 0742).

## About the Author

Mr. Hernández is a doctoral candidate in public health at the University of Barcelona, Barcelona, Spain. His primary research interest is the epidemiological and public health aspects of invasive pneumococcal disease in children.

## References

- European Medicines Agency. Summary of Prevenar 7 product characteristics. European Medicines Agency, London, United Kingdom. 2011 [cited 2019 May 09]. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000323/WC500041558.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000323/WC500041558.pdf)
- Ben-Shimol S, Greenberg D, Givon-Lavi N, Schlesinger Y, Somekh E, Aviner S, et al. Early impact of sequential introduction of 7-valent and 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on IPD in Israeli children <5 years: an active prospective nationwide surveillance. *Vaccine*. 2014; 32:3452–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.03.065>
- Lepoutre A, Varon E, Georges S, Dorléans F, Janoir C, Gutmann L, et al.; Microbiologists of Epibac; ORP Networks. Impact of the pneumococcal conjugate vaccines on invasive pneumococcal disease in France, 2001–2012. *Vaccine*. 2015;33:359–66. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.11.011>
- Oligbu G, Hsia Y, Folgori L, Collins S, Ladhani S. Pneumococcal conjugate vaccine failure in children: a systematic review of the literature. *Vaccine*. 2016;34:6126–32. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.10.050>
- Muñoz-Almagro C, Jordan I, Gene A, Latorre C, García-García JJ, Pallares R. Emergence of invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes in the era of 7-valent conjugate vaccine. *Clin Infect Dis*. 2008;46:174–82. <https://doi.org/10.1086/524660>
- Feikin DR, Kagucia EW, Loo JD, Link-Gelles R, Puhon MA, Cherian T, et al.; Serotype Replacement Study Group. Serotype-specific changes in invasive pneumococcal disease after pneumococcal conjugate vaccine introduction: a pooled analysis of multiple surveillance sites. *PLoS Med*. 2013;10:e1001517. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001517>
- European Medicines Agency. Summary of Synflorix product characteristics. European Medicines Agency, London, United Kingdom. 2009 [cited 2019 May 09]. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000973/WC500054346.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000973/WC500054346.pdf)
- European Medicines Agency. Summary of Prevenar 13 product characteristics. European Medicines Agency, London, United Kingdom. 2014 [cited 2019 May 09]. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/prevenar-epar-summary-public\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/prevenar-epar-summary-public_en.pdf)
- Domínguez Á, Ciruela P, Hernández S, García-García JJ, Soldevila N, Izquierdo C, et al. Effectiveness of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in preventing invasive pneumococcal disease in children aged 7–59 months. A matched case-control study. *PLoS One*. 2017;12:e0183191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183191>
- Ciruela P, Izquierdo C, Broner S, Muñoz-Almagro C, Hernández S, Ardanuy C, et al.; Catalan Working Group on Invasive Pneumococcal Disease. The changing epidemiology of invasive pneumococcal disease after PCV13 vaccination in a country with intermediate vaccination coverage. *Vaccine*. 2018;36:7744–52. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.026>
- Vanderkooi OG, Scheifele DW, Girgenti D, Halperin SA, Patterson SD, Gruber WC, et al.; Canadian PCV13 Study Group. Safety and immunogenicity of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in healthy infants and toddlers given with routine pediatric vaccinations in Canada. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31:72–7. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318233049d>
- Martinón-Torres F, Wysocki J, Center KJ, Czajka H, Majda-Stanisławska E, Omeñaca F, et al. Circulating antibody 1 and 2 years after vaccination with the 13-valent pneumococcal conjugated vaccine in preterm compared with term infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2017;36:326–32. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001428>
- Miller E, Andrews NJ, Waight PA, Slack MP, George RC. Effectiveness of the new serotypes in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Vaccine*. 2011;29:9127–31. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.112>
- Andrews N, Kent A, Amin-Chowdhury Z, Sheppard C, Fry N, Ramsay M, et al. Effectiveness of the seven-valent and thirteen-valent pneumococcal conjugate vaccines in England: the indirect cohort design, 2006–2018. *Vaccine*. 2019;37:4491–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.06.071>
- van der Linden M, Falkenhorst G, Perniciaro S, Fitzner C, Imöhl M. Effectiveness of pneumococcal conjugate vaccines (PCV7 and PCV13) against invasive pneumococcal disease among children under two years of age in Germany. *PLoS One*. 2016;11:e0161257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161257>
- Sings HL, De Wals P, Gessner BD, Isturiz R, Laferriere C, McLaughlin JM, et al. Effectiveness of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive disease

- caused by serotype 3 in children: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Clin Infect Dis*. 2019;68:2135–43. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy920>
17. Kaplan SL, Barson WJ, Lin PL, Romero JR, Bradley JS, Tan TQ, et al. Early trends for invasive pneumococcal infections in children after the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32:203–7. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318275614b>
  18. Moraga-Llop F, Garcia-García JJ, Díaz-Conradi A, Ciruela P, Martínez-Osorio J, González-Peris S, et al. Vaccine failures in patients properly vaccinated with 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in Catalonia, a region with low vaccination coverage. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35:460–3. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001041>
  19. Antachopoulos C, Tsolia MN, Tzanakaki G, Xirogianni A, Dedousi O, Markou G, et al. Parapneumonic pleural effusions caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 in children immunized with 13-valent conjugated pneumococcal vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33:81–3. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000041>
  20. Tarragó D, Fenoll A, Sánchez-Tatay D, Arroyo LA, Muñoz-Almagro C, Esteva C, et al. Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:828–34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02028.x>
  21. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). PCR for detection and characterization of bacterial meningitis pathogens: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae*. 2011 [cited 2020 Feb 09]. <http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt10-pcr.html>
  22. del Amo E, Selva L, de Sevilla MF, Ciruela P, Brotons P, Triviño M, et al. Estimation of the invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children by the use of direct capsular typing in clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34:705–11. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2280-y>
  23. Moreno-Pérez D, Alvarez García FJ, Aristegui Fernández J, Barrio Corrales F, Cilleruelo Ortega MJ, Corretger Rauet JM, et al.; Advisory Committee on Vaccines of the Spanish Association of Pediatrics. Immunization schedule of the Spanish Association of Pediatrics: 2012 recommendations. *An Pediatr (Barc)*. 2012;76:43.e1–23. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2011.10.008>
  24. Fenoll A, Jado I, Vicioso D, Casal J. Dot blot assay for the serotyping of pneumococci. *J Clin Microbiol*. 1997;35:764–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.35.3.764-766.1997>
  25. Selva L, Berger C, Garcia-Garcia JJ, de Paz H, Nadal D, Muñoz-Almagro C. Direct identification of *Streptococcus pneumoniae* capsular types in pleural fluids by using multiplex PCR combined with automated fluorescence-based capillary electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 2014;52:2736–7. <https://doi.org/10.1128/JCM.00906-14>
  26. Heininger U, Bachtiar NS, Bahri P, Dana A, Dodoo A, Gidudu J, et al. The concept of vaccination failure. *Vaccine*. 2012;30:1265–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.12.048>
  27. Tanır Basaranoglu S, Karadag Oncel E, Aykac K, Ozsurekci Y, Cengiz AB, Kara A, et al. Invasive pneumococcal disease: from a tertiary care hospital in the post-vaccine era. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13:962–4. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1256519>
  28. Slotved HC, Dalby T, Harboe ZB, Valentiner-Branth P, Casadevante VF, Espenhain L, et al. The incidence of invasive pneumococcal serotype 3 disease in the Danish population is not reduced by PCV-13 vaccination. *Heliyon*. 2016;2:e00198. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00198>
  29. Fukusumi M, Chang B, Tanabe Y, Oshima K, Maruyama T, Watanabe H, et al.; Adult IPD Study Group. Invasive pneumococcal disease among adults in Japan, April 2013 to March 2015: disease characteristics and serotype distribution. *BMC Infect Dis*. 2017;17:2. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-2113-y>
  30. Selva L, Ciruela P, Esteva C, de Sevilla MF, Codina G, Hernández S, et al. Serotype 3 is a common serotype causing invasive pneumococcal disease in children less than 5 years old, as identified by real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31:1487–95. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1468-7>
  31. Almeida AF, Sobrinho-Simões J, Ferraz C, Nunes T, Vaz L. Pneumococcal pneumonia vaccine breakthroughs and failures after 13-valent pneumococcal conjugated vaccine. *Eur J Public Health*. 2016;26:887–9. <https://doi.org/10.1093/eurpub/ckw089>
  32. Silva-Costa C, Brito MJ, Pinho MD, Friães A, Aguiar SI, Ramirez M, et al.; Portuguese Group for the Study of Streptococcal Infections; Portuguese Study Group of Invasive Pneumococcal Disease of the Pediatric Infectious Disease Society. Pediatric complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 in 13-valent pneumococcal conjugate vaccinees, Portugal, 2010–2015. *Emerg Infect Dis*. 2018;24:1307–14. <https://doi.org/10.3201/eid2407.180029>
  33. van der Linden M, Falkenhorst G, Perniciaro S, Fitzner C, Imöhl M. Effectiveness of pneumococcal conjugate vaccines (PCV7 and PCV13) against invasive pneumococcal disease among children under two years of age in Germany. *PLoS One*. 2016;11:e0161257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161257>
  34. Andrews NJ, Waigh PA, Burbidge P, Pearce E, Roalfe L, Zancolli M, et al. Serotype-specific effectiveness and correlates of protection for the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine: a postlicensure indirect cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2014;14:839–46. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70822-9](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70822-9)<jrn>

---

Address for correspondence: Sergi Hernández, Cardenal Casañas n°10 1º-1ª 08002, Barcelona, Spain; email: 8888hernandez.sergi@gmail.com



#### 4.5. Article 5:

##### **Autors**

**Hernández S**, Navas E, Aznar-Lou I, Ciruela P, García-García JJ, Moraga-Llop F, Muñoz-Almagro C, Codina G, F de Sevilla M, González-Peris S, Esteva C, Planes AM, Izquierdo C, Martínez-Osorio J, Campins M, Uriona S, Salleras L, Serrano-Blanco A, Jané M, Domínguez Á.

##### **Títol**

Impact of the 13-valent conjugated pneumococcal vaccine on the direct costs of invasive pneumococcal disease requiring hospital admission in children aged < 5 years: a prospective study.

##### **Revista**

Vaccines (Basel).

##### **Referència**

Vaccines (Basel). 2020;8(3):E387. doi:10.3390/vaccines8030387

##### **Factor d'impacte**

4,086 (2019)

##### **Quartil**

Q1 (Infectious diseases)







Article

# Impact of the 13-Valent Conjugated Pneumococcal Vaccine on the Direct Costs of Invasive Pneumococcal Disease Requiring Hospital Admission in Children Aged < 5 Years: A Prospective Study

Sergi Hernández <sup>1,\*</sup> , Encarna Navas <sup>1</sup>, Ignacio Aznar-Lou <sup>2,3</sup> , Pilar Ciruela <sup>1,3</sup>, Juan José García-García <sup>3,4,5</sup>, Fernando Moraga-Llop <sup>6</sup>, Carmen Muñoz-Almagro <sup>3,4,5,7</sup>, Gemma Codina <sup>6</sup>, Mariona F. de Sevilla <sup>4,5</sup>, Sebastià González-Peris <sup>6</sup>, Cristina Esteva <sup>3,4</sup>, Ana María Planes <sup>6</sup>, Conchita Izquierdo <sup>1</sup>, Johanna Martínez-Osorio <sup>4</sup>, Magda Campins <sup>6,8</sup>, Sonia Uriona <sup>6,8</sup>, Luis Salleras <sup>3,9</sup>, Antoni Serrano-Blanco <sup>3,10</sup> , Mireia Jané <sup>1,3</sup> and Ángela Domínguez <sup>3,9</sup>

- <sup>1</sup> Public Health Agency of Catalonia, Generalitat de Catalunya, 08005 Barcelona, Spain; e.navas@gencat.cat (E.N.); pilar.ciruela@gencat.cat (P.C.); conchitaizquierdog@gmail.com (C.I.); mireia.jane@gencat.cat (M.J.)
  - <sup>2</sup> Teaching, Research & Innovation Unit, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Sant Boi de Llobregat, 08830 Barcelona, Spain; i.aznar@pssjd.org
  - <sup>3</sup> CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain; juanjo@sjdhospitalbarcelona.org (J.J.G.-G.); cma@sjdhospitalbarcelona.org (C.M.-A.); cesteva@sjdhospitalbarcelona.org (C.E.); salleras@ub.edu (L.S.); aserrano@pssjd.org (A.S.-B.); angela.dominguez@ub.edu (Á.D.)
  - <sup>4</sup> Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Universitat de Barcelona, Esplugues de Llobregat, 08950 Barcelona, Spain; mariafernandez@sjdhospitalbarcelona.org (M.F.d.S.); jmmartinez@sjdhospitalbarcelona.org (J.M.-O.)
  - <sup>5</sup> Malalties Prevenibles amb Vacunes, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, 08950 Barcelona, Spain
  - <sup>6</sup> Hospital Universitari Vall d'Hebron, 08035 Barcelona, Spain; fmoraga@acmcb.es (F.M.-L.); mgcodina@vhebron.net (G.C.); sgonzalezperis@gmail.com (S.G.-P.); amplanes@gmail.com (A.M.P.); mcampins@vhebron.net (M.C.); urionasonia@gmail.com (S.U.)
  - <sup>7</sup> Departament de Medicina, Universitat Internacional de Catalunya, 08017 Barcelona, Spain
  - <sup>8</sup> Epidemiology and Public Health Research Group, Vall d'Hebron Institut de Recerca, 08035 Barcelona, Spain
  - <sup>9</sup> Departament de Medicina, Universitat de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain
  - <sup>10</sup> Parc Sanitari Sant Joan de Déu, Sant Boi de Llobregat, 08830 Barcelona, Spain
- \* Correspondence: hernandez.sergi@gmail.com

Received: 7 June 2020; Accepted: 13 July 2020; Published: 15 July 2020



**Abstract:** The lack of invasive pneumococcal disease (IPD) cost studies may underestimate the effect of pneumococcal polysaccharide conjugated vaccines (PCV). The objective of this study was to estimate the direct costs of hospitalized IPD cases. A prospective study was made in children aged <5 years diagnosed with IPD in two high-tech hospitals in Catalonia (Spain) between 2007–2009 (PCV7 period) and 2012–2015 (PCV13 period). Costs were calculated according to 2014 Catalan Health Service rates using diagnostic-related groups. In total, 319 and 154 cases were collected, respectively. Pneumonia had the highest cost (65.7% and 62.0%, respectively), followed by meningitis (25.8% and 26.1%, respectively). During 2007–2015, the costs associated with PCV7 serotypes (Pearson coefficient ( $P_c$ ) =  $-0.79$ ;  $p = 0.036$ ) and additional PCV13 serotypes ( $P_c = -0.75$ ;  $p = 0.05$ ) decreased, but those of other serotypes did not ( $P_c = 0.23$   $p = 0.62$ ). The total mean cost of IPD increased in the PCV13 period by 31.4% (€3016.1 vs. €3963.9), mainly due to ICU stay (77.4%; €1051.4 vs. €1865.6). During the PCV13 period, direct IPD costs decreased due to a reduction in the number of cases, but cases were more

severe and had a higher mean cost. During 2015, IPD costs increased due to an increase in the costs associated with non-PCV13 serotypes and serotype 3 and this requires further investigation.

**Keywords:** PCV7; PCV13; invasive pneumococcal disease; direct cost

---

## 1. Introduction

Invasive pneumococcal disease (IPD) is a major cause of morbidity and mortality in children aged < 5 years and occurs mostly as pneumonia or other serious forms such as meningitis, bacteremia or osteoarticular infections. In 2000, 14.5 million cases of IPD were estimated to have occurred in children aged < 5 years, causing 7,350,000 deaths [1]. Subsequently, following the introduction of pneumococcal polysaccharide conjugated vaccines (PCV) in 2015, 3.7 million episodes of IPD were estimated in this age group, causing 294,000 deaths [2]. Despite this reduction, deaths attributable to *Streptococcus pneumoniae* in 2015 accounted for 11% of deaths in children aged < 5 years not infected with HIV. Incidence and mortality rates are higher in developing countries and most deaths occur in the African and Asian regions [3]. The European Medicines Agency (EMA) licensed the seven-valent PCV (PCV7) in February 2001 [4] and, in April and December 2009, the 10-valent PCV (PCV10) [5] and the 13-valent PCV (PCV13) [6], respectively. During 2017, the incidence rate of IPD in Europe was 14.5 cases per 100,000 persons in children aged < 1 year, and 24% of cases in children aged < 5 years were due to PCV13 serotypes [7].

Studies show that, after the introduction of PCV10 and PCV13, there was a decrease in IPD incidence in children and adults [8–15]. However, some reports have observed an increase in IPD in children aged < 5 years due to non-PCV13 serotypes [16].

While the licensing of PCVs has led to numerous changes in the epidemiology of IPD, which have been extensively studied microbiologically and epidemiologically, there are few studies of the costs of IPD [17], which may imply an underestimate of the disease itself and, as a consequence, of the effect of these vaccines.

The costs of IPD vary greatly depending on the geographical scope and design of the study. Each region has its own health policies, its own health system, and its epidemiologic reality in terms of circulating serotypes [18]. This makes it difficult to extrapolate cost studies from one region to another. Likewise, many cost studies only refer to cases of invasive pneumonia in children [19] or are included in studies covering the total cost of community-acquired pneumonia in children and adults [20,21]. Other cost studies that reflect the total clinical manifestations of IPD focus only on adults [22,23].

The objective of this study was to estimate the costs of IPD cases requiring hospital admission in children aged < 5 years in high-tech pediatric hospitals in Catalonia (Spain) following the licensing of the PCV7 and PCV13 and to compare and identify the differences between the two periods and the main factors that may involve variations in the costs of IPD, both globally and in the mean cost per case.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Design

A prospective study was conducted in children aged < 5 years diagnosed with IPD in two periods. The first period was between 1 January 2007 and 31 December 2009 and corresponded to the period in which the vaccine licensed was PCV7. The second, from 1 January 2012 to 31 December 2015, corresponded to the period in which the vaccine licensed was PCV13. In both periods, two high-tech pediatric hospitals in Catalonia participated, namely the Sant Joan de Déu Hospital and the Vall d'Hebron Mother-Child Hospital, which account for 31.9% of hospital discharges in Catalonia of children aged < 5 years during the first period and 28.9% during the second period, according to data provided by the Minimum Basic Data Set of Hospital Discharges [24]. The present study was

conducted as a secondary analysis and is based on the data of two prospective studies performed by the same research group so all cases included were collected prospectively and consecutively during the two periods.

## 2.2. Case Selection

Patients aged < 5 years hospitalized with a diagnosis of IPD during the study periods in the two participating centers were recruited. IPD was defined as clinical findings of infection together with isolation and/or detection of DNA of the pneumolysin gene (ply) and a wzg capsular gene (cpsA) of *S. pneumoniae* by real-time PCR in a normally sterile sample according to the methodology described [25,26]. The strains of *S. pneumoniae* isolated by culture were serotyped using the Quellung reaction or dot blot by the National Center for Microbiology, Majadahonda, Madrid [27]. Identification of the *S. pneumoniae* serotype in samples with negative culture and positive PCR was made by PCR in accordance with the previously reported methodology [25,28].

## 2.3. Demographic, Clinical and Epidemiological Variables

The following demographic, clinical and epidemiological variables were recorded for each case: age, sex, date of birth, date of symptom onset, previous care in other hospitals, hospitalization date, clinical form of IPD (meningitis, septic shock, pneumonia, complicated pneumonia, osteoarticular infection, occult bacteremia and others), complications, intensive care unit (ICU) admission and length of stay, and pre- and post-admission antibiotic therapy (days of treatment and antibiotics administered).

## 2.4. Statistical Analysis

Differences between the two study periods in the demographic, clinical, and epidemiological variables were analyzed using Pearson's chi-square test for categorical variables and the Student's t-test for continuous variables. The annual evolution of the costs associated with IPD was analyzed by simple linear regression. The linear relationship was checked by ANOVA tests, and Pearson's correlation coefficients (Pc) were obtained. The 95% confidence intervals (CIs) were calculated, and values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. The analyses were conducted using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS 19.0).

## 2.5. Economic Analysis

The costs of IPD cases were calculated taking into account the following health service resource use: hospitalization (differentiating between hospitalization in acute hospital, ICU stay and hospitalization in high-tech hospital), interhospital transfer, follow-up medical visits, and outpatient treatment with antibiotics. The unit costs of each resource were the rates published by the Catalan Health Service for the provision of health services through the network of public hospitals and other suppliers.

The cost of hospitalization was estimated using the diagnostic-related group (DRG) methodology. This method is based on two concepts: the relative resource intensity (RRI), which takes into account the complexity of the cases attended, and the intensity relative hospital intensity (RHI), which measures the structure that hospital has to address the disease. Both concepts are regulated annually by the Catalan Health Service [29].

The mean cost per hospital discharge for each facility was calculated using the following formula [30].

$$\text{Mean Hospital Discharge Cost} = 65\% \text{ RHI} + 35\% \text{ RRI} \quad (1)$$

Sant Joan de Déu and Vall d'Hebron are classified as high technology hospitals (Group 4). The mean costs per hospital discharge and the number of cases treated in each hospital were considered, and the weighted average was obtained so that the same unit cost was allocated to the hospital discharge regardless of the period in which the patient entered. The mean costs per hospital discharge related to prior hospitalization were calculated using their own RHI and RRI values.

The 2014 RRI and RHI indices were applied, and costs were expressed as 2014 euros [30]. Days of acute hospitalization were differentiated from those of ICU hospitalization. The cost per hospital discharge included all diagnostic tests and pharmacological treatments required during hospitalization. The days of ICU stay were added to this cost.

The unit cost of follow-up visits after hospital discharge was considered according to the structural complexity of the hospital center [30], while the unit cost of a primary care center visit was the same for all Catalonia [31].

To establish the unit cost of inter-hospital transfer, we differentiated between scheduled and urgent services, defined as those that accounted for direct entry into the hospital ICU. Since the amount of an urgent inter-hospital transfer is not published in the official documents, it was estimated to be twice the amount of a non-urgent transfer [32,33].

The unit cost of administering outpatient antibiotics was calculated from the public sale price of the prescribed generic antibiotic and only the portion financed by the Catalan Health Service was charged as a cost.

### 2.6. Data Confidentiality and Ethical Aspects

No diagnostic tests were made or samples taken from any participant in addition to those required by routine care. The study complies with the principles of the Declaration of Helsinki and the legal structure according to international human rights and biomedicine and personal data protection legislation.

The Ethics Committee of Hospital Sant Joan de Déu approved the study (CEIC PIC-52-11; approved on 14/11/2011). Informed consent signed by parents or legal guardians was given for all participants. All data were treated as confidential and records were accessed anonymously.

## 3. Results

During the two study periods, 473 cases were collected: 319 (67.4%) during the first period (88 in 2007, 98 in 2008, and 133 in 2009) and 154 (32.6%) during the second (45 in 2012, 34 in 2013, 35 in 2014, and 40 in 2015). The first half of Table 1 shows the clinical and sociodemographic characteristics of patients included: 56.4% (267) of the cases were male and 43.6% (206) female. Patients aged < 1 year accounted for 16.3% of cases (77 cases), patients aged 12–23 months for 26.8% (127 cases), and patients aged 24–59 months 56.9% (269 cases). In total, 303 (64.1%) cases were treated at Sant Joan de Déu and 170 (35.9%) at Vall d'Hebron. In both study periods, pneumonia was the most common clinical presentation (79.6% and 67.5%, respectively) followed by meningitis (9.1% and 11.7%, respectively). The highest percentage of meningitis cases were in 2013 and 2015, 20.6% and 15.0%, respectively (annual data provided on demand).

Of the 319 IPD cases in the first period, 300 (94.0%) were serotyped. Of these, 27 (9%) were PCV7 serotypes, 182 (60.7%) were serotypes added to the PCV13, and 91 (30.3%) were non-PCV13 serotypes. During the second period, 149 (96.7%) cases were serotyped; 19 (12.7%) were PCV7 serotypes, 70 (47.0%) were serotypes added to the PCV13, and 60 (40.3%) were non-PCV13 serotypes.

### 3.1. Health Resources Associated with IPD

The second half of Table 1 shows the health resources associated with IPD in the study periods. During the second study period, there was a higher proportion of patient transfers from their hospital of origin to one of the two study hospitals (24.1% vs. 33.8%;  $p = 0.028$ ), especially for meningitis (24.1% vs. 55.6%;  $p = 0.029$ ). The proportion of urgent transfers was higher during the second study period both overall (14.3% vs. 38.5%;  $p = 0.002$ ), and for pneumonia (4.4% vs. 22.2%;  $p = 0.008$ ) (data on clinical entity provided on demand).

**Table 1.** IPD patient characteristics and health resource use in the two study periods.

Variable	PCV7 Period <sup>1</sup> (319 Cases)	PCV13 Period <sup>2</sup> (154 Cases)	<i>p</i> Value
Sex			
Female	148 (46.4%)	58 (37.7%)	0.073
Male	171 (53.6%)	96 (62.3%)	
<b>Mean age (SD)</b>	29.6 (15.7)	26.7 (16.0)	0.057
<b>Clinical presentation</b>			
Meningitis	29 (9.1%)	18 (11.7%)	0.273
Septic shock	3 (0.3%)	4 (2.6%)	0.222
Pneumonia	254 (79.6%)	104 (67.5%)	0.004
Non-focal bacteremia	25 (7.8%)	16 (10.4%)	0.355
Osteoarticular infection	6 (1.9%)	7 (4.5%)	0.097
Mastoiditis	-	5 (3.2%)	-
Orbital cellulitis	2 (0.6%)	-	-
<b>ICU admission</b>	44 (13.8%)	37 (24.0%)	0.006
<b>Median ICU stay (SD)</b>	0.8 (3.1)	1.6 (5.5)	0.086
<b>Hospital transfer</b>	77 (24.1%)	52 (33.8%)	0.028
Urgent transfer	11 (3.4%)	20 (13.0%)	>0.001
Non-urgent transfer	66 (20.7%)	32 (20.8%)	0.982
<b>Mean days of previous hospitalization (SD)</b>	0.8 (2.0)	0.7 (2.2)	0.587
<b>Mean days of high-tech hospital hospitalization (SD)</b>	9.8 (6.3)	10.6 (7.5)	0.226
<b>Outpatient treatment</b>	265 (83.1%)	124 (80.5%)	0.496
<b>Follow up visits</b>			
Primary care	72 (22.6%)	42 (27.3%)	0.263
Specialist	247 (77.4%)	112 (72.7%)	

IPD, Invasive pneumococcal disease; <sup>1</sup> 2007–2009; <sup>2</sup> 2012–2015.

More cases were admitted to the ICU during the second study period overall (13.8% vs. 24.0%;  $p = 0.006$ ) and for cases of pneumonia (5.5% vs. 16.3%;  $p = 0.001$ ). The mean number of ICU days per patient during the first period was 0.8 days and peaked in 2009 (1.2 days). In 2007 and 2008, the mean ICU stay per patient was 0.5 days. During the second period, the mean number of ICU days per patient was 1.6. The mean days of ICU stay in 2012, 2013, 2014, and 2015 were 1.3, 2.1, 0.8, and 2.4 days, respectively.

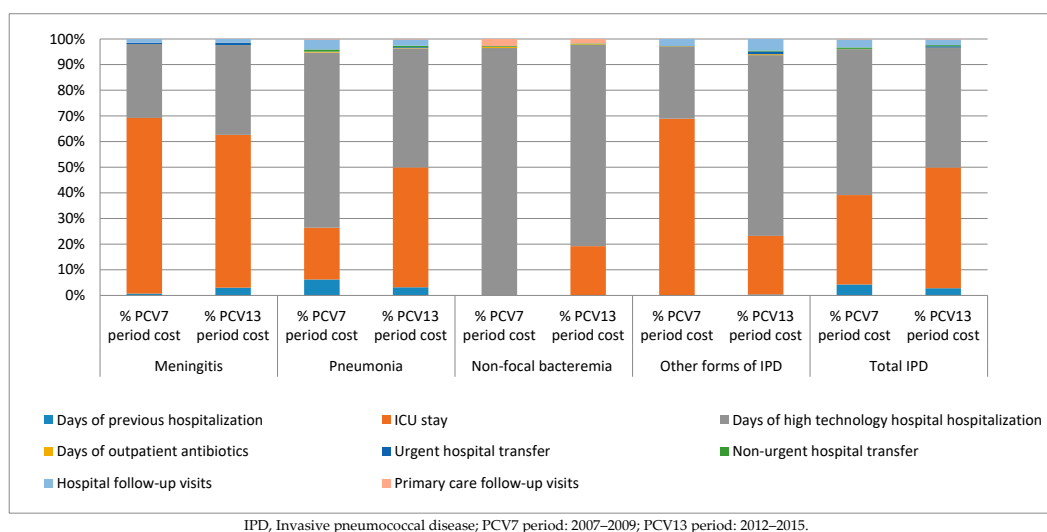
No significant differences were found between the two study periods in the mean duration of hospitalization and outpatient treatment according to the clinical presentation, except for meningitis, where the days of hospital antibiotic treatment were greater during the second study period (14.5 days vs. 22.6 days,  $p = 0.018$ ). There were no differences in hospital and primary care follow-up visits.

### 3.2. Distribution of the Cost of IPD According to Clinical form and Health Resources

During the two study periods, pneumonia was the clinical presentation with the highest cost (65.7% and 62.0%, respectively), followed by meningitis (25.8% and 26.1%, respectively), other forms of IPD (5.7% and 7.4%, respectively), and non-focal bacteremia (2.8% and 4.4%, respectively).

During the first period, the greatest overall costs were due to hospitalization in study hospitals (56.6%), days of ICU admission (34.9%), and days of previous hospitalization (4.3%). During the second

study period, the greatest overall costs were days of ICU admission (47.1%), hospitalization in study hospitals (46.6%), and days of previous hospitalization (2.8%) (Figure 1).



**Figure 1.** Total cost of IPD according to clinical presentation and study period.

For meningitis, in both study periods, the ICU stay generated the most costs (68.5% and 59.6%, respectively) followed by hospitalization in study hospitals (28.8% and 35.0%, respectively), and hospital follow-up visits (1.5%) during the first study period, and days of previous hospitalization (3%) in the second period.

For pneumonia, the ICU stay went from second to first position as the service that generated the most costs (20.2% during the first study period and 46.7% during the second).

For non-focal bacteremia, days of hospitalization (96.4%) were the costliest service during the first study period, followed by primary care follow-up visits (2.8%) and days of outpatient antibiotic treatment (0.5%). During the second study period, days of hospitalization (78.4%) were the costliest service, days of ICU stay (19.2%) occupied the second place, followed by primary care follow-up visits (1.8%).

### 3.3. Annual Evolution of the Costs Associated with IPD

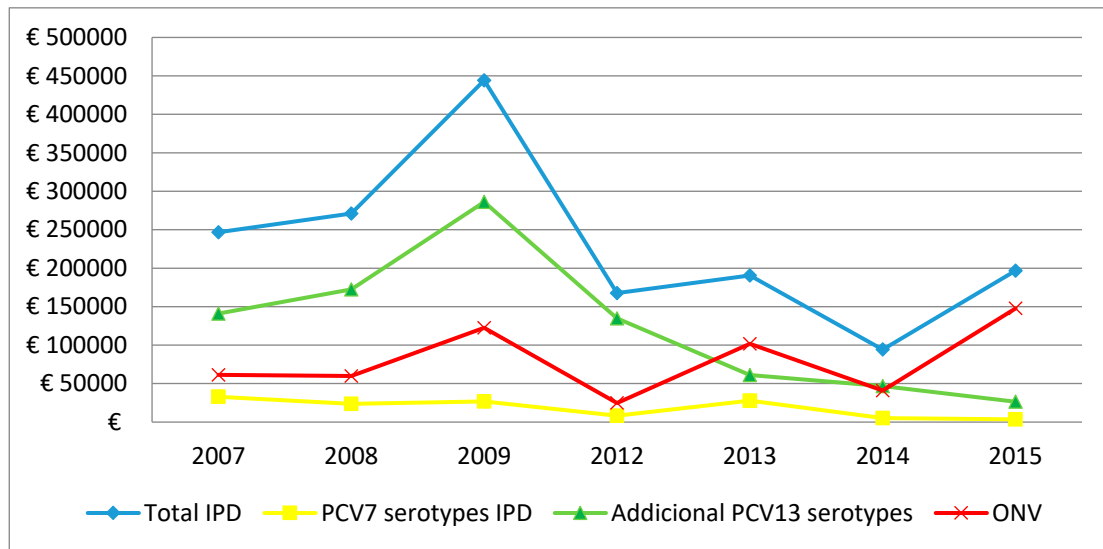
The evolution of the total annual costs associated with IPD during the two study periods is shown in Table 2. The direct costs associated with IPD peaked in 2009. The highest per-patient costs were recorded in 2013 and 2015.

**Table 2.** Annual evolution of costs associated with IPD according to health resources.

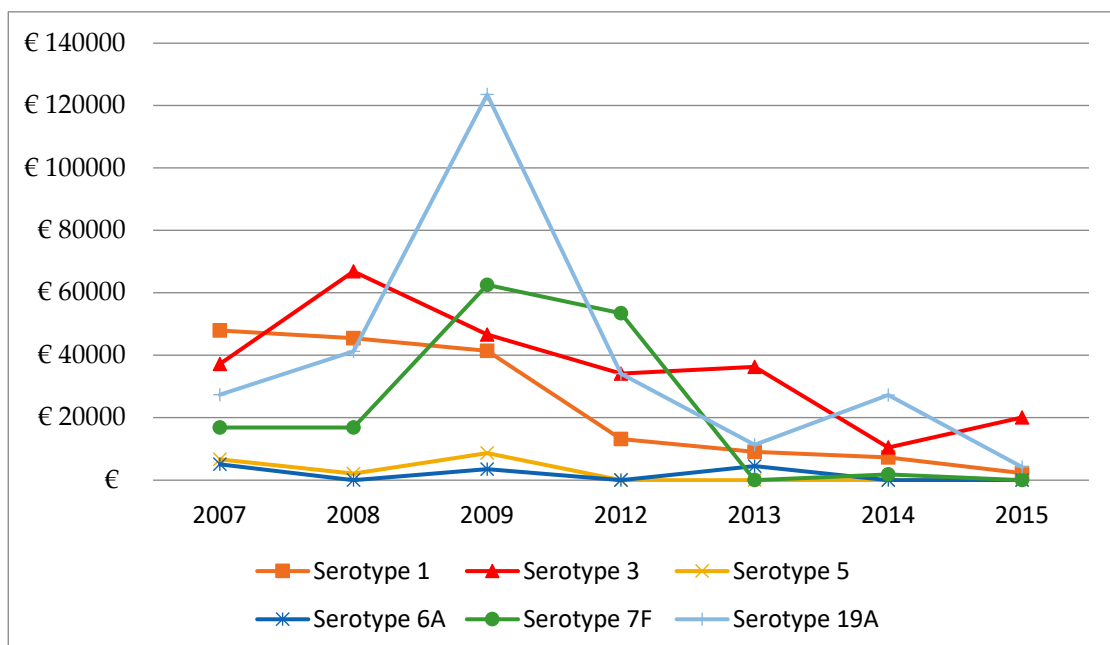
Year (Cases)	2007 (88)	2008 (98)	2009 (133)	2012 (45)	2013 (34)	2014 (35)	2015 (40)
Days of previous hospitalization	€16,750.4	€12,723.8	€11,596.4	€5959.3	€4026.5	€805.3	€6281.4
ICU stay	€58,500.0	€67,600.0	€209,300.0	€75,400.0	€93,600.0	€35,100.0	€122,200.0
Days of high technology hospital hospitalization	€160,566.3	€176,936.4	€207,238.5	€80,109.0	€87,597.5	€54,334.8	€62,345.7
Days of outpatient antibiotics	€493.1	€621.5	€809.3	€328.7	€171.9	€190.2	€218.6
Urgent hospital transfer	€327.0	€490.6	€981.1	€654.1	€981.1	€817.6	€817.6
Non-urgent hospital transfer	€1635.2	€1880.5	€1880.5	€899.4	€735.8	€327.0	€654.1
Hospital follow-up visits	€7830.0	€10,461.3	€11,359.9	€4043.3	€3209.0	€2374.7	€3979.2
Primary care follow-up visits	€660.0	€390.0	€1110.0	€330.0	€270.0	€420.0	€240.0
Total	€246,761.9	€271,104.2	€444,275.6	€167,723.8	€190,591.8	€94,369.6	€196,736.5
Total per patient	€2804.1	€2766.4	€3340.4	€3728.0	€5605.6	€2696.3	€4981.4

IPD, Invasive pneumococcal disease; all costs in 2014 euro.

Depending on the health resources used, there was a decrease in all costs, except for urgent hospital transfers and the ICU stay. The decrease was significant in the costs related to prior hospitalization ( $P_c = -0.95$ ;  $p = 0.005$ ), hospitalization in study hospitals ( $P_c = -0.90$ ;  $p = 0.006$ ), days of outpatient antibiotic treatment ( $P_c = -0.81$ ;  $p = 0.026$ ), non-urgent hospital transfers ( $P_c = -0.92$ ;  $p = 0.003$ ), and hospital follow-up visits ( $P_c = -0.84$ ;  $p = 0.017$ ). There was a significant decrease in the direct costs associated with PCV7 serotypes ( $P_c = -0.79$ ;  $p = 0.036$ ) but not in those associated with the serotypes added to the PCV13 ( $P_c = -0.75$ ;  $p = 0.05$ ) or in the total annual direct costs of IPD ( $P_c = -0.63$ ;  $p = 0.131$ ). The direct costs associated with non-PCV13 serotypes increased ( $P_c = 0.23$ ;  $p = 0.625$ ) (Figure 2A,B).



(A): IPD, Invasive pneumococcal disease.



(B): IPD, Invasive pneumococcal disease.

**Figure 2.** (A) Annual evolution of costs associated with IPD according to PCV serotypes; and (B) Annual evolution of costs associated with IPD according to PCV serotype.



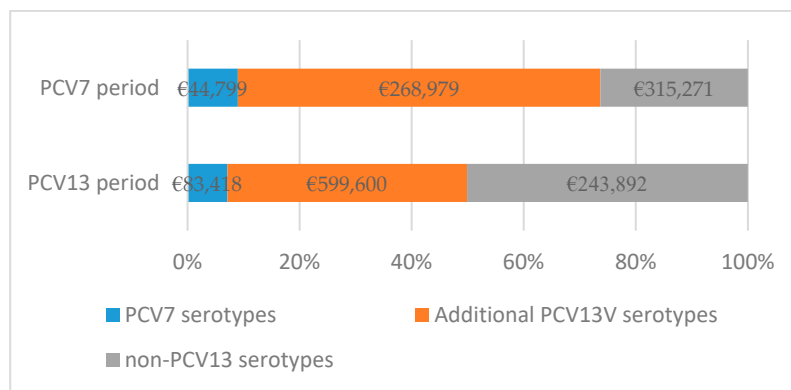
### 3.4. Variation in the Mean Cost of IPD

The total mean cost of IPD increased in the second study period by 31.4% (€3016.1 vs. €3963.9) (Table 3). The greatest increase in costs was for non-focal bacteremia (57.3%), followed by pneumonia (46.3%) and meningitis (3.2%). The costs of other focal IPDs fell by a mean of −42.8%.

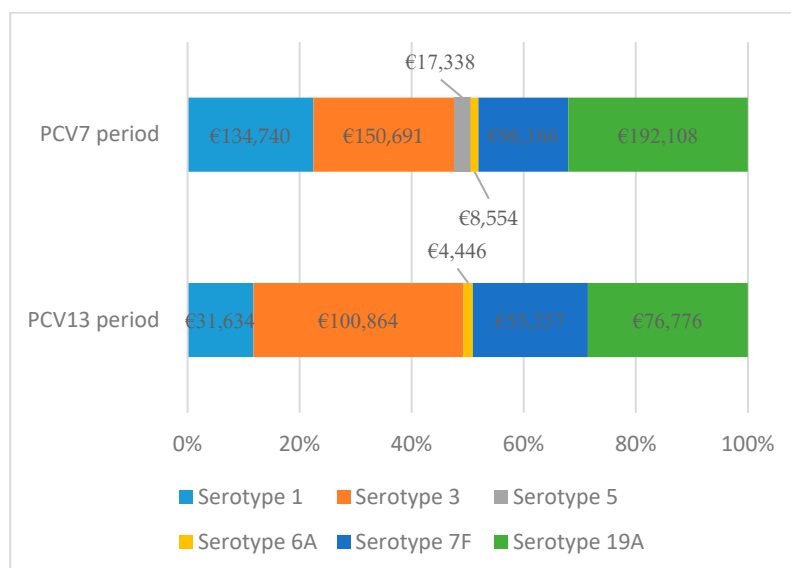
The greatest increases in costs were for urgent intra-hospital transfers (276.6%) and days of ICU stay (77.4%), due to the increase in these resources in treating pneumonia (551.3% and 238.9%, respectively). The costs of days of hospital stay in study hospitals increased by 8.1%, while those of hospitalization in pre-transfer hospitals decreased by 13.9% (Table 3).

### 3.5. Variation in the Proportion of Costs Associated with Serotypes

During the two study periods, the proportion of IPD costs caused by PCV7 serotypes decreased slightly (9.0%, and 7.1%, respectively), while there was an important decrease in the proportion of the costs associated with serotypes added to the PCV13 between the two periods (64.7% and 42.8%, respectively). The proportion of the cost of IPD caused by non-PCV13 serotypes increased in the second period (26.3% and 50.1%, respectively) (Figure 3A).



(A)



(B)

**Figure 3.** (A) Variation in the proportion of IPD costs according with PCV serotypes in the two study periods; and (B) variation in the proportion of IPD costs according with additional PCV13 serotypes in the two study periods.

**Table 3.** Variation in the mean cost of health resources associated with IPD according to clinical presentation and study period.

Health Resources	Meningitis			Pneumonia			Non-Focal Bacteremia			Other Focal IPD			Total		
	PCV7 Period	PCV13 Period	Percent	PCV7 Period	PCV13 Period	%	PCV7 Period	PCV13 Period	Percent	PCV7 Period	PCV13 Period	Percent	PCV7 Period	PCV13 Period	Percent
Days of previous hospitalization (SD)	€61.1 (174.4)	€268.4 (665.2)	339.4%	€154.7 (556.9)	€116.2 (312.9)	-24.9%	€0.0 (0.0)	€0.0 (0.0)	-	€0.0 (0.0)	€10.1 (40.3)	-	€128.7 (329.5)	€110.9 (347.2)	-13.9%
ICU stay (SD)	€5872.4 (7766.0)	€5272.2 (4356.8)	-10.2%	€501.6 (2915.1)	€1700.0 (8335.9)	238.9%	€325.0 (1300.0)	€3427.3 (7674.9)	-	€1051.4 (4070.2)	€1865.6 (7140.4)	-81.0%	€1051.4 (4070.2)	€1865.6 (7140.4)	77.4%
Days of high-tech hospitalization (SD)	€2474.1 (1871.2)	€3096.0 (1882.8)	25.1%	€1699.7 (976.8)	€1686.2 (935.9)	-0.8%	€1037.9 (644.7)	€1327.9 (1656.9)	27.9%	€1393.2 (678.9)	€2002.7 (1500.8)	43.7%	€1707.6 (1098.0)	€1846.7 (1305.9)	8.1%
Days of outpatient antibiotics (SD)	€0.7 (2.3)	€0.7 (2.4)	3.1%	€6.6 (3.8)	€6.5 (4.9)	-0.5%	€4.9 (3.9)	€4.9 (9.8)	-0.7%	€9.8 (9.8)	€10.1 (6.7)	3.4%	€6.0 (4.4)	€5.9 (5.3)	0.6%
Urgent hospital transfer (SD)	€39.5 (71.2)	€81.8 (84.1)	107.1%	€1.9 (17.7)	€12.6 (43.8)	551.3%	€0.0 (0.0)	€0.0 (0.0)	-	€14.9 (49.3)	€30.7 (65.9)	106.2%	€5.6 (29.9)	€21.2 (55.1)	276.6%
Non-urgent hospital transfer (SD)	€0.0 (0.0)	€4.5 (19.3)	-	€20.9 (55.7)	€22.0 (56.4)	5.2%	€3.3 (16.3)	€5.1 (20.4)	56.2%	€0.0 (0.0)	€10.2 (27.9)	-	€16.9 (33.2)	€17.0 (33.3)	0.4%
Hospital follow-up visits (SD)	€128.4 (0.0)	€128.4 (0.0)	0.0%	€96.5 (50.6)	€88.9 (55.3)	-7.9%	€0.0 (0.0)	€0.0 (0.0)	-	€128.4 (0.0)	€128.4 (0.0)	0.0%	€92.9 (53.7)	€88.3 (56.9)	-4.9%
Primary care follow-up visits (SD)	€0.00 (0.0)	€0.0 (0.0)	-	€5.6 (11.7)	€7.5 (13.0)	35.1%	€30.0 (0.0)	€30.0 (0.0)	0.0%	€0.0 (0.0)	€0.0 (0.0)	-	€6.8 (12.6)	€8.2 (13.4)	20.8%
Total (SD)	€8576.5 (9114.1)	€8852.0 (5135.7)	3.2%	€2487.5 (3118.6)	€3339.9 (8522.3)	46.3%	€1076.1 (648.9)	€1692.9 (2043.7)	57.3%	€4973.5 (7540.3)	€2842.1 (2256.6)	-42.8%	€3016.1 (4510.2)	€3963.9 (7493.6)	31.4%

IPD, Invasive pneumococcal disease; PCV7 period: 2007–2009; PCV13 period: 2012–2015.

Changes in the proportion of costs associated with serotypes added to the PCV13 were observed between the two study periods. In the first period, the serotypes that produced the highest costs were 19A and 3 (32.0% and 25.1% of the total cost, respectively) followed by serotype 1 (22.5% of the total cost). In the second period, serotype 3 accounted for 37.5% of the total costs associated with serotypes added to the PCV13 followed by serotype 19A (28.5%) and serotype 7F (20.5%) (Figure 3B).

#### 4. Discussion

Invasive pneumococcal disease entails a high cost for the health system. Our results show that, after the introduction of PCV13, the direct costs associated with IPD in children aged < 5 years in Catalonia (Spain) decreased globally and for all clinical presentations due to a reduction in the number of cases. These results are comparable to the decrease in hospitalizations observed by Baldo et al. [20] in children aged 0–4 years in the Veneto area. In both study periods, pneumonia was the costliest clinical presentation, followed by meningitis. However, meningitis had the highest mean cost, followed by pneumonia. The years 2013 and 2015 had the highest proportion of patients with a clinical presentation of meningitis and, therefore, the years with the highest cost per patient. This is consistent with the findings of Ceyhan et al. [34] and is due to the fact that meningitis is a more severe disease involving greater use of health resources. The fact that more than 60% of the costs of IPD in the two study periods were associated with pneumonia means that preventing this presentation alone would affect much of the cost associated with IPD. Hernandez et al. [35] found that an increase in pneumococcal pneumonia was associated with children aged 2–4 years in epidemic influenza periods. Consideration should be given to influenza vaccination in this age group, as the double objective of preventing influenza infection and the increase in associated cases of pneumococcal pneumonia would be achieved.

The health resources that generated the most costs varied from one study period to the other. During the first period, the days of hospitalization in study hospitals generated the highest costs. Lagos et al. [36] calculated that 70–75% of the total costs of IPD were due to days of hospitalization. During the second period, the health service that generated the highest costs was the ICU stay. This increase was particularly relevant for pneumonia, where not only the costs of the ICU stay increased but also those of urgent transfers. This, together with the small variations in the costs of the other study items implies greater severity in this type of clinical form. Brotons et al. [19] identified the ICU stay and complications during hospitalizations as factors that increased the cost of the clinical form of pneumonia. We found that the ICU stay was the factor that most increased the cost per IPD patient overall. The years that had the highest number of ICU days per patient also had the highest overall cost per patient.

The use of major health resources increased during the second study period, resulting in increased mean costs in general, as well as for meningitis, pneumonia, and non-focal bacteremia. Comparison of the two study periods showed that the factors that increased the most in the second period were the days of ICU admission and urgent health transfers, indicating that the severity of IPD, and therefore the costs, increased during the second study period. In addition, while the overall costs of IPD decreased between the first and second periods due to the reduction in the number of cases, the cases that occurred in the second period were more severe, consumed more health resources, and had a 31.4% higher mean cost. Although some authors had already warned of a possible increase in the severity of IPD after the introduction of PCV [37], to the best of our knowledge, this is the first study in which this increase in severity has been quantified and reflected as an increase in costs.

Brotons et al. [19] and Song et al. [22] found that the time from symptom onset to hospital admission was not a determining factor in establishing the case severity and the consequent increase in costs. The increased severity of IPD cases during the second study period may be related to changes in the circulating serotypes following the introduction of the PCV13 [38]. In the PCV13 period, the direct cost associated with IPD in children aged < 5 years decreased significantly in IPD cases produced by PCV7 serotypes and, above all, in the serotypes added to the PCV13, but not from non-PCV13 serotypes. The increase in non-PCV serotypes cases, together with the reduction in PCV13 serotypes

associated with pneumonia (especially serotype 1) could also explain the increase in the diversity of the clinical presentations of IPD and the decrease in pneumonia cases during the second study period. The proportion of costs associated with the six serotypes added to the PCV13 during the second period remained much higher than that of the seven PCV7 serotypes. This might be explained by the licensing of the PCV7 in 2001, resulting in these serotypes being influenced for longer by the effects of the vaccine coupled with the replacement phenomenon, especially that produced by serotypes 1, 3, and 19A [39,40], which occurred, in our study, in 2009. In addition, the distribution of costs associated with IPD produced by the serotypes added to the PCV13 was very uneven. While the proportion of costs associated with serotype 1 decreased, the proportion associated with serotype 3, which is associated with complicated pneumonia [41], rose from 25.1% of the total costs of additional serotypes to 37.5%, and those of serotype 19A remained stable. This may be explained by the ineffectiveness of the vaccine against serotype 3 [42] and the number of vaccine failures recorded for serotypes 3 and 19A [43]. The increase in IPD costs during 2015, with no decrease in vaccine coverage [35], may be a turning point in the downward trend seen since the licensing of PCV13. The increase in costs could be explained by the increase in the costs associated with non-PCV13 serotypes and the serotype 3, the costs of which appear to have increased by the same proportion, as shown in Figure 2A,B. This change in the trend, together with the increased severity of cases, means that IPD surveillance should continue and new vaccines that include serotypes whose choice is based not only on their prevalence but also on the disease severity they cause, are necessary.

Possible confounding variables were taken into account in the interpretation of the results. Regarding the medical environment, in both study periods, the same hospitals participated; both centers were reference hospitals, a similar account of hospital discharges has been maintained, and medical care circuits did not vary and neither were other pediatric hospitals in the region growing or contracting during the study periods. The same research group participated in both study periods and there were no changes in the management of IPD pediatric patients. As our study was carried out only in high-tech hospitals, there may have been a bias to a higher cost of IPD, since the cost of hospitalization is higher than in other hospitals due to the resources available in these centers and there could have been a selection of the most serious cases of IPD. However, the costs associated with IPD in the form of pneumonia found (€3639.9) were similar to the €3909 found by Baldo et al. in a very similar region [20]. The possible selection of the most serious cases of IPD could also result in a selection of some IPD serotypes, but the evolution of the PCV7 serotypes, additional PCV13 serotypes, and non-PCV serotypes found in our study are similar to those of Catalonia as a whole [38]. PCV7 and PCV13 had the same price and in both study periods the vaccine was not included in the recommended schedule of the National Health System and, therefore, parents had to pay for it.

A limitation of the study is that, to determine the impact of PCV13 on the total direct costs of pneumococcal disease, we had no information on outpatient cases which, although having much lower unit costs, have a high prevalence that implies a large burden on the health system. However, the USA study by Huang et al. [44] found that pneumonia represented 22% of all cases but accounted for 72% of health system use, while outpatient diseases such as acute otitis media or sinusitis, which accounted for 75% of total pneumococcal disease, only accounted for 16% of direct medical costs. With regard to outpatient medication, we only considered antibiotic treatment as it must be dispensed under prescription (unlike other treatments such as antipyretics or anti-inflammatory drugs) and therefore its use could be associated with IPD. However, the costs of outpatient medication are very low compared with the total direct medical costs. Likewise, the effect of the PCV10 on the additional serotypes 1, 5, and 7F was not studied. However, in our setting, PCV10 coverage was approximately 4%, compared with 63.3% for the PCV13 [35,45]. Another limitation is that the results on the costs of IPD must be framed within our geographical area, since these are conditioned by our health system, health policies, circulating serotypes, and number of cases. However, this study may help to better understand the evolution of these costs.

## 5. Conclusions

Following the introduction of the PCV13, the direct costs associated with IPD in children aged < 5 years in Catalonia (Spain) decreased globally and for all clinical presentations due to a decrease in the number of cases. IPD cases during the PCV13 period were more severe, consumed more health resources, and had a higher mean cost. There was a significant decrease in the direct cost associated with IPD cases produced by PCV7 serotypes and the serotypes added to the PCV13, but not in non-PCV13 serotypes. The increase in costs during 2015 could be explained by the increase in the costs associated with non-PCV13 serotypes and serotype 3.

**Author Contributions:** Conceptualization, S.H., E.N., P.C., M.J. and Á.D.; Data curation, S.H., P.C. and C.I.; Formal analysis, S.H., E.N., I.A.-L. and A.S.-B.; Funding acquisition, Á.D., P.C. and J.J.G.-G.; Investigation, S.H., E.N., I.A.-L., P.C., Á.D., C.I., C.M.A., G.C., F.M.-L., J.J.G.-G., M.F.d.S., S.G.-P., M.C., S.U., J.M.-O., C.E., A.M.P. and L.S.; Methodology, E.N., S.H., I.A.-L. and A.S.-B.; Project administration, Á.D., P.C. and J.J.G.-G.; Resources, F.M.-L., M.F.d.S., G.C., C.E., C.M.A., S.H. and C.I.; Software, S.H. Supervision, S.H., E.N., I.A.-L., A.S.-B., Á.D., P.C. and M.J.; Validation, S.H., I.A.-L., A.S.-B., Á.D. and P.C.; Writing—original draft, S.H., E.N., I.A.-L. and Á.D.; and Writing—review and editing, A.S.-B., P.C., M.J., C.I., F.M.-L., J.J.G.-G., M.F.d.S., S.G.-P., M.C., S.U., J.M.-O., A.S.-R., C.E., A.M.P. and L.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the Plan Nacional I+D+I, ISCIII-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria (Projects PI06/1507 for 2007–2009 period and PI11/02081 and PI 11/2345 for 2012–2015 period) and cofunded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and the Catalan Agency for the Management of Grants for University Research AGAUR (Grants 2017 SGR 1342 and 2017 SGR 0742).

**Conflicts of Interest:** Fernando Moraga reports participation in expert meetings and symposiums organized by Pfizer and GSK. C.M.-A. reports grants from Pfizer laboratories and personal fees from GSK Laboratories, outside the submitted work. M.C. reports participation as an investigator in clinical trials from GSK and in expert meetings and symposiums organized by Pfizer and GSK. J.J.G.-G. reports personal fees from Pfizer. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results. All other authors declare no competing interests.

## References

- O'Brien, K.L.; Wolfson, L.J.; Watt, J.P.; Henkle, E.; Deloria Knoll, M.; McCall, N.; Lee, E.; Mulholland, K.; Levine, O.S.; Cherian, T.; et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: Global estimates. *Lancet* **2009**, *893*–902. [CrossRef]
- Wahl, B.; O'Brien, K.L.; Greenbaum, A.; Majumder, A.; Liu, L.; Chu, Y.; Lukšić, I.; Nair, H.; McAllister, D.A.; Campbell, H.; et al. Burden of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b disease in children in the era of conjugate vaccines: Global, regional, and national estimates for 2000–15. *Lancet Glob. Health* **2018**, *6*, e744–e757. [CrossRef]
- World Health Organization. Pneumococcal conjugate vaccines in infants and children under 5 years of age: WHO position paper—February 2019. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **2019**, *94*, 85–104.
- Summary of Prevenar 7 Product Characteristics. European Medicines Agency. Available online: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000323/WC500041558.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000323/WC500041558.pdf) (accessed on 6 July 2020).
- Summary of Synflorix Product Characteristics. European Medicines Agency. Available online: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Pro-duct\\_Information/human/000973/WC500054346.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Pro-duct_Information/human/000973/WC500054346.pdf) (accessed on 6 July 2020).
- Summary of Prevenar 13 Product Characteristics. European Medicines Agency. Available online: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/prevenar-epar-summary-public\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/prevenar-epar-summary-public_en.pdf) (accessed on 6 July 2020).
- European Centre for Disease Prevention and Control. *Invasive Pneumococcal Disease*; Annual Epidemiological Report for 2017; ECDC: Solna, Sweden, 2019; Available online: [https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER\\_for\\_2017-invasive-pneumococcal-disease.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2017-invasive-pneumococcal-disease.pdf) (accessed on 6 July 2020).
- Ben-Shimol, S.; Greenberg, D.; Givon-Lavi, N.; Schlesinger, Y.; Somekh, E.; Aviner, S.; Miron, D.; Dagan, R. Early impact of sequential introduction of 7-valent and 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on IPD in Israeli children <5 years: An active prospective nationwide surveillance. *Vaccine* **2014**, *32*, 3452–3459. [CrossRef]

9. Fortunato, F.; Martinelli, D.; Cappelli, M.G.; Cozza, V.; Prato, R. Impact of pneumococcal conjugate universal routine vaccination on pneumococcal disease in Italian children. *J. Immunol. Res.* **2015**. [[CrossRef](#)]
10. Griffin, M.R.; Mitchel, E.; Moore, M.R.; Whitney, C.G.; Grijalva, C.G. Declines in pneumonia hospitalizations of children aged <2 years associated with the use of pneumococcal conjugate vaccines—Tennessee, 1998–2012. *MWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* **2014**, *63*, 995–998.
11. Lepoutre, A.; Varon, E.; Georges, S.; Dorléans, F.; Janoir, C.; Gutmann, L.; Lévy-Bruhl, D. Impact of the pneumococcal conjugate vaccines on invasive pneumococcal disease in France, 2001–2012. *Vaccine* **2015**, *33*, 359–366. [[CrossRef](#)]
12. Guevara, M.; Ezpeleta, C.; Gil-Setas, A.; Torroba, L.; Beristain, X.; Aguinaga, A.; García-Irure, J.J.; Navascués, A.; García-Cenoz, M.; Castilla, J. Reduced incidence of invasive pneumococcal disease after introduction of the 13-valent conjugate vaccine in Navarre, Spain, 2001–2013. *Vaccine* **2014**, *32*, 2553–2562. [[CrossRef](#)]
13. Moore, M.R.; Link-Gelles, R.; Schaffner, W.; Lynfield, R.; Lexau, C.; Bennett, N.M.; Petit, S.; Zansky, S.M.; Harrison, L.H.; Reingold, A.; et al. Effect of use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children on invasive pneumococcal disease in children and adults in the USA: Analysis of multisite, population-based surveillance. *Lancet Infect. Dis.* **2015**, *15*, 301–309. [[CrossRef](#)]
14. Picazo, J.; Ruiz-Contreras, J.; Casado-Flores, J.; Negreira, S.; García-de-Miguel, M.J.; Hernández-Sampelayo, T.; Otheo, E.; Méndez, C. Expansion of serotype coverage in the universal pediatric vaccination calendar: Short-term effects on age- and serotype-dependent incidence of invasive pneumococcal clinical presentations in Madrid, Spain. *Clin. Vaccine Immunol.* **2013**, *20*, 1524–1530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Picazo, J.; Ruiz-Contreras, J.; Casado-Flores, J.; Giangaspro, E.; García-de-Miguel, M.J.; Hernández-Sampelayo, T.; Otheo, E.; Méndez, C. Impact of introduction of conjugate vaccines in the vaccination schedule on the incidence of pediatric invasive pneumococcal disease requiring hospitalization in Madrid 2007 to 2011. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2013**, *32*, 656–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Waight, P.A.; Andrews, N.J.; Ladhani, N.J.; Sheppard, C.L.; Slack, M.P.; Miller, E. Effect of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on invasive pneumococcal disease in England and Wales 4 years after its introduction: An observational cohort study. *Lancet Infect. Dis.* **2015**, *15*, 629. [[CrossRef](#)]
17. van de Vooren, K.; Duranti, S.; Curto, A.; Garattini, L. Cost effectiveness of the new pneumococcal vaccines: A systematic review of European studies. *Pharmacoeconomics* **2014**, *32*, 29–45. [[CrossRef](#)]
18. Zhang, S.; Sammon, P.M.; King, I.; Andrade, A.L.; Toscano, C.M.; Araujo, S.N.; Sinha, A.; Madhi, S.A.; Khandaker, G.; Yin, J.K.; et al. Cost of management of severe pneumonia in young children: Systematic analysis. *J. Glob. Health* **2016**, *6*, 010408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Brotons, P.; Gelabert, G.; Launes, C.; Sicuri, E.; Pallares, R.; Muñoz-Almagro, C. Cost of hospitalizing children with invasive pneumococcal pneumonia. *Vaccine* **2013**, *31*, 1117–1122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Baldo, V.; Cocchio, S.; Baldovin, T.; Buja, A.; Furlan, P.; Bertonecello, C.; Russo, F.; Saia, M. A population-based study on the impact of hospitalization for pneumonia in different age groups. *BMC Infect. Dis.* **2014**, *14*, 485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Spoorenberg, S.M.; Bos, W.J.; Heijligenberg, R.; Voorn, P.G.; Grutters, J.C.; Rijkers, G.T.; van de Garde, E.M. Microbial aetiology, outcomes, and costs of hospitalisation for community-acquired pneumonia; an observational analysis. *BMC Infect. Dis.* **2014**, *14*, 335. [[CrossRef](#)]
22. Song, J.Y.; Choi, J.Y.; Lee, J.S.; Bae, I.G.; Kim, Y.K.; Sohn, J.W.; Jo, Y.M.; Choi, W.S.; Lee, J.; Park, K.H.; et al. Clinical and economic burden of invasive pneumococcal disease in adults: A multicenter hospital-based study. *BMC Infect. Dis.* **2013**, *13*, 202. [[CrossRef](#)]
23. Calderón, C.; Dennis, R. Economic cost of *Streptococcus pneumoniae* community-acquired pneumonia, meningitis and bacteremia in an adult population that required hospitalization in Bogotá, Colombia. *Biomedica* **2014**, *34*, 92–101. [[CrossRef](#)]
24. Registre del Conjunt Mínim Bàsic de Dades (CMBD) dels Hospital D'aguts. Servei Català de la Salut. 2016. Available online: <http://catsalut.gencat.cat/ca/proveïdors-professionals/registres-catalegs/registres/cmbd/info-rmes-anuals/> (accessed on 6 July 2020).
25. 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**, *14*, 828–834. [[CrossRef](#)]



26. World Health Organization. *Neisseria Meningitidis, Streptococcus Pneumoniae, Diagnosis of Meningitis Caused by Laboratory Methods for the and Haemophilus Influenzae: WHO Manual*, 2nd ed.; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2019; Available online: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70765/WHO\\_IVB\\_11.09\\_eng.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70765/WHO_IVB_11.09_eng.pdf?sequence=1) (accessed on 6 July 2020).
27. Fenoll, A.; Jado, I.; Vicioso, D.; Casal, J. Dot blot assay for the serotyping of pneumococci. *J. Clin. Microbiol.* **1997**, *35*, 764–766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Selva, L.; Berger, C.; Garcia-Garcia, J.J.; de Paz, H.; Nadal, D.; Muñoz-Almagro, C. Direct identification of *Streptococcus pneumoniae* capsular types in pleural fluids by using multiplex PCR combined with automated fluorescence-based capillary electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 2736–2737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. DECRET 170/2010, de 16 de Novembre, de Regulació del Sistema de Pagament dels Convenis i Contractes de Gestió de Serveis Assistencials en l'àmbit del Servei Català de la Salut. Available online: <https://portaljuridic.gencat.cat/eli/es-ct/d/2010/11/16/170> (accessed on 6 July 2020).
30. ORDRE SLT/79/2014, de 12 de Març, per la Qual es Determinen per a L'any 2014 els Preus Unitaris i la Resta de Valors a Què es Refereix L'article 5 del Decret 170/2010, de 16 de Novembre, de Regulació del Sistema de Pagament de Serveis Sanitaris en L'àmbit del Servei Català de la Salut. Available online: <https://portaljuridic.gencat.cat/eli/es-ct/o/2014/03/12/slt79> (accessed on 6 July 2020).
31. Navas, E.; Torner, N.; Broner, S.; Godoy, P.; Martínez, A.; Bartolomé, R.; Domínguez, A.; Working Group for the Study of Outbreaks of Acute Gastroenteritis in Catalonia (Spain). Economic costs of outbreaks of acute viral gastroenteritis due to norovirus in Catalonia (Spain), 2010–2011. *BMC Public Health* **2015**, *15*, 999. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ordre SLT/99/2013, de 24 de Maig, per la Qual S'estableixen per a L'any 2013 les Tarifes Màximes dels Serveis de Transport Sanitari no Urgent que Convingui o Contracti el Servei Català de la Salut. Available online: <https://portaljuridic.gencat.cat/eli/es-ct/o/2013/05/24/slt99> (accessed on 6 July 2020).
33. ORDRE SLT/78/2014, de 12 de Març, per la qual es Prorroguen per a L'any 2014 les Tarifes Màximes Corresponents a la Prestació i Concertació de Determinats Serveis Sanitaris. Available online: <https://portaljuridic.gencat.cat/eli/es-ct/o/2014/03/12/slt78> (accessed on 6 July 2020).
34. Ceyhan, M.; Ozsurekci, Y.; Aykac, K.; Hacibedel, B.; Ozbilgili, E. Economic burden of pneumococcal infections in children under 5 years of age. *Hum. Vaccin Immunother.* **2018**, *14*, 106–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hernández, S.; Muñoz-Almagro, C.; Ciruela, P.; Soldevila, N.; Izquierdo, C.; Codina, M.G.; Díaz, A.; Moraga-Llop, F.; García-García, J.J.; Domínguez, Á. Invasive pneumococcal disease and influenza activity in a pediatric population: Impact of PCV13 vaccination in pandemic and nonpandemic influenza periods. *J. Clin. Microbiol.* **2019**, *57*, e00363-19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lagos, R.; Muñoz, A.; Espinoza, A.; Dowes, A.; Ruttimann, R.; Colindres, R.; Levine, M.M. Direct medical costs of invasive pneumococcal disease and radiologically-diagnosed pneumonia among Chilean children. *Rev. Panam Salud Pública* **2009**, *26*, 101–111. [[CrossRef](#)]
37. Ricketson, L.J.; Conradi, N.G.; Vanderkooi, O.G.; Kellner, J.D. Changes in the nature and severity of invasive pneumococcal disease in children before and after the seven-valent and thirteen-valent pneumococcal conjugate vaccine programs in Calgary, Canada. *Pediatr. Infect Dis. J.* **2018**, *37*, 22–27. [[CrossRef](#)]
38. Ciruela, P.; Izquierdo, C.; Broner, S.; Muñoz-Almagro, C.; Hernández, S.; Ardanuy, C.; Pallarés, R.; Domínguez, A.; Jané, M.; Catalan Working Group on Invasive Pneumococcal Disease. The changing epidemiology of invasive pneumococcal disease after PCV13 vaccination in a country with intermediate vaccination coverage. *Vaccine* **2018**, *36*, 7744–7752. [[CrossRef](#)]
39. 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**, *46*, 174–182. [[CrossRef](#)]
40. Feikin, D.R.; Kagucia, E.W.; Loo, J.D.; Link-Gelles, R.; Puhon, M.A.; Cherian, T.; Levine, O.S.; Whitney, C.G.; O'Brien, K.L.; Moore, M.R.; et al. Serotype-specific changes in invasive pneumococcal disease after pneumococcal conjugate vaccine introduction: A pooled analysis of multiple surveillance sites. *PLoS Med.* **2013**, *10*, e1001517. [[CrossRef](#)]
41. Goettler, D.; Streng, A.; Kemmling, D.; Schoen, C.; von Kries, R.; Rose, M.A.; van der Linden MLiese, J.G. Increase in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 associated parapneumonic pleural effusion/empyema after the introduction of PCV13 in Germany. *Vaccine* **2020**, *38*, 570–577. [[CrossRef](#)]

42. Domínguez, Á.; Ciruela, P.; Hernández, S.; García-García, J.J.; Soldevila, N.; Izquierdo, C.; Moraga-Llop, F.; Díaz, A.; F de Sevilla, M.; González-Peris, S.; et al. Effectiveness of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in preventing invasive pneumococcal disease in children aged 7-59 months. A matched case-control study. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0183191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Hernández, S.; Moraga-Llop, F.; Díaz, A.; de Sevilla, M.F.; Ciruela, P.; Muñoz-Almagro, C.; Codina, G.; Campins, M.; García-García, J.J.; Esteva, C.; et al. Failures of 13-valent conjugated pneumococcal vaccine in age-appropriately vaccinated children 2–59 months of age, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **2020**, *26*, 1147–1155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Huang, S.S.; Johnson, K.M.; Ray, G.T.; Wroe, P.; Lieu, T.A.; Moore, M.R.; Zell, E.R.; Linder, J.A.; Grijalva, C.G.; Metlay, J.P.; et al. Healthcare utilization and cost of pneumococcal disease in the United States. *Vaccine* **2011**, *29*, 3398–3412. [[CrossRef](#)]
45. Savulescu, C.; Krizova, P.; Lepoutre, A.; Mereckiene, J.; Vestrheim, D.F.; Ciruela, P.; Ordobas, M.; Guevara, M.; McDonald, E.; Morfeldt, E.; et al. Effect of high-valency pneumococcal conjugate vaccines on invasive pneumococcal disease in children in SpIDnet countries: An observational multicentre study. *Lancet Respir. Med.* **2017**, *5*, 648–656. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).





## **5. DISCUSSIÓ**



L'objectiu d'aquesta memòria de tesi ha estat avaluar l'efecte de la VPC13 en l'epidemiologia de la MPI en la població pediàtrica de Catalunya. Al primer estudi, mitjançant un disseny de casos i controls, s'ha mesurat l'efectivitat de la VPC13 en la prevenció de la MPI causada pels serotips continguts en la vacuna. Al segon estudi s'han analitzat les característiques clíniques, microbiològiques i epidemiològiques de la pneumònia complicada amb vessament pleural i/o empiema en <18 anys, que és la presentació clínica de MPI més freqüent en el nostre entorn. Aquests dos estudis han servit de marc de referència per als altres tres estudis. Al tercer estudi s'han analitzat les diferències en la incidència, la presentació clínica, la severitat i els serotips causants d'MPI i l'impacte de la VPC13 en els períodes epidèmics i no epidèmics de grip entre 2012 i 2015 en <18 anys i en la població de 7 a 59 mesos, respectivament. S'ha constatat la importància de la pneumònia complicada durant els períodes epidèmics de grip i s'ha calculat la fracció evitada en població (FEp) de MPI. Al quart estudi s'han analitzat els casos de fallada vacunal en nens de 2 a 59 mesos arran de la falta d'efectivitat de la VPC13 enfront del serotip 3 i el pes creixent d'aquest serotip en la pneumònia complicada que s'havien observat al primer i al segon estudi. Al cinquè estudi s'ha mesurat l'impacte de la VPC13 en l'evolució dels costos hospitalaris directes de la MPI en < 5 anys comparant els costos de la MPI en l'Hospital Sant Joan de Déu i l'Hospital Maternoinfantil Vall d'Hebron en dos períodes: de 2007 a 2009 (període VPC7) i de 2012 a 2015 (període VPC13).

L'estudi de casos i controls aparellats en nens de 7 a 59 mesos ingressats en tres hospitals pediàtrics de Catalunya ha aportat tres resultats principals.

El primer és que l'efectivitat de la vacuna per prevenir la MPI produïda pels serotips continguts a la vacuna després de l'administració  $\geq 1$  dosis és bona (75,8%; IC 95% 54,1 a 87,2) i s'incrementa quan s'administren  $\geq 2$  dosis abans dels 12 mesos d'edat o 2 dosis a partir dels 12 mesos d'edat o 1 dosi a partir dels 24 mesos (90%; IC 95% 63,9 a 97,2). En el grup de 24-59 mesos aquest increment no només no s'ha produït, sinó que no s'ha trobat efectivitat en prevenir la MPI (83,5%; IC 95%, -19,5 a 97,7) probablement perquè el serotip 3 és més freqüent en aquesta franja d'edat. El fet que en el grup de 24-59 mesos per a la pauta de  $\geq 2$  dosis abans dels 12 mesos i d'una dosi després dels 12 mesos sí que hi ha efectivitat vacunal (EV) (73,4%; IC 95% 36,4 a 88,9) pot ser degut a que, tal com es presenta en el quart estudi, el 40% de les fallades vacunals en aquest grup d'edat s'han donat en casos amb un esquema vacunal de dues dosis entre els 12 i 24 mesos o una dosi després dels 24 mesos.

El segon és que l'EV de l'administració de  $\geq 1$  dosi de vacuna enfront dels tres serotips emergents a la nostra àrea geogràfica abans de la comercialització de la VPC13 ha estat elevada per al serotips 1 (89,0%; IC 95% 42,7 a 97,9) i 19A (86,0%; IC 95% 51,2 a 99,7), però la VCP13 no ha mostrat efectivitat per al serotip 3 (25,9%; IC 95% -65,3 a 66,8).

El tercer és que l'EV per al serotip 14 quan s'administra  $\geq 1$  dosi ha estat la més elevada (96,6%; IC 95% 70,4 a 99,7). Això considerem que és especialment rellevant, ja que a Catalunya és un serotip associat amb molta freqüència a la MPI <sup>163</sup>.

Els resultats del nostre estudi són similars als obtinguts en estudis observacionals realitzats a altres regions <sup>197-204</sup>. En estudis de casos i controls, l'EV va oscil·lar entre el 77% (95% IC, 38 a 91) obtinguda per Miller i col. <sup>198</sup> al Regne Unit en nens de 2,5 a 24 mesos que havien rebut una dosi a partir dels 12 mesos o  $\geq 1$  dosi abans dels 12 mesos i 1 dosi a partir dels 12 mesos, fins al 91% (IC 95% 61 a 99) estimada a l'estudi de Van der Linden i col. <sup>200</sup> a Alemanya en nens  $< 2$  anys que havien finalitzat la pauta vacunal. A l'estudi realitzat per Cohen i col. <sup>203</sup> a Sud Àfrica l'EV de la PCV13 en nens no infectats per VIH per als serotips 6 addicionals de la VPC13 va ser del 92% (IC 95% 40 a 99), un valor molt similar a l'EV obtinguda al nostre estudi un cop exclòs el serotip 3 (95,5%; IC 95% 38,4 a 99,7). Aquesta similitud respon a les diferències en la distribució de serotips causants de MPI a Sud Àfrica respecte a Catalunya, ja que allà el serotip 3 és molt poc freqüent.

L'EV per al serotip 19A, el tercer serotip més freqüent del nostre estudi, ha estat pràcticament igual per als nens que havien rebut  $\geq 1$  dosi de VPC13 que per als nens que havien rebut  $\geq 2$  dosis abans dels 12 mesos o dues dosis a partir dels 12 mesos (86,0%; IC 95% 51,2 a 99,7) o una dosi a partir dels 24 mesos (85,6%; IC 95% 6,7 a 99,8). En nens que havien rebut com a mínim  $\geq 2$  dosis abans dels 12 mesos i una dosi a partir dels 12 mesos l'interval de confiança ha inclòs el 0, fet que podria explicar-se pel al baix nombre de casos que tenim amb aquestes característiques.. Miller i col. <sup>198</sup> i Van der Linden i col. <sup>200</sup> van estimar una EV per al serotip 19A del 70% (IC 95% 10 a 90) i 88% (IC 95% 25 a 99) respectivament, mentre que l'efectivitat vacunal observada per Deceuninck i col. <sup>199</sup> no va resultar estadísticament significativa (68%; IC 95% -13 a 91). A l'estudi de cohorts indirecte d'Andrews i col. <sup>204</sup> a Anglaterra, Gal·les i Irlanda del Nord l'EV per al serotip 19A va ser del 67% (IC 95% 33 a 84).

Els resultats dels estudis per mesurar l'impacte poblacional de la vacunació amb VPC13 que s'han realitzat als països de l'Europa occidental entre 2010 i 2014 <sup>176</sup>, a

Alemanya entre 1992 i 2014 <sup>205</sup>, als Estats Units entre 2004 i 2013 <sup>206</sup>, a Portugal entre 2012 i 2014 <sup>207</sup> i a Anglaterra i Gal·les des de 2008 a 2014 <sup>208</sup> mostren una reducció important dels 6 serotips addicionals de la VPC13. La reducció dels casos produïts pel serotip 19A s'ha mostrat elevada tant en nens com en adults de 65 anys i més en diversos estudis <sup>176,205-209</sup>, fet que confirma que la VPC13 genera immunitat de grup per a aquest serotip. Estudis d'immunogenicitat previs ja havien mostrat un alt nivell d'eficàcia enfront aquest serotip <sup>204,210</sup>.

Un aspecte important del nostre estudi és que l'EV de totes les pautes estudiades contra els serotips continguts en la VPC13 i contra els serotips addicionals de la VPC13 ha augmentat quan s'ha exclòs el serotip 3 de l'anàlisi. Ja abans de la seva autorització, alguns autors van suggerir que aquest serotip era menys immunogen que la resta de serotips continguts a la VPC13 <sup>211</sup>. Al Canadà, un estudi realitzat en nens completament vacunats va mostrar que el nivell d'anticossos opsonitzants per al serotip 3 era inferior que per a la resta de serotips, la qual cosa suggeria que la protecció contra aquest serotip seria també inferior <sup>212</sup>. Un estudi realitzat a Espanya i Polònia també va mostrar que la resposta immunitària enfront del serotip 3 era clarament inferior a la de la resta de serotips i, especialment, a la del serotip 19A <sup>213</sup>.

En un assaig de doble cec que es va fer per comparar l'efectivitat de la VPC7 amb la de la VPC13 en la prevenció de la colonització de la nasofaringe per *S. pneumoniae* es van observar diferències en els nivells de colonització entre els nens vacunats i no vacunats en tots els serotips estudiats excepte en el serotip 3 <sup>214</sup>.

Com al nostre estudi, la VPC13 tampoc va mostrar efectivitat contra el serotip 3 en dos estudis de casos i controls <sup>198,200</sup> ni tampoc en un estudi de cohorts indirecte <sup>204</sup>. Moore i col. <sup>201</sup> en el seu estudi de casos i controls aparellats sí que van trobar que la VPC13 oferia una protecció significativa contra el serotip 3 (79,5%; IC 95% 30,3 a 93,1), però aquesta era més baixa que per als serotips 7F (96,5%; IC 95% 82,7 a 100) i 19A (85,6%; IC 95% 70,6 a 93,5). Andrews i col. <sup>204</sup> van trobar que l'EV de la VPC13 era estadísticament significativa per a tots els serotips excepte per al serotip 3 (26%; IC 95% -69 a 68). Segons aquests autors, la correlació immunològica de protecció d'aquest serotip (2,83 µg/ml, que rarament s'aconsegueix amb la vacunació), era superior al llindar de 0,35 µg/ml establert per als serotips PCV7.

A la majoria dels països de l'Europa occidental, la MPI causada pel serotip 3 s'ha mantingut estable o ha augmentat després de la introducció de la VPC13 <sup>176,215</sup>. Aquesta mateixa tendència també s'ha observat al Canadà i al Japó <sup>209,216</sup>. Cal destacar que a l'estudi d'impacte poblacional de Moore i col. <sup>206</sup> no es va trobar cap

reducció de la incidència de la malaltia causada pel serotip 3, tot i que els mateixos autors havien trobat que VPC13 era efectiva contra el serotip 3 en un estudi previ de casos i controls <sup>201</sup>. Waight i col.<sup>208</sup>, al Regne Unit, van observar una reducció de la incidència de MPI causada pel serotip 3 en tots els grups d'edat, però en nens de menys de 5 anys, els intervals de confiança van ser molt amplis (EV: 68%; IC 95% 0,6 a 89). Al present estudi, el 44,4% (12/27) dels nens amb MPI causada pel serotip 3 havien rebut 2 dosis de vacuna abans dels 12 mesos i una dosi després dels 12 mesos. Aquests resultats concorden amb els observats a un estudi realitzat a Grècia <sup>217</sup>, en el que un terç dels casos del serotip 3 que presentaven pneumònia amb vessament pleural estaven completament vacunats.

Les pneumònies complicades amb vessament pleural (VP) i/o empiema han estat la presentació clínica més freqüent de MPI en els < 18 anys al nostre estudi. El líquid pleural permet la detecció de *S. pneumoniae* per cultiu i especialment per real-time PCR<sup>102,112</sup> fins i tot en aquells casos en els quals no es detecten pneumococs a la sang. És per aquest motiu que *S. pneumoniae* es detecta amb més freqüència en pneumònies complicades amb efusió pleural que en pneumònia sense complicacions, que generalment no requereixen hospitalització i que solen tractar-se al domicili amb antibiòtics orals <sup>218</sup>. L'empiema ha afectat en una major proporció als nens de 2 a 17 anys, fet que és un reflex del tropisme clínic i de grups d'edat dels diferents serotips de *S. pneumoniae* <sup>219</sup>. L'increment en el nombre de casos d'empiema a Catalunya en l'època anterior a la VPC13 va ser causat, principalment, pel clon 306 del serotip 1 que és molt agressiu <sup>167,220</sup>. Al nostre estudi, el serotip 1 ha estat el més freqüent en el grup de 2 a 17 anys. En canvi, només s'ha registrat un cas en < 2 anys. Aquesta diferència pot ser deguda a una cobertura vacunal inferior observada en el grup de 2 a 17 anys juntament amb el caràcter invasiu i a la falta de poder colonitzador del serogrup 1 <sup>220</sup>.

La incidència acumulada entre 2012-2016 de pneumònia pneumocòccica en nens menors de 2 anys, 2-4 anys i 5-19 anys a Catalunya va ser de 41,0 ; 22,1 i 3,6 per 100.000 persones-any, respectivament <sup>163</sup>. La disminució progressiva de la incidència de pneumònia complicada per VP i/o empiema entre 2012 i 2015 observada en aquest estudi (IRR: 0,59; IC 95% 0,35 a 0,97; p= 0,003) ha coincidit amb l'augment progressiu de la cobertura de VPC13 (48,0% vs. 74,5%). L'anàlisi de l'evolució dels serotips causants de la majoria de pneumònies complicades amb VE i/o empiema mostra, també, una reducció dels serotips vacunals 1 i 19A, tot i que per a aquest últim no resulta estadísticament significativa. Aquests serotips continguts a la VPC13 posseeixen una gran virulència i eren els principals responsables dels casos de pneumònia complicada amb VP i/o empiema. La proporció del serotip 3 com a serotip

associat a la pneumònia complicada s'ha incrementat. Diversos estudis han demostrat que en l'era post VPC13 el serotip 3 continua produint MPI <sup>215,218,221</sup>. Antachopoulos i col. <sup>217</sup> van observar una alta incidència de pneumònia complicada causada pel serotip 3. En un terç d'aquests casos els pacients estaven correctament i completament vacunats amb VPC13. Això podria explicar-se per a la poca efectivitat de la VPC13 enfront del serotip 3 i per l'associació del serotip 3 i 19A a casos de fallada vacunal, tal com mostren els resultats del quart estudi de la present memòria de tesi.

Les complicacions més freqüents van ser insuficiència respiratòria aguda que va requerir ingrés a l'UCI i ventilació mecànica en els < 2 anys i pneumònia necrotitzant amb barotraumatisme posterior al grup de 2 a 17 anys. Aquestes dades són coincidents amb les publicades per altres autors <sup>218,219,222-225</sup>.

Estudis publicats recentment sobre pneumònia pneumocòccica complicada i sense complicacions mostren una reducció dels casos posterior a la introducció de la VPC13 <sup>218,219,221,226</sup>. Olarte i col. <sup>218</sup> van observar que als Estats Units els serotips vacunals van disminuir un 74% després de la introducció VPC13, sense que s'apreciés cap serotip no VPC13 emergent clar. Paral·lelament a la disminució dels serotips presents a la VPC13, el nostre estudi mostra un increment dels serotips no vacunals associats a pneumònies complicades amb vessament pleural i/o empiema entre 2012 i 2015. Aquest increment està fregant la significació estadística (14,0% vs. 33,3%;  $p=0,054$ ), però, igual que a l'estudi d'Olarte i col <sup>218</sup>, no destaca cap serotip en especial. A Anglaterra i Gal·les, Ladhani i col. <sup>171</sup> van observar un reemplaçament de serotips vacunals per serotips no inclosos a la VPC13, concretament els serotips 8, 9N, 10A i 12F. A Israel també s'ha descrit una alta incidència del serotip 12F després de la introducció de les VPC7 i VPC13 <sup>227</sup>.

Tal com han descrit altres autors <sup>218,219,221</sup>, les soques analitzades al nostre estudi presentaven una alta sensibilitat a la penicil·lina, fet que recolza a l'ús de penicil·lina o ampicil·lina parenteral com a tractament empíric de primera elecció.

L'estudi de la MPI durant els períodes epidèmics i no epidèmics de grip entre 2012 i 2015 ha mostrat un increment de la incidència de la MPI en < 18 anys coincidint amb els períodes en els quals la circulació de virus de la grip ha assolit nivells epidèmics (IRR: 2,7; IC 95% 2,05 a 3,55;  $p<0,001$ ). Aquesta associació ha estat més forta entre els nens de 2 a 4 anys (IRR: 3,33; IC 95% 2,12 a 5,19;  $p<0,001$ ) i, especialment, en el grup d'edat de 5 a 17 anys (IRR: 4,39; IC 95% 2,53 a 7,63;  $p<0,001$ ), però no ha estat significativa en < 2 anys. Els informes anuals aportats pel Pla d'Informació de les Infeccions Respiratòries Agudes a Catalunya (PIDIRAC) mostren que entre 2012 i



2015 el grup d'edat amb una major incidència acumulada de virus gripal ha estat el de < 4 anys <sup>228</sup>. Diversos autors han trobat una associació entre MPI i virus gripal <sup>229,230</sup> però sense que s'hagi analitzat de manera específica aquesta associació en els < 2 anys. Weinberger i col.<sup>155</sup> van mostrar que existeix una forta associació entre la circulació del virus respiratori sincicial (VRS) i els episodis de MPI en < 2 anys. Durant el període 2012-2015 els informes publicats pel Sistema de Notificació Microbiològica de Catalunya <sup>231</sup> van mostrar que el 84,9% dels casos d'infecció per VRS registrats a Catalunya es concentraven en < 2 anys i que el pic de màxima activitat del VRS precedia al període epidèmic gripal. La coincidència temporal entre VRS i MPI en < 2 anys podria explicar l'elevada taxa d'incidència (TI) observada durant els períodes no epidèmics de grip, molt superior a la TI total en aquest període (0,23 casos per 100.000 persones-setmana vs. 0,05 casos per 100.000 persones-setmana, respectivament). L'elevada TI en els <2 anys podria explicar que quan es comparen els períodes epidèmics i no epidèmics de grip no s'hagin observat diferències significatives.

El nostre estudi mostra una major TI de la MPI en els períodes epidèmics de grip, tant en general com en les diferents formes clíniques per separat. McCullers i col. <sup>145</sup> mitjançant models animals i Grijalva i col. <sup>144</sup> en un estudi de observacional van demostrar que el virus de la grip augmenta la transmissió de *S. pneumoniae* i, per tant, el risc de ser colonitzat pel microorganisme, pas previ al desenvolupament de la MPI. No obstant això, al nostre estudi l'increment en la incidència durant els períodes epidèmics de grip respecte als no epidèmics només ha estat estadísticament significatiu en la pneumònia (IRR: 3,25; IC 95% 2,36 a 4,47; p<0,001). Weinberger i col. <sup>232</sup> i Ben-Shimol i col. <sup>233</sup> postulen que la infecció respiratòria vírica només incrementa la susceptibilitat per a la pneumònia, plantejament que coincidiria amb els nostres resultats.

La gran variabilitat de serotips causants de la MPI trobats al nostre estudi, sense que cap d'ells sigui predominant durant els períodes epidèmics o no epidèmics de grip, suggereix que no hi ha una relació específica entre el virus de la grip i algun serotip en particular de *S. pneumoniae*. També cal considerar que durant el període d'estudi els subtipus de virus causants d'epidèmies gripals han variat <sup>228</sup>, sense que puguem descartar una relació específica entre serotips de pneumococ i subtipus virals. Launes i col. <sup>234</sup> van observar un descens significatiu de la proporció de MPI causada per serotip 1 durant la pandèmia de 2009. No obstant això, a la temporada de grip estacional posterior, causada pel mateix subtipus de grip H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>, el serotip 1 es va detectar en la mateixa proporció que en temporades anteriors. La presència de virus

gripal tampoc ha mostrat tenir influència sobre la proporció de serotips vacunals i no vacunals causants de la MPI.

Alguns autors <sup>231,235</sup> assenyalen que la infecció pel virus de la grip té un major efecte sobre els serotips que no tenen un alt poder invasiu (API). Aquest efecte es traduiria en que el virus gripal incrementaria la susceptibilitat de l'hoste a les infeccions bacterianes. Així doncs, mentre els serotips API serien capaços de causar MPI en qualsevol circumstància, els serotips no API augmentarien la capacitat de produir MPI en presència de virus gripal. Weinberger i col. <sup>231</sup> van trobar aquesta mateixa associació únicament en adults sense malalties de base. En un estudi realitzat a Catalunya abans de la introducció de la VPC13 <sup>235</sup> es va trobar associació entre la MPI causada per serotips no API i la confecció amb diferents virus respiratoris. Al nostre estudi, la proporció de serotips API ha estat lleugerament major en els períodes epidèmics de grip que en els no epidèmics però no de forma significativa i l'increment en la incidència durant els períodes epidèmics de grip ha estat estadísticament significatiu tant per als serotips API com no API. Una possible explicació és que en els estudis esmentats es va considerar el serotip 3 com a serotip no API, mentre que nosaltres l'hem considerat com a API, tal com assenyalen autors que han avaluat la capacitat invasiva del serotip incloent episodis detectats només per PCR amb cultiu negatiu <sup>236</sup> i després de la introducció de la VPC13 <sup>59</sup>. Segons Grijalva i col. <sup>144</sup> l'adquisició d'un nou serotip de *S. pneumoniae* després d'una infecció pel virus de la grip es pot observar en pacients prèviament colonitzats per un altre serotip. El fet que en el nostre estudi no hem pogut analitzar l'estat previ de colonització del pacient ni conèixer amb exactitud els antecedents d'infecció per virus gripal o altres virus respiratoris pot haver esmorteït l'efecte específic del virus gripal sobre els casos de MPI produïts per serotips no API. Cal destacar, però, que altres autors <sup>237,238</sup> tampoc han trobat diferències entre els serotips causants de MPI durant els períodes epidèmics i no epidèmics de grip ni en nens ni en adults, la qual cosa porta a pensar que la interacció entre el virus de la grip i els diversos serotips de pneumococ és complexa i depèn de nombrosos factors i no només de la capacitat invasiva del serotip.

Per a avaluar la gravetat de la MPI s'han tingut en compte 4 paràmetres: estada en UCI, complicacions durant l'ingrés, ventilació mecànica i presència de seqüeles a l'alta o defunció. S'ha realitzat una anàlisi multivariada mitjançant una regressió logística no condicional per estimar l'associació entre la gravetat dels casos en períodes epidèmics i no epidèmics. L'estada en UCI s'ha associat de forma estadísticament significativa als períodes no epidèmics de grip (15,4% vs. 22,5%; aOR 0,31; IC 95% 0,12 a 0,80;

p=0,02) a causa del nombre més gran d'episodis de meningitis i sèpsies registrats, en contraposició als períodes epidèmics en els quals la majoria de casos van ser pneumònies. Els casos amb complicacions durant l'ingrés, així com les seqüeles a l'alta s'han donat amb major freqüència durant els períodes epidèmics de grip (75,8% vs. 55,8%; aOR 2,00; IC 95% 1,06 a 3,77; p=0,03 i 22% vs. 8,7%; aOR 3,38; IC 95% 1,37 a 8,29; p=0,01, respectivament). La baixa prevalença de factors de risc entre els casos durant els períodes epidèmics de grip i el fet que no hem observat diferències estadísticament significatives entre els serotips causants de MPI en funció de l'activitat gripal, suggereix que l'augment de la gravetat en els casos de MPI durant els períodes epidèmics pot ser degut a un efecte sinèrgic entre *S. pneumoniae* i el virus de la grip<sup>154,239</sup>. En els casos de pneumònia no s'ha observat associació entre complicacions durant l'ingrés i l'activitat epidèmica gripal durant els períodes epidèmics. Aquest fet podria ser degut al gran increment dels casos de pneumònia amb empiema, necrotitzants o amb vessament pleural que s'ha registrat en els últims anys<sup>240,241</sup> i que han situat a la pneumònia complicada com la presentació clínica més freqüent en tots dos períodes. La gravetat dels casos de MPI produïts per serotips API s'ha associat a l'activitat gripal únicament quan es tracta de casos amb seqüeles a l'alta o amb defunció.

Els nostres resultats mostren que la FE<sub>p</sub> de MPI per a la VPC13 en nens de 7 a 59 mesos va oscil·lar entre el 48,0% i el 49,4% i que va ser més elevada durant els períodes epidèmics que en els períodes no epidèmics (50,4% vs. 46,1%), havent-se observat la diferència més gran entre ambdós períodes en els casos de pneumònia (50,8% vs. 43,4%). Existeixen pocs estudis sobre l'impacte de la vacuna VPC13 en època gripal. McGarry i col.<sup>242</sup> van calcular en el seu model predictiu que la vacuna VPC13 evitaria entre el 63% i el 67% dels casos de pneumònia pneumocòccica invasiva depenent de la incidència del virus gripal durant el període epidèmic. Aquest percentatge és superior al que hem trobat nosaltres, la qual cosa podria explicar-se perquè la cobertura vacunal durant el període d'estudi ha estat del 63,6% en nens de 7 a 59 mesos. El nostre estudi constata que la FE<sub>p</sub> augmenta en la mateixa proporció que ho fa la cobertura vacunal, la qual cosa reforça la idea que una major cobertura vacunal permet assolir una major FE<sub>p</sub>. Una altra possible explicació seria l'augment de la proporció de serotips no vacunals i la baixa efectivitat de VPC13 contra el serotip 3, que va ser el serotip més freqüent durant els períodes epidèmics de grip.

Al nostre estudi les diferències en la FE<sub>p</sub> estimada entre els períodes epidèmics i no epidèmics de grip van ser més grans quan es considerava la població vacunada els nens que havien rebut  $\geq 2$  dosis de VPC13 o  $\geq 1$  dosi després de 24 mesos (increment

del 9,2%) en comparació amb nens que havien rebut  $\geq 1$  dosi de VPC13 (increment del 3,5%). Aquest resultat és concordant amb l'augment de la EV observat quan s'incrementa el nombre de dosis de VPC13 administrades. És plausible, doncs, admetre que en períodes de grip epidèmica, quan es produeix un augment de la incidència de MPI, l'efecte protector de VPC13 sigui més elevat quan s'administra una pauta vacunal que ofereix una major efectivitat i que l'efecte protector sigui major que en els períodes no epidèmics, en els que aquest factor addicional que afavoreix l'adquisició de MPI no es dona.

Loughlin i col.<sup>133</sup> postulen que l'evidència de protecció indirecta en els no vacunats s'observa a partir d'una cobertura en la comunitat del 75%. En la nostra població la cobertura vacunal estimada no ha assolit aquest llindar i per tant, podem suposar que la FE<sub>p</sub> estimada és fruit de la protecció directa de la vacuna i que amb la introducció de la VPC13 al calendari de vacunacions de Catalunya el juliol de 2016 la FE<sub>p</sub> pot augmentar també gràcies a la immunitat de grup que es generi.

Des de la introducció de VPC13, diversos autors han reportat casos de MPI causats per serotips vacunals, tant en pacients que havien rebut  $\geq 1$  dosi de VPC13 com en pacients vacunats adequadament per a la seva edat. En els dos primers estudis vam poder detectar casos de fallades vacunals que hem analitzat en el quart estudi. Els casos amb fallada vacunal del nostre estudi han representat el 23,1% del total de casos de MPI produïts per serotips VPC13 en infants de 2 a 59 mesos. El serotip 3 ha representat el 66,7% dels casos de fallada vacunal i els casos s'han donat principalment al grup de 24 a 59 mesos (81,3% vs. 25,0%;  $p=0,013$ ). El serotip 19A ha representat el 20,8% dels casos de fallada vacunal i els casos s'han donat majoritàriament al grup de 2 a 23 mesos (80,0% vs. 26,3%;  $p=0,047$ ). Les fallades vacunals s'han associat principalment a la presentació clínica de pneumònia complicada amb diagnòstic per real-time PCR i a pacients sense malalties de base ni altres factors de risc. Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts per Antachopoulos i col. a Grècia<sup>217</sup> i els resultats d'un estudi previ realitzat a Catalunya<sup>222</sup>.

Kaplan i col.<sup>243</sup> en un estudi realitzat a 8 hospitals pediàtrics dels Estats Units van trobar que les fallades vacunals estaven associades principalment amb el serotip 19A, en menors de 6 mesos d'edat i pacients amb malalties de base. A l'estudi retrospectiu de Basaranoglu i col.<sup>244</sup> en casos de MPI tractats en un hospital pediàtric terciari de Turquia l'any 2015 es van reportar 2 casos de fallada vacunal associada al serotip 19F en pacients amb malaltia neurològica subjacent. Aquests dos estudis difereixen del nostre en dos aspectes. El primer és que es van dur a terme en una població en la

qual la vacuna VPC13 estava inclosa al calendari vacunal des del 2010 i amb elevada cobertura vacunal. El nostre estudi s'ha realitzat en una població amb una cobertura vacunal estimada del 63%. A més, tot i que diversos estudis indiquen que no s'ha produït una disminució de la incidència del serotip 3 després de la introducció de VPC13 <sup>215,216</sup>, només l'estudi d'adults de Fukusumi i col. <sup>216</sup> va incloure casos diagnosticats per PCR; per tant, no pot descartar-se que en una població amb cobertures de vacunació més elevades hi hagués menys fallades vacunals a causa de la immunitat de grup.

El segon aspecte és metodològic. Els estudis de Kaplan i col. <sup>243</sup> i Basaranoglu i col. <sup>244</sup> inclouen només casos diagnosticats per cultiu. Al nostre estudi també s'han inclòs casos diagnosticats per PCR. De fet, els casos de fallada vacunal s'han associat al diagnòstic només per PCR. Selva i col. <sup>178</sup> va mostrar la importància de la PCR en el diagnòstic de la MPI causada pel serotip 3 en nens < 5 anys amb cultius negatius. Almeida i col. <sup>245</sup>, en un estudi retrospectiu realitzat en pacients < 18 anys ingressats amb pneumònia diagnosticats per PCR en un hospital terciari de Portugal durant 2012-2014, van trobar 4 casos de fallada vacunal. Els pacients havien rebut 4 dosis de VPC13 i la MPI estava produïda pel serotip 3. Silva-Costa i col. <sup>70</sup> van analitzar 152 mostres de líquid pleural de pacients pediàtrics durant 2010-2015 a Portugal per identificar i serotipar les soques de *S. pneumoniae* causants de la MPI. El 68% dels casos van ser diagnosticats només per PCR i, com en el nostre estudi, els serotips més freqüents van ser el 3, l'1 i el 19A. Al seu estudi es van detectar 19 casos de fallada vacunal de la VPC13 i en 17 d'aquests casos el serotip identificat fou el 3. Tant al nostre estudi com al de Silva-Costa i col. el serotip 3 ha estat el serotip més freqüent en nens vacunats amb VPC13 i, tot i que Silva-Costa i col. van analitzar només els casos de pneumònia complicada, una patologia associada al serotip 3, els nostres resultats, analitzant totes les presentacions clíniques de MPI, han estat coincidents en aquest punt. Al nostre estudi, a més, hem trobat, entre els casos produïts per serotips continguts en la VPC13, una freqüència més alta de casos de serotip 3 en pacients amb fallada vacuna en comparació amb els pacients no vacunats (66,7% vs. 27,8%;  $p = 0,001$ ), la qual cosa indica la importància d'aquest serotip en l'era post-VPC13. Quan es van fer aquests estudis, la cobertura de la vacunació a Portugal (61%) era similar a la de Catalunya (63%).

Al nostre estudi hem observat que el serotip 19A està associat a casos de fallada vacunal de la VPC13 en nens < 2 anys. Aquest serotip és el més freqüent en aquest grup d'edat en el nostre entorn <sup>173</sup>. Nosaltres hem estimat que l'efectivitat de la VPC13 en la prevenció de la MPI causada pel serotip 19A era del 86% per als vacunats amb  $\geq$

1 dosi. Tot i aquesta bona efectivitat, els resultats de fallades vacunals per al serotip 19A són similars als observats per Kaplan i col.<sup>243</sup> en una població amb vacunació rutinària de VPC13.

Heininger i col.<sup>246</sup> va classificar les fallades vacunals segons el seu origen en tres categories: relacionades amb l'administració, relacionades amb l'hoste i relacionades amb la vacuna. El nostre estudi no ha trobat fallades relacionades amb l'administració perquè en tots els casos s'han verificat les dates d'administració de la vacuna i el nombre de dosis administrades segons les especificacions tècniques. A més s'han inclòs casos des de gener del 2012 al juny del 2016, de manera que les vacunes administrades no pertanyen al mateix lot. Tot i que no se sap si la conservació o emmagatzematge de cada vacuna va ser la correcta, atès que els casos de fallada vacunal s'han produït majoritàriament en el serotip 3 i en els casos amb pneumònia complicada, sembla poc probable que les fallades vacunals es puguin relacionar amb algun d'aquests factors, ja que d'haver estat així la tipologia dels casos amb fallada vacunal hagués estat molt més heterogènia. Les fallades vacunals relacionades amb l'hoste també semblen poc probables, ja que cap pacient tenia antecedents de malalties de base, incloent-hi les immunodeficiències. Tampoc s'han trobat diferències entre els casos de MPI causats pel serotip 3 en pacients no vacunats i en aquells amb fallada vacunal. Si els casos amb fallada vacunal tinguessin algun tipus d'immunodeficiència que hagués induït una resposta immunològica deficient a la vacuna, aquesta immunodeficiència també hauria comportat una major gravetat de la MPI en els casos<sup>3</sup>. La manca de diferències significatives en les variables epidemiològiques entre els casos amb i sense fallada vacunal ens permet pensar que és poc probable que les fallades estiguessin relacionades amb la interacció del pneumococ amb altres agents infecciosos com el virus de la grip. El fet que el serotip 3 estigui associat a casos de fallada vacunal, i específicament a pacients correctament vacunats segons la seva edat i que havien completat el seu calendari de vacunació, indica que les fallades vacunals serien degudes a la baixa efectivitat de la VPC13 enfront del serotip 3. Aquesta conclusió està en línia amb els resultats d'efectivitat obtinguts al primer estudi.

La MPI comporta un elevat cost per al sistema sanitari. Al cinquè estudi hem observat que després de la introducció de VPC13 els costos directes associats a la MPI en nens < 5 anys ha disminuït globalment i en totes les presentacions clíniques a causa d'una reducció del nombre de casos. Aquests resultats són comparables a la disminució de les hospitalitzacions observades per Baldo i col.<sup>247</sup> en nens de 0 a 4 anys a la zona del Veneto (Itàlia). Tant al període en que es va utilitzar la vacuna PCV7 com al període

en que es va utilitzar la PCV13 la pneumònia ha estat la presentació clínica que més costos ha generat seguida de la meningitis. No obstant això, la meningitis ha mostrat el cost mitjà més alt. El 2013 i el 2015 han estat els anys amb la proporció més gran de pacients amb presentació clínica de meningitis i, per tant, els anys amb un cost més elevat per pacient. Aquests resultats concorden amb els de l'estudi de Ceyhan i col.<sup>191</sup> realitzat a Ankara (Turquia) entre juny del 2013 i gener del 2014 i s'explica perquè la meningitis és una malaltia més severa que implica un major ús dels recursos sanitaris. El fet que més del 60% dels costos de MPI en els dos períodes d'estudi s'hagin associat a la pneumònia significa que actuar sobre aquesta presentació afectaria gran part del cost associat a la MPI. Atès que hem observat un augment de pneumònia pneumocòccica en el grup d'edat de 2-4 anys durant els períodes epidèmics de grip, caldria considerar la possibilitat de vacunar contra la grip aquest grup d'edat, ja que s'assoliria el doble objectiu de prevenir la infecció pel virus de la grip i d'evitar casos de pneumònia pneumocòccica.

Els recursos sanitaris que han generat més costos han variat d'un període d'estudi a l'altre. Durant el període VPC7, els dies d'hospitalització a hospitals d'estudi van generar els majors costos (56,6%). Lagos i col.<sup>248</sup> va calcular que el 70-75% dels costos totals de la MPI van ser deguts als dies d'hospitalització. Durant el període VPC13, el servei sanitari que ha generat més costos ha estat l'estada a UCI (47,1%). L'augment dels costos ha estat especialment rellevant per a la pneumònia, per a la que no només s'ha incrementat la proporció dels costos associats a UCI entre els dos períodes, sinó també els dels trasllats sanitaris urgents. Aquest increment en la proporció dels costos d'ambdós serveis de salut indica un augment de la gravetat. Brotons i col.<sup>192</sup> van identificar l'estada a UCI i les complicacions durant les hospitalitzacions com a factors que augmentaven el cost de la pneumònia. El present estudi mostra que l'estada a UCI és el factor que més incrementa el cost per pacient en la MPI en global. Els anys que van presentar una mitjana de dies en UCI per pacient més elevada van ser els que van presentar un major cost per pacient.

L'ús dels principals serveis de salut ha augmentat durant el segon període d'estudi, la qual cosa s'ha traduït en un augment del cost mitjà dels casos en MPI en general (3.016,1 € vs. 3.963,9 €; increment del 34,1%) i en les formes clíniques de meningitis (8.576,5 € vs. 8.852,0 €; increment del 3,2%) i, especialment, en la pneumònia (2.487,5 € vs. 3.639,9 €; increment del 46,3%) i la bacterièmia (1.076,1 € vs. 1.692,9 €; increment del 57,3%). El fet que el nostre estudi s'hagi realitzat només en hospitals d'alta tecnologia pot explicar que el cost de la MPI hagi estat més elevat, ja que el cost d'hospitalització és superior al d'altres hospitals a causa dels recursos disponibles per



a aquests centres i, a més, podria haver-hi una selecció dels casos més greus. No obstant això, els costos associats a la MPI en forma de pneumònia trobats en aquest estudi van ser similars als trobats per Baldo i col.<sup>247</sup> (3.909 €) en una regió molt similar a la nostra. A més, la comparació de tots dos períodes d'estudi en els mateixos centres ha permès observar que els costos mitjans dels serveis de salut que més han augmentat en el segon període han estat el dels dies d'ingrés a UCI (1.051,4 € vs. 1.865,6 €; increment del 77,4%) i el transport sanitari urgent (5,6 € vs. 21,2 €; increment del 276,6%). Això indica que, fins i tot havent-se realitzat l'estudi únicament en hospitals d'alta complexitat, la gravetat de la MPI ha augmentat durant el segon període d'estudi. Encara que els costos globals de MPI entre el primer i segon període han disminuït a causa de la reducció del nombre de casos, els casos del segon període han estat més greus, han consumit més serveis de salut i s'ha produït un increment del seu cost mitjà. Ricketson i col.<sup>249</sup> ja van advertir un possible augment de la gravetat de la MPI després de la introducció de les VPC, i la pneumònia complicada ha estat la presentació clínica de la MPI més freqüent. En el present estudi l'augment de gravetat ha estat quantificat i ha quedat reflectit en un increment del cost directe per pacient.

Brotons i col.<sup>192</sup> i Song i col.<sup>189</sup> van observar que el temps transcorregut des de l'inici dels símptomes fins a l'ingrés hospitalari no era un factor determinant per a establir la gravetat i el conseqüent increment del cost del cas. L'augment de la gravetat dels casos de MPI durant el segon període del nostre estudi podria estar relacionat amb els serotips circulants després d'haver incorporat la VPC13<sup>173</sup>. Després de la introducció de la VPC13 el cost directe associat a la MPI en < 5 anys ha disminuït de manera significativa en les MPI produïdes pels serotips ja inclosos en la PCV7 i, sobretot, pels serotips addicionals de la VPC13, però no pels serotips no inclosos a les VPC. L'augment de casos de serotips no vacunals juntament amb la disminució dels casos produïts per serotips de la VPC13 associats a la forma clínica de pneumònia (especialment el serotip 1) també podria explicar l'augment de la diversitat de les presentacions clíniques de la MPI durant el segon període del nostre estudi. La possible selecció dels casos més greus de MPI com a conseqüència del tipus d'hospitals participants també podria haver produït una selecció d'alguns serotips, però l'evolució dels serotips PCV7, serotips addicionals VPC13 i serotips no PCV trobats al nostre estudi són similars a la descrita a Catalunya<sup>173</sup>.

La proporció dels costos associats als 6 serotips addicionals de la VPC13 durant el segon període ha estat molt superior a la dels 7 serotips presents en la VPC7. Aquest fet respon a que la VPC7 es va administrar del 2001 al 2010 i a que aquests serotips



porten més temps sota els efectes de la vacuna i al fenomen de reemplaçament, especialment produït pels serotips 1, 3 i 19A<sup>167,168</sup>, que al nostre estudi va assolir el seu pic el 2009. També cal tenir en compte que la distribució dels costos associats a MPI produïda pels diferents serotips addicionals de la VPC13 entre el primer i el segon període ha estat molt desigual. Mentre que la proporció de costos associats al serotip 1 ha disminuït (22,5% vs. 11,8%) i la del serotip 19A s'ha mantingut estable (32,0% vs. 28,5%), la proporció de costos associats al serotip 3, un serotip associat a la pneumònia complicada<sup>177</sup>, ha passat del 25,1% dels costos totals dels serotips addicionals de la VPC13 al 37,5%. Això es pot explicar per la poca efectivitat de la vacuna enfront del serotip 3 i pel nombre de fallades vacunals que s'ha registrat per als serotips 3 i 19A que s'han comentat anteriorment. L'augment dels costos de MPI durant l'any 2015 pot suposar un punt d'inflexió en la tendència a la baixa que s'ha mantingut des de la comercialització de la VPC13 sense que s'hagi observat un descens en la cobertura vacunal en el mateix any. L'augment dels costos observat és directament proporcional a l'increment dels costos associats als serotips no inclosos en la VPC13 i al serotip 3. Aquest canvi de tendència, juntament amb l'increment de la gravetat dels casos, ens indica que és necessari prosseguir amb la vigilància d'aquesta malaltia i desenvolupar noves vacunes que incloguin nous serotips, l'elecció dels quals es basi no sols en la prevalença d'aquests sinó també en la gravetat de les patologies que causen.

La validesa interna dels resultats d'aquesta memòria de tesi està avalada per la metodologia emprada per realitzar els cinc estudis, en la que s'ha tingut en compte com minimitzar els possibles biaixos d'informació, selecció i confusió. El biaix d'informació s'ha minimitzat establint una mateixa metodologia per a l'obtenció de les dades dels casos i dels controls. La informació sobre l'estat vacunal s'ha recollit de registres externs i previs a la inclusió del cas o el control en l'estudi (carnet vacunal, registre del centre de salut o del centre privat on és atès habitualment o de la història clínica). Durant tot el període d'estudi han participat els mateixos hospitals, no hi ha hagut variacions en el percentatge de captura d'altres hospitalàries i la població de referència atesa i els circuits d'atenció mèdica no s'han modificat. No s'ha ampliat el nombre de llits de cap hospital pediàtric en la regió d'estudi ni se n'han construït de nous. El biaix de selecció s'ha minimitzat amb l'aparellament dels casos i controls per edat, sexe, condicions mèdiques de risc, hospital i data d'ingrés del cas. Tots els casos inclosos a l'estudi responien a la definició de característiques clíniques d'infecció juntament amb l'aïllament per cultiu i/o detecció d'ADN del gen *LytA* i el gen capsular *wzg (cpsA)* de *S. pneumoniae* per real-time PCR en una mostra normalment estèril i

en el 96,2% dels casos s'ha pogut identificar el serotip. El mateix grup de recerca ha participat durant tot l'estudi i no hi ha hagut canvis en la gestió de pacients pediàtrics amb MPI. Per a l'estudi de costos només s'han inclòs els casos de l'Hospital Sant Joan de Déu i de l'Hospital Maternoinfantil Vall d'Hebrón, ja que els investigadors d'aquests dos centres també van participar el l'anterior projecte PI 06/1597 "Evaluación de la efectividad de la vacuna antineumocócica conjugada 7-valente en la prevención de la enfermedad neumocócica invasora en niños menores de 5 años. Estudio de casos y controles" del qual s'han extret les dades del període 2007-2009. Aquest projecte seguia una metodologia molt similar als projectes PI 11/02081 i PI 11/2345 "Efectividad de la vacuna 13-valente en la prevención de la enfermedad neumocócica invasiva en niños. Estudio de casos y controles" amb els que s'ha elaborat aquesta memòria de tesi. Les possibles variables de confusió s'han introduït en una anàlisi multivariada de regressió logística condicional per a l'estudi de l'EV i una anàlisi multivariada de regressió logística no condicional per estimar l'associació de la gravetat dels casos de MPI en els períodes epidèmics i no epidèmics de grip. Tot i això, no es pot descartar alguna confusió residual. Tal com es pot veure en els resultats dels diferents estudis que conformen aquesta memòria de tesi una fortalesa és que el diagnòstic s'hagi realitzat per real-time PCR. Gairebé la meitat dels casos no s'haurien detectat si només s'hagués emprat la tècnica del cultiu i, per tant, els casos inclosos no haurien estat representatius dels casos hospitalitzats amb MPI.

Respecte a la validesa externa dels resultats d'aquesta memòria de tesi, cal destacar que l'estudi s'ha realitzat en tres hospitals pediàtrics que atenen a aproximadament el 32% de la població < 18 anys de Catalunya (442.000 nens).

Els estudis continguts en la present memòria de tesi tenen diverses limitacions. Tot i que la mida de la mostra ha estat adequada per assolir la majoria dels objectius plantejats, no s'ha tingut un nombre de casos i controls suficient per estimar l'EV de la VPC13 enfront de formes clíniques diferents de pneumònia o pneumònia complicada ni enfront dels serotips que no fossin l'1, 3, 14 i 19A. Aquest fet també pot haver afectat altres resultats que han fregat la significació estadística, com l'augment dels serotips no PCV13 en les pneumònies complicades amb VP i/o empiema. Pel que fa als casos inclosos en l'estudi, la condició de portador de *S. pneumoniae* prèvia al desenvolupament de la MPI no s'ha pogut saber. No s'ha disposat de confirmació virològica sobre antecedents previs d'infecció per virus de la grip o altres virus respiratoris. Tampoc no s'ha realitzat un estudi serològic per determinar les concentracions IgG específiques dels serotips en els casos vacunats ni estudis específics per descartar la immunodeficiència en els casos de fallada vacunal. Tot i

això, en els períodes que hem considerat epidèmics s'ha pogut constatar que la circulació del virus de la grip era molt superior a la de la resta de virus respiratoris. Tanmateix, l'absència d'antecedents de malalties de base en els casos amb fallades vacunals estudiats, el control dels pacients després de l'alta (que va durar 6 mesos en el cas de l'alta amb seqüeles) i el fet que la MPI en casos de fallada vacunal no presentava una major gravetat que en els casos no vacunats reforça la validesa dels nostres resultats.

Una altra limitació ha estat que els serotips 25F i 38 són negatius per al gen *wzg* (*cpsA*). Tot i això, cap dels dos serotips estan inclosos a la VPC13 i de les 122 soques serotipades mitjançant la reacció de Quellung, només 2 eren del serotip 38 i 1 del serotip 25F.

Tampoc s'ha considerat l'efecte de la PCV10 sobre els serotips addicionals 1, 5 i 7F; tanmateix, la cobertura d'aquesta vacuna a Catalunya és molt baixa, estimant-se en el 4% aproximadament <sup>169</sup>.

Finalment, els resultats obtinguts en aquesta memòria de tesi s'han d'emmarcar en l'àmbit hospitalari i dins de la nostra àrea geogràfica, ja que aquests estan condicionats pel nostre sistema de salut, les polítiques sanitàries, els serotips circulants i la incidència de la MPI. Tot i això, la concordança dels nostres resultats amb els dels estudis realitzats per autors d'altres zones geogràfiques reforcen la validesa externa dels nostres resultats.

## **6. CONCLUSIONS**



1. L'efectivitat d'una dosi o més de vacuna polisacàrida conjugada 13 valent per prevenir la malaltia pneumocòccica invasiva causada pels serotips presents en la vacuna en nens de 7 a 59 mesos d'edat ha estat bona (75,8%) i s'ha incrementat fins al 90% quan augmenta el nombre de dosis administrades.
2. La vacuna polisacàrida conjugada 13 valent no ha mostrat efectivitat per al serotip 3 en cap pauta vacunal analitzada. L'efectivitat de 1 o més dosis per als serotips 1, 14 i 19A, els més freqüents a la nostra regió després del serotip 3, ha estat alta, oscil·lant entre el 86,0% i el 96,9%.
3. En població menor de 18 anys la presentació clínica més freqüent de la malaltia pneumocòccica invasiva ha estat la pneumònia complicada amb vessament pleural i/o empiema (54,4%), amb una taxa d'incidència de 6,83 casos per 100.000 persones-any.
4. Entre 2012 i 2015 s'ha observat una disminució significativa de la incidència de pneumònia complicada per vessament pleural i/o empiema deguda, principalment, a la reducció de casos produïts pel serotip 1. Els casos produïts pel serotip 3 i pels serotips no vacunals han augmentat.
5. Durant els períodes epidèmics de grip la incidència total de malaltia pneumocòccica invasiva ha augmentat en els menors de 18 anys, especialment en els majors de 2 anys i en la presentació clínica de pneumònia. Els casos de malaltia pneumocòccica invasiva amb complicacions i amb seqüeles a l'alta han estat majors durant els períodes epidèmics.
6. La fracció evitada en població de malaltia pneumocòccica invasiva en nens de 7 a 59 mesos i ha estat més elevada en el període epidèmic que en el període no epidèmic de grip (50,4% vs. 46,1%), havent-se observat la diferència més gran entre ambdós períodes en els casos de pneumònia (50,8% vs. 43,4%).
7. Els casos amb fallada vacunal han representat el 23,1% del total de casos de malaltia pneumocòccica invasiva produïts per serotips VPC13 en infants de 2 a 59 mesos i s'han produït principalment en les pneumònies complicades i el seu diagnòstic microbiològic s'ha realitzat principalment per real-time PCR.
8. El serotip 3 ha representat el 66,7% dels casos amb fallada vacunal i s'ha associat a pacients correctament vacunats per a la seva edat, que havien completat la pauta de vacunació i al grup d'edat de 24-59 mesos. El serotip 19A ha representat el 20,8% dels casos de fallada vacunal i s'ha associat a pacients correctament vacunats per a la seva edat, que no havien acabat la pauta vacunal i en menors de 2 anys.

9. Després de la introducció de la vacuna polisacàrida conjugada 13 valent els costos directes associats a malaltia pneumocòccica invasiva en menors de 5 anys ha disminuït en totes les presentacions clíniques a causa d'un descens en el nombre de casos. La pneumònia ha estat la presentació clínica que més costos ha generat (62,0%) seguida de la meningitis (26,1%).
10. Els casos de malaltia pneumocòccica invasiva posteriors a la introducció de la vacuna polisacàrida conjugada 13 valent han estat de major gravetat i han consumit més serveis de salut. El cost mitjà de la malaltia pneumocòccica invasiva s'ha incrementat un 34,1% i el de la pneumònia un 46,3%. Els costos associats als dies d'ingrés a UCI han augmentat un 77,4%.

## **7. BIBLIOGRAFIA**





1. Gudiol F, Liñares J. Infecciones por *Streptococcus pneumoniae*. A: Ausina V, Moreno S, editors. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Madrid. Editorial Médica Panamericana, 2008; p.283-296.
2. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Streptococcus pneumoniae*. A: *Medical Microbiology*. 8a ed. Philadelphia. Elsevier, 2016; p.195-199.
3. Janoff E, Musher D. *Streptococcus pneumoniae*. A: Bennet J, Dolin R, Blaser M, editors. Principles and practice of infectious diseases. 8a ed. Philadelphia. Elsevier, 2015; p.2434-2452.
4. Geno KA, Gilbert GL, Song JY i col. Pneumococcal capsules and their types: past, present, and future. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):871-899. doi:10.1128/CMR.00024-15
5. Avery OT, Dubos R. The protective action of a specific enzyme against type III pneumococcus infection in mice. *J Exp Med*. 1931;54(1):73-89. doi:10.1084/jem.54.1.73
6. MacLeod CM, Hodges RG, Heidelberger M, Bernhard WG. Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides. *J Exp Med*. 1945;82(6):445-465. doi:10.1084/jem.82.6.445
7. Grabenstein JD, Klugman KP. A century of pneumococcal vaccination research in humans. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:15-24. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03943.x
8. Centers for Disease Control and Prevention. Pneumococcal Disease. A: Hamborsky J, Kroger A, Wolf S, editors. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases.13a ed. Washington D.C. Public Health Foundation, 2015; p.279-296. Disponible a: <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/index.html>
9. European Medicines Agency. Summary of Prevenar 7 product characteristics. 2011. Disponible a: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000323/WC500041558.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000323/WC500041558.pdf)
10. European Medicines Agency. Summary of Synflorix product characteristics. 2009. Disponible a: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Pro-](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Pro-)

- duct\_Information/human/000973/WC500054346.pdf
11. European Medicines Agency. Summary of Prevenar 13 product characteristics. 2009. Disponible a:  
[https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/prevenar-epar-summary-public\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/prevenar-epar-summary-public_en.pdf)
  12. Tettelin H. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science*. 2001;293(5529):498-506. doi:10.1126/science.1061217
  13. Kislak JW, Daly AK, Finland M, Lawrence MBR. Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics. *Am J Med Sci*. 1965;250(3):261-268. doi:10.1097/00000441-196509000-00003
  14. Vignoli R, Seija V. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. A:Temas de Bacteriología y Virología Médica. 2a ed. Montevideo. Oficina del libro, 2006; p:649–662.
  15. Nelson AL, Roche AM, Gould JM, Chim K, Ratner AJ, Weiser JN. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucusmediated clearance. *Infect Immun*. 2007;75(1):83-90. doi:10.1128/IAI.01475-06
  16. Brueggemann AB, Pai R, Crook DW, Beall B. Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. *PLoS Pathog*. 2007;3(11):e168. doi:10.1371/journal.ppat.0030168
  17. Aguinagalde L, Corsini B, Domenech A i col. Emergence of amoxicillin-resistant variants of Spain9V-ST156 pneumococci expressing serotype 11A correlates with their ability to evade the host immune response. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137565. doi:10.1371/journal.pone.0137565
  18. Ganaie F, Saad JS, McGee L i col. A new pneumococcal capsule type, 10D, is the 100th serotype and has a large *cps* fragment from an oral *Streptococcus*. McDaniel LS, ed. *MBio*. 2020; 11(3):e00937-20. doi:10.1128/mBio.00937-20
  19. Henrichsen J. The pneumococcal typing system and pneumococcal surveillance. *J Infect*. 1979;1:31-37. doi:10.1016/S0163-4453(79)80029-8
  20. Eddy BE. Cross reactions between the several pneumococcic types and their tignificance in the preparation of polyvalent antiserum. *Public Healt Reports*. 1944;59(15):485. doi:10.2307/4584847
  21. Henriques-Normark B, Blomberg C, Dagerhamn J, Bättig P, Normark S. The rise and fall of bacterial clones: *Streptococcus pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol*.

- 2008;6(11):827-837. doi:10.1038/nrmicro2011
22. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.* 2018;3:124. doi:10.12688/wellcomeopenres.14826.1
  23. Žemličková H, Mališová L, Španělová P i col. Molecular characterization of serogroup 19 *Streptococcus pneumoniae* in the Czech Republic in the post-vaccine era. *J Med Microbiol.* 2018;67(7):1003-1011. doi:10.1099/jmm.0.000765
  24. Nakano S, Fujisawa T, Ito Y i col. Serotypes, antimicrobial susceptibility, and molecular epidemiology of invasive and non-invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in paediatric patients after the introduction of 13-valent conjugate vaccine in a nationwide surveillance study conducted in Japan in 2012-2014. *Vaccine.* 2016;34(1):67-76. doi:10.1016/j.vaccine.2015.11.015
  25. van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet.* 2009;374(9700):1543-1556. doi:10.1016/S0140-6736(09)61114-4
  26. Preado J. V. Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*: Basic microbiological aspects. *Rev Chil infectología.* 2001;18(1). doi:10.4067/S0716-10182001000000002
  27. Hyams C, Camberlein E, Cohen JM, Bax K, Brown JS. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infect Immun.* 2010;78(2):704-715. doi:10.1128/IAI.00881-09
  28. Jedrzejewski MJ. Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001;65(2):187-207. doi:10.1128/MMBR.65.2.187-207.2001
  29. Spreer A, Kerstan H, Böttcher T i col. Reduced release of pneumolysin by *Streptococcus pneumoniae* in vitro and in vivo after treatment with nonbacteriolytic antibiotics in comparison to ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(8):2649-2654. doi:10.1128/AAC.47.8.2649-2654.2003
  30. Hirst RA, Kadioglu A, O'callaghan C, Andrew PW. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin Exp Immunol.* 2004;138(2):195-201. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02611.x
  31. Ramos-Sevillano E, Urzainqui A, Campuzano S i col. Pleiotropic effects of cell wall amidase LytA on *Streptococcus pneumoniae* sensitivity to the host immune response. *Infect Immun.* 2015;83(2):591-603. doi:10.1128/IAI.02811-14

32. Mitchell AM, Mitchell TJ. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(5):411-418. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03183.x
33. Ren B, Szalai AJ, Hollingshead SK, Briles DE. Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. *Infect Immun*. 2004;72(1):114-122. doi:10.1128/IAI.72.1.114-122.2004
34. Mukerji R, Mirza S, Roche AM i col. Pneumococcal surface protein A inhibits complement deposition on the pneumococcal surface by competing with the binding of C-reactive protein to cell-surface phosphocholine. *J Immunol*. 2012;189(11):5327-5335. doi:10.4049/jimmunol.1201967
35. Haleem KS, Ali YM, Yesilkaya H i col. The pneumococcal surface proteins PspA and PspC sequester host C4-Binding protein to inactivate complement C4b on the bacterial surface. *Infect Immun*. 2018;87(1). doi:10.1128/IAI.00742-18
36. Martinez PJ, Farhan A, Mustafa M i col. PspA facilitates evasion of pneumococci from bactericidal activity of neutrophil extracellular traps (NETs). *Microb Pathog*. 2019;136:103653. doi:10.1016/j.micpath.2019.103653
37. Shaper M, Hollingshead SK, Benjamin WH, Briles DE. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin. *Infect Immun*. 2004;72(9):5031-5040. doi:10.1128/IAI.72.9.5031-5040.2004
38. van der Maten E, van den Broek B, de Jonge MI i col. *Streptococcus pneumoniae* PspC subgroup prevalence in invasive disease and differences in contribution to complement evasion. *Infect Immun*. 2018;86(4). doi:10.1128/IAI.00010-18
39. Hammerschmidt S, Talay SR, Brandtzaeg P, Chhatwal GS. SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol Microbiol*. 1997;25(6):1113-1124. doi:10.1046/j.1365-2958.1997.5391899.x
40. Orihuela CJ, Mahdavi J, Thornton J i col. Laminin receptor initiates bacterial contact with the blood brain barrier in experimental meningitis models. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1638-1646. doi:10.1172/JCI36759
41. Ogunniyi AD, Mahdi LK, Jennings MP i col. Central role of manganese in regulation of stress responses, physiology, and metabolism in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*. 2010;192(17):4489-4497. doi:10.1128/JB.00064-10

42. Janesch P, Rouha H, Badarau A i col. Assessing the function of pneumococcal neuraminidases NanA, NanB and NanC in in vitro and in vivo lung infection models using monoclonal antibodies. *Virulence*. 2018;9(1):1521-1538. doi:10.1080/21505594.2018.1520545
43. Chi Y-C, Rahkola JT, Kendrick AA i col. *Streptococcus pneumoniae* IgA1 protease: A metalloprotease that can catalyze in a split manner in vitro. *Protein Sci*. 2017;26(3):600-610. doi:10.1002/pro.3110
44. Weiser JN, Bae D, Fasching C, Scamurra RW, Ratner AJ, Janoff EN. Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(7):4215-4220. doi:10.1073/pnas.0637469100
45. European Commission. Commission Implementing Decision (EU) 2018/945 of 22 June 2018 on the communicable diseases and related special health issues to be covered by epidemiological surveillance as well as relevant case definitions. *Off J Eur Union*. 2018;L170(2119):1-74. Disponible a: [http://data.europa.eu/eli/dec\\_impl/2018/945/oj](http://data.europa.eu/eli/dec_impl/2018/945/oj)
46. Adegbola RA, DeAntonio R, Hill PC i col. Carriage of *Streptococcus pneumoniae* and other respiratory bacterial pathogens in low and lower-middle income countries: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(8):e103293. doi:10.1371/journal.pone.0103293
47. Darboe MK, Fulford AJ, Secka O, Prentice AM. The dynamics of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* carriage among rural Gambian mother-infant pairs. *BMC Infect Dis*. 2010;10(1):195. doi:10.1186/1471-2334-10-195
48. Hussain M, Melegaro A, Pebody RG i col. A longitudinal household study of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in a UK setting. *Epidemiol Infect*. 2005;133(5):891-898. doi:10.1017/S0950268805004012
49. Dube FS, Ramjith J, Gardner-Lubbe S i col. Longitudinal characterization of nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae* in a South African birth cohort post 13-valent pneumococcal conjugate vaccine implementation. *Sci Rep*. 2018;8(1):12497. doi:10.1038/s41598-018-30345-5
50. Marks LR, Reddinger RM, Hakansson AP. Biofilm formation enhances fomite survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun*. 2014;82(3):1141-1146. doi:10.1128/IAI.01310-13
51. Domenech M, Ramos-Sevillano E, García E, Moscoso M, Yuste J. Biofilm

- formation avoids complement immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2013;81(7):2606-2615. doi:10.1128/IAI.00491-13
52. Wright AKA, Bangert M, Gritzfeld JF i col. Experimental human pneumococcal carriage augments IL-17A-dependent T-cell defence of the lung. *PLoS Pathog*. 2013;9(3):e1003274. doi:10.1371/journal.ppat.1003274
53. Bogaert D, de Groot R, Hermans P. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*. 2004;4(3):144-154. doi:10.1016/S1473-3099(04)00938-7
54. Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(6):355-367. doi:10.1038/s41579-018-0001-8
55. Ogunniyi AD, Mahdi LK, Trappetti C i col. Identification of genes that contribute to the pathogenesis of invasive pneumococcal disease by in vivo transcriptomic analysis. *Infect Immun*. 2012;80(9):3268-3278. doi:10.1128/IAI.00295-12
56. Oliver MB, Basu Roy A, Kumar R, Lefkowitz EJ, Swords WE. *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 phase-locked opacity variants differ in virulence phenotypes. *mSphere*. 2017; 2(6):e00386-17. doi:10.1128/mSphere.00386-17
57. Brueggemann AB, Peto TEA, Crook DW, Butler JC, Kristinsson KG, Spratt BG. Temporal and geographic stability of the serogroup-specific invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children. *J Infect Dis*. 2004;190(7):1203-1211. doi:10.1086/423820
58. del Amo E, Selva L, de Sevilla MFF i col. Estimation of the invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children by the use of direct capsular typing in clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(4):705-711. doi:10.1007/s10096-014-2280-y
59. Lindstrand A, Galanis I, Darenberg J i col. Unaltered pneumococcal carriage prevalence due to expansion of non-vaccine types of low invasive potential 8 years after vaccine introduction in Stockholm, Sweden. *Vaccine*. 2016;34(38):4565-4571. doi:10.1016/j.vaccine.2016.07.031
60. Weinberger DM, Harboe ZB, Sanders EAM i col. Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2010;51(6):692-699. doi:10.1086/655828
61. World Health Organization. Pneumococcal conjugate vaccines in infants and children under 5 years of age: WHO position paper –February 2019. *Wkly*

- Epidemiol Rec.* 2019;(8):85-104. Disponibile a.  
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/310968/WER9408.pdf>
62. Huang SS, Johnson KM, Ray GT i col. Healthcare utilization and cost of pneumococcal disease in the United States. *Vaccine.* 2011;29(18):3398-3412. doi:10.1016/j.vaccine.2011.02.088
  63. van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma JB, Vermeulen M. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med.* 2004;351(18):1849-1859. doi:10.1056/NEJMoa040845
  64. Koedel U, Scheld WM, Pfister H-W. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(12):721-736. doi:10.1016/S1473-3099(02)00450-4
  65. Mook-Kanamori BB, Geldhoff M, van der Poll T, van de Beek D. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(3):557-591. doi:10.1128/CMR.00008-11
  66. Oligbu G, Collins S, Djennad A i col. Effect of pneumococcal conjugate vaccines on pneumococcal meningitis, England and Wales, July 1, 2000–June 30, 2016. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(9):1708-1718. doi:10.3201/eid2509.180747
  67. Ruiz-Contreras J, Picazo J, Casado-Flores J i col. Impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis in children. *Vaccine.* 2017;35(35):4646-4651. doi:10.1016/j.vaccine.2017.06.070
  68. Bradley JS, Byington CL, Shah SS i col. The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: clinical practice guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2011;53(7):e25-e76. doi:10.1093/cid/cir531
  69. Amaro R, Liapikou A, Cilloniz C i col. Predictive and prognostic factors in patients with blood-culture-positive community-acquired pneumococcal pneumonia. *Eur Respir J.* 2016;48(3):797-807. doi:10.1183/13993003.00039-2016
  70. Silva-Costa C, Brito MJ, Pinho MD i col. Pediatric complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae* Serotype 3 in 13-valent pneumococcal conjugate vaccinees, Portugal, 2010–2015. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(7):1307-1314. doi:10.3201/eid2407.180029
  71. Esposito S, Marchese A, Tozzi AE i col. Bacteremic pneumococcal community-



- acquired pneumonia in children less than 5 years of age in Italy. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31(7):705-710. doi:10.1097/INF.0b013e31825384ae
72. Garcia-Vidal C, Ardanuy C, Tubau F i col. Pneumococcal pneumonia presenting with septic shock: host- and pathogen-related factors and outcomes. *Thorax.* 2010;65(1):77-81. doi:10.1136/thx.2009.123612
73. Fritz CQ, Edwards KM, Self WH i col. Prevalence, risk factors, and outcomes of bacteremic pneumonia in children. *Pediatrics.* 2019;144(1):e20183090. doi:10.1542/peds.2018-3090
74. Cillóniz C, Torres A. Entendimento da mortalidade em pneumonia pneumocócica bacterêmica. *J Bras Pneumol.* 2012;38(4):419-421. doi:10.1590/S1806-37132012000400002
75. Martinez-Vega R, Jauneikaite E, Thoon KC i col. Risk factor profiles and clinical outcomes for children and adults with pneumococcal infections in Singapore: a need to expand vaccination policy? *PLoS One.* 2019;14(10):e0220951. doi:10.1371/journal.pone.0220951
76. Leibovitz E, David N, Ribitzky-Eisner H i col. The epidemiologic, microbiologic and clinical picture of bacteremia among febrile infants and young children managed as outpatients at the emergency room, before and after initiation of the routine anti-pneumococcal immunization. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(7):723. doi:10.3390/ijerph13070723
77. Filho EM, de Carvalho WB. Current management of occult bacteremia in infants. *J Pediatr (Rio J).* 2015;91(6):S61-S66. doi:10.1016/j.jped.2015.06.004
78. Hernández-Bou S, Gómez B, Mintegi S, García-García JJ. Occult bacteremia etiology following the introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine: a multicenter study in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37(8):1449-1455. doi:10.1007/s10096-018-3270-2
79. Li Q, Li Y, Yi Q i col. Prognostic roles of time to positivity of blood culture in children with *Streptococcus pneumoniae* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38(3):457-465. doi:10.1007/s10096-018-03443-5
80. Olarte L, Romero J, Barson W i col. Osteoarticular infections caused by *Streptococcus pneumoniae* in children in the post-pneumococcal conjugate vaccine era. *Pediatr Infect Dis J.* 2017;36(12):1201-1204. doi:10.1097/INF.0000000000001697
81. Gubbay JB, McIntyre PB, Gilmour RE. Cellulitis in childhood invasive

- pneumococcal disease: A population-based study. *J Paediatr Child Health*. 2006;42(6):354-358. doi:10.1111/j.1440-1754.2006.00872.x
82. Nielsen KR, Ejlersen T, El-Batran S, Prag J. A five-year survey of pneumococcal peritonitis in two Danish counties—incidence, diagnosis and clinical entities. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9(7):738-740. doi:10.1046/j.1469-0691.2003.00603.x
83. Kumar M, Ghunawat J, Saikia D, Manchanda V. Incidence and risk factors for major infections in hospitalized children with nephrotic syndrome. *Brazilian J Nephrol*. 2019;41(4):526-533. doi:10.1590/2175-8239-jbn-2019-0001
84. Marrie TJ, Tyrrell GJ, Majumdar SR, Eurich DT. Risk factors for pneumococcal endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37(2):277-280. doi:10.1007/s10096-017-3128-z
85. Ravindranath Waikar A, Uzamere O, Bailey K, Pierre L, Adeyinka A. A Unique pathogen causing infective endocarditis in a three-year-old girl. *Cureus*. 2019;11(3):e4249. doi:10.7759/cureus.4249
86. Feinstein Y, Falup-Pecurariu O, Mitrică M i col. Acute pericarditis caused by *Streptococcus pneumoniae* in young infants and children: three case reports and a literature review. *Int J Infect Dis*. 2010;14(2):e175-e178. doi:10.1016/j.ijid.2009.03.033
87. Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(3):467-492. doi:10.1128/CMR.00070-09
88. Hooper C, Lee YCG, Maskell N. Investigation of a unilateral pleural effusion in adults: British Thoracic Society pleural disease guideline 2010. *Thorax*. 2010;65(Suppl 2):ii4-ii17. doi:10.1136/thx.2010.136978
89. Reller LB, Weinstein MP, Werno AM, Murdoch DR. Laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease. *Clin Infect Dis*. 2008;46(6):926-932. doi:10.1086/528798
90. Martínez Chamorro, MJ. Grupo de Patología Infecciosa AEPap. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad neumocócica: utilidad del test rápido de detección del antígeno neumocócico en orina en Pediatría. 2014. Disponible a: <https://www.aepap.org/sites/default/files/diag.nmc3.pdf>
91. Saha SK, Darmstadt GL, Yamanaka N i col. Rapid diagnosis of pneumococcal meningitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24(12):1093-1098.

- doi:10.1097/01.inf.0000190030.75892.78
92. 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;45(4):237-240. doi:10.1016/S0732-8893(02)00548-5
93. Ploton C, Freydiere AM, Benito Y i col. *Streptococcus pneumoniae* thoracic empyema in children: rapid diagnosis by using the Binax NOW immunochromatographic membrane test in pleural fluids. *Pathol Biol*. 2006;54(8-9):498-501. doi:10.1016/j.patbio.2006.07.031
94. Porcel JM, Ruiz-Gonzalez A, Falguera M i col. Contribution of a pleural antigen assay (Binax NOW) to the diagnosis of pneumococcal pneumonia. *Chest*. 2007;131(5):1442-1447. doi:10.1378/chest.06-1884
95. Petti CA, Woods CW, Reller LB. *Streptococcus pneumoniae* antigen test using positive blood culture bottles as an alternative method to diagnose pneumococcal bacteremia. *J Clin Microbiol*. 2005;43(5):2510-2512. doi:10.1128/JCM.43.5.2510-2512.2005
96. Baggett HC, Rhodes J, Dejsirilert S i col. Pneumococcal antigen testing of blood culture broth to enhance the detection of *Streptococcus pneumoniae* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(5):753-756. doi:10.1007/s10096-011-1370-3
97. Moïsi JC, Moore M, Carvalho M da G i col. Enhanced diagnosis of pneumococcal bacteremia using antigen- and molecular-based tools on blood specimens in Mali and Thailand: A prospective surveillance study. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;94(2):267-275. doi:10.4269/ajtmh.15-0431
98. Congestri F, Morotti M, Vicari R i col. Comparative evaluation of the novel IMMUNOCATCH™ *Streptococcus pneumoniae* (Eiken chemical co., Ltd) test with the Uni-Gold™ *Streptococcus pneumoniae* assay and the BinaxNOW® *Streptococcus pneumoniae* antigen card for the detection of pneumococcal capsular. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019; 39(4):749-751. doi:10.1007/s10096-019-03778-7
99. Michelow IC, Lozano J, Olsen K i col. Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* lower respiratory infection in hospitalized children by culture, polymerase chain reaction, serological testing, and urinary antigen detection. *Clin Infect Dis*. 2002;34(1):e1-e11. doi:10.1086/324358

100. World Health Organization. Laboratory methods for the diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*: WHO manual. 2a edició. 2011. Disponible a:  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70765/WHO\\_IVB\\_11.09\\_eng.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70765/WHO_IVB_11.09_eng.pdf?sequence=1)
101. Carvalho M d. GS, Tondella ML, McCaustland K i col. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *LytA*, *Ply*, and *PsaA* genes for detection of pneumococcal DNA. *J Clin Microbiol.* 2007;45(8):2460-2466.  
doi:10.1128/JCM.02498-06
102. Perez VP, Caierão J, Fischer GB, Dias CAG, D'Azevedo PA. Pleural effusion with negative culture: a challenge for pneumococcal diagnosis in children. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016;86(2):200-204.  
doi:10.1016/j.diagmicrobio.2016.07.022
103. Başpınar EÖ, Dayan S, Bekçibaşı M i col. Comparison of culture and PCR methods in the diagnosis of bacterial meningitis. *Brazilian J Microbiol.* 2017;48(2):232-236. doi:10.1016/j.bjm.2016.06.014
104. Nigrovic LE, Malley R, Macias CG i col. Effect of antibiotic pretreatment on cerebrospinal fluid profiles of children with bacterial meningitis. *Pediatrics.* 2008;122(4):726-730. doi:10.1542/peds.2007-3275
105. Dewé TCM, D'Aeth JC, Croucher NJ. Genomic epidemiology of penicillin-non-susceptible *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Genomics.* 2019;5(10).  
doi:10.1099/mgen.0.000305
106. Song JY, Eun BW, Nahm MH. Diagnosis of pneumococcal pneumonia: current pitfalls and the way forward. *Infect Chemother.* 2013;45(4):351.  
doi:10.3947/ic.2013.45.4.351
107. Satzke C, Turner P, Virolainen-Julkunen A i col. Standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*: updated recommendations from the World Health Organization Pneumococcal Carriage Working Group. *Vaccine.* 2013;32(1):165-179.  
doi:10.1016/j.vaccine.2013.08.062
108. Tavares DA, Handem S, Carvalho RJ i col. Identification of *Streptococcus pneumoniae* by a real-time PCR assay targeting *SP2020*. *Sci Rep.* 2019;9(1):3285. doi:10.1038/s41598-019-39791-1
109. Wyllie AL, Pannekoek Y, Bovenkerk S i col. Sequencing of the variable region of

- RpsB* to discriminate between *Streptococcus pneumoniae* and other streptococcal species. *Open Biol.* 2017;7(9):170074. doi:10.1098/rsob.170074
110. Cvitkovic Spik V, Beovic B, Pokorn M i col. Improvement of pneumococcal pneumonia diagnostics by the use of rt-PCR on plasma and respiratory samples. *Scand J Infect Dis.* 2013;45(10):731-737. doi:10.3109/00365548.2013.804631
111. Abdeldaim G, Herrmann B, Mölling P i col. Usefulness of real-time PCR for LytA, Ply, and Spn9802 on plasma samples for the diagnosis of pneumococcal pneumonia. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(8):1135-1141. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03069.x
112. Sanz JC, Ríos E, Rodríguez-Avial I, Ramos B, Marín M, Cercenado E. Identification of *Streptococcus pneumoniae* LytA , PlyA and PsaA genes in pleural fluid by multiplex real-time PCR. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018;36(7):428-430. doi:10.1016/j.eimc.2017.07.007
113. Tzanakaki G, Tsopanomichalou M, Kesanopoulos K i col. Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(5):386-390. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01109.x
114. Fenoll A, Jado I, Vicioso D, Casal J. Dot blot assay for the serotyping of pneumococci. *J Clin Microbiol.* 1997;35(3):764-766.
115. Tarragó D, Fenoll A, Sánchez-Tatay D i col. Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(9):828-834. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02028.x
116. Pimenta FC, Roundtree A, Soysal A i col. Sequential triplex real-time PCR assay for detecting 21 pneumococcal capsular serotypes that account for a high global disease burden. *J Clin Microbiol.* 2013;51(2):647-652. doi:10.1128/JCM.02927-12
117. Selva L, Berger C, Garcia-Garcia JJ, de Paz H, Nadal D, Munoz-Almagro C. Direct identification of *Streptococcus pneumoniae* capsular types in pleural fluids by using multiplex PCR combined with automated fluorescence-based capillary electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 2014;52(7):2736-2737. doi:10.1128/JCM.00906-14
118. Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology.* 1998;144(11):3049-3060. doi:10.1099/00221287-144-11-3049

119. Francisco AP, Bugalho M, Ramirez M, Carriço JA. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics*. 2009;10(1):152. doi:10.1186/1471-2105-10-152
120. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Media preparation for EUCAST disk diffusion testing and for determination of MIC values by the broth microdilution method- Version 6.0. 2020. Disponible a: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_test\\_documents/2020\\_manuals/Media\\_preparation\\_v\\_6.0\\_EUCAST\\_AST.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2020_manuals/Media_preparation_v_6.0_EUCAST_AST.pdf)
121. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Disk Diffusion method for antimicrobial susceptibility testing- Version 8.0. 2020. Disponible a: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_test\\_documents/2020\\_manuals/Manual\\_v\\_8.0\\_EUCAST\\_Disk\\_Test\\_2020.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2020_manuals/Manual_v_8.0_EUCAST_Disk_Test_2020.pdf)
122. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0. 2020. Disponible a: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_10.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf)
123. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST proposes that agents and species currently categorised as susceptibleHE (SHE) are re-Categorised as “susceptible, increased exposure” (I) in Breakpoint Table V 10.0. 2019. Disponible a: [https://eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Consultation/2019/Agents\\_and\\_species\\_currently\\_categorised\\_as\\_SusceptibleHE\\_20190509.pdf](https://eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Consultation/2019/Agents_and_species_currently_categorised_as_SusceptibleHE_20190509.pdf)
124. Moreno-Pérez D, Andrés Martín A, Tagarro García A i col. Neumonía adquirida en la comunidad: tratamiento de los casos complicados y en situaciones especiales. Documento de consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP) y Sociedad Española de Neumología Pediátrica (SENP). *An Pediatría*. 2015;83(3):217.e1-217.e11. doi:10.1016/j.anpedi.2014.12.002
125. Baquero F, Vecino R, del Castillo F. Meningitis Bacteriana A: Protocolos Diagnóstico-Terapéuticos de la Asociación Española de Pediatría y Sociedad Española de Infectología Pediátrica. 2011. Disponible a: <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/meningitis.pdf>
126. Hakenbeck R, Brückner R, Denapaité D, Maurer P. Molecular mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Future Microbiol*.

- 2012;7(3):395-410. doi:10.2217/fmb.12.2
127. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Ficha técnica Pneumovax 23 solución inyectable en vial. 2019. Disponible a: [https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/63828/FT\\_63828.html](https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/63828/FT_63828.html)
128. Daniels CC, Rogers PD, Shelton CM. A review of pneumococcal vaccines: Current polysaccharide vaccine recommendations and future protein antigens. *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2016;21(1):27-35. doi:10.5863/1551-6776-21.1.27
129. Gómez NA, Rodríguez JMB, López EB i col. Vacunes antipneumocòcciques. A: Manual de Vacunacions de Catalunya 2020. 6a ed. Barcelona. Agència de Salut pública de Catalunya, 2020; p.111-122.
130. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Ficha técnica Synflorix suspensión inyectable en jeringa precargada. 2009. Disponible a: [https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/09508003/FT\\_09508003.html](https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/09508003/FT_09508003.html)
131. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Ficha técnica Prevenar 13 suspensión inyectable. 2014. Disponible a: [https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/09590002/FT\\_09590002.html](https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/09590002/FT_09590002.html)
132. Klugman KP, Dagan R, Malley R, Whitney C. Pneumococcal conjugate vaccine and pneumococcal common protein vaccines. A: Plotkin S, Orenstein W, Offit P, Edwards K, editors. Plotkin's Vaccines. 7a ed. Philadelphia. Elsevier, 2018; p.815-839.
133. Loughlin AM, Hsu K, Silverio AL, Marchant CD, Pelton SI. Direct and indirect effects of PCV13 on nasopharyngeal carriage of PCV13 unique pneumococcal serotypes in Massachusetts' children. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33(5):504-510. doi:10.1097/INF.0000000000000279
134. Pichichero M, Kaur R, Scott DA i col. Effectiveness of 13-valent pneumococcal conjugate vaccination for protection against acute otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae* in healthy young children: a prospective observational study. *Lancet Child Adolesc Heal.* 2018;2(8):561-568. doi:10.1016/S2352-4642(18)30168-8
135. Sobanjo-ter Meulen A, Vesikari T, Malacaman EA i col. Safety, tolerability and immunogenicity of 15-valent pneumococcal conjugate vaccine in toddlers previously vaccinated with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2015;34(2):186-194. doi:10.1097/INF.0000000000000516
136. McFetridge R, Meulen AS, Folkerth SD i col. Safety, tolerability, and



- immunogenicity of 15-valent pneumococcal conjugate vaccine in healthy adults. *Vaccine*. 2015;33(24):2793-2799. doi:10.1016/j.vaccine.2015.04.025
137. Rupp R, Hurley D, Grayson S i col. A dose ranging study of 2 different formulations of 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV15) in healthy infants. *Hum Vaccin Immunother*. 2019;15(3):549-559. doi:10.1080/21645515.2019.1568159
138. Thompson A, Lamberth E, Severs J i col. Phase 1 trial of a 20-valent pneumococcal conjugate vaccine in healthy adults. *Vaccine*. 2019;37(42):6201-6207. doi:10.1016/j.vaccine.2019.08.048
139. Pfizer. Pfizer announces top-line results from phase 3 study of 20-valent pneumococcal conjugate vaccine in pneumococcal vaccine-naïve adults aged 18 years or older. 2020. Disponible a: [https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizer\\_announces\\_top\\_line\\_results\\_from\\_phase\\_3\\_study\\_of\\_20\\_valent\\_pneumococcal\\_conjugate\\_vaccine\\_in\\_pneumococcal\\_vaccine\\_na\\_ve\\_adults\\_aged\\_18\\_years\\_or\\_older](https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizer_announces_top_line_results_from_phase_3_study_of_20_valent_pneumococcal_conjugate_vaccine_in_pneumococcal_vaccine_na_ve_adults_aged_18_years_or_older)
140. Pichichero ME, Khan MN, Xu Q. Next generation protein based *Streptococcus pneumoniae* vaccines. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(1):194-205. doi:10.1080/21645515.2015.1052198
141. Pichichero ME. Pneumococcal whole-cell and protein-based vaccines: changing the paradigm. *Expert Rev Vaccines*. 2017;16(12):1181-1190. doi:10.1080/14760584.2017.1393335
142. Briles DE, Paton JC, Mukerji R, Swiatlo E, Crain MJ. Pneumococcal vaccines. *Microbiol Spectr*. 2019;7(6). doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0028-2018
143. Masomian M, Ahmad Z, Ti Gew L, Poh CL. Development of next generation *Streptococcus pneumoniae* vaccines conferring broad protection. *Vaccines*. 2020;8(1):132. doi:10.3390/vaccines8010132
144. Grijalva CG, Griffin MR, Edwards KM i col. The role of influenza and parainfluenza infections in nasopharyngeal pneumococcal acquisition among young children. *Clin Infect Dis*. 2014;58(10):1369-1376. doi:10.1093/cid/ciu148
145. McCullers JA, McAuley JL, Browall S i col. Influenza enhances susceptibility to natural acquisition of and disease due to *Streptococcus pneumoniae* in ferrets. *J Infect Dis*. 2010;202(8):1287-1295. doi:10.1086/656333
146. Rodrigues F, Foster D, Nicoli E i col. Relationships between rhinitis symptoms,



- respiratory viral infections and nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* in children attending daycare. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32(3):227-232.  
doi:10.1097/INF.0b013e31827687fc
147. Koliou MG, Andreou K, Lamnisos D i col. Risk factors for carriage of *Streptococcus pneumoniae* in children. *BMC Pediatr.* 2018;18(1):144.  
doi:10.1186/s12887-018-1119-6
148. Obando I, Sánchez-Tatay D, Molinos-Quintana A i col. Epidemiología de la colonización nasofaríngea por *Streptococcus pneumoniae* en niños menores de 6 años de la ciudad de Sevilla. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(8):581-586. doi:10.1016/j.eimc.2011.05.010
149. Tigoi CC, Gatakaa H, Karani A i col. Rates of acquisition of pneumococcal colonization and transmission probabilities, by serotype, among newborn infants in Kilifi District, Kenya. *Clin Infect Dis.* 2012;55(2):180-188.  
doi:10.1093/cid/cis371
150. Ciruela P, Soldevila N, Hernández S i col. Risk factors for invasive pneumococcal disease in a community with a high proportion of non vaccine serotypes. *Vaccine.* 2013;31(6):960-966. doi:10.1016/j.vaccine.2012.11.102
151. Haile AA, Gidebo DD, Ali MM. Colonization rate of *Streptococcus pneumoniae* its associated factors and antimicrobial susceptibility pattern among children attending kindergarten school in Hawassa, southern Ethiopia. *BMC Res Notes.* 2019;12(1):344. doi:10.1186/s13104-019-4376-z
152. Lewnard JA, Givon-Lavi N, Huppert A i col. Epidemiological markers for interactions among *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Staphylococcus aureus* in upper respiratory tract carriage. *J Infect Dis.* 2016;213(10):1596-1605. doi:10.1093/infdis/jiv761
153. Sohail I, Ghosh S, Mukundan S, Zelewski S, Khan MN. Role of inflammatory risk factors in the pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae*. *Front Immunol.* 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.02275
154. Weinberger DM, Harboe ZB, Viboud C i col. Pneumococcal disease seasonality: incidence, severity and the role of influenza activity. *Eur Respir J.* 2014;43(3):833-841. doi:10.1183/09031936.00056813
155. Weinberger DM, Klugman KP, Steiner CA, Simonsen L, Viboud C. Association between respiratory syncytial virus activity and pneumococcal disease in infants:

- a time series analysis of US hospitalization data. *PLoS Med.* 2015;12(1):e1001776. doi:10.1371/journal.pmed.1001776
156. Butters C, Phuong LK, Cole T, Gwee A. Prevalence of immunodeficiency in children with invasive pneumococcal disease in the pneumococcal vaccine era: a systematic review. *JAMA Pediatr.* 2019;173(11):1084. doi:10.1001/jamapediatrics.2019.3203
157. van Aalst M, Lötsch F, Spijker R i col. Incidence of invasive pneumococcal disease in immunocompromised patients: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med Infect Dis.* 2018;24:89-100. doi:10.1016/j.tmaid.2018.05.016
158. Morrill HJ, Caffrey AR, Noh E, LaPlante KL. Epidemiology of pneumococcal disease in a national cohort of older adults. *Infect Dis Ther.* 2014;3(1):19-33. doi:10.1007/s40121-014-0025-y
159. Comité Asesor de Vacunas, Asociación Española de Pediatría. Actualización en vacunación antineumocócica 2010. Recomendaciones del Comité Asesor de Vacunas. 2010. Disponible a:  
[https://vacunasaep.org/sites/vacunasaep.org/files/CAV-AEP\\_Recomendaciones\\_VNC\\_2010.pdf](https://vacunasaep.org/sites/vacunasaep.org/files/CAV-AEP_Recomendaciones_VNC_2010.pdf)
160. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP i col. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet.* 2009;374(9693):893-902. doi:10.1016/S0140-6736(09)61204-6
161. Wahl B, O'Brien KL, Greenbaum A i col. Burden of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b disease in children in the era of conjugate vaccines: global, regional, and national estimates for 2000–15. *Lancet Glob Health.* 2018;6(7):e744-e757. doi:10.1016/S2214-109X(18)30247-X
162. European Centre for Disease Prevention and Control. Invasive pneumococcal disease. A: Annual epidemiological report for 2017. Stockholm. ECDC, 2019.
163. Sub-direcció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública. Epidemiologia de la malaltia pneumocòccica invasiva a Catalunya: informe 2012-2016; Sistema de Notificació Microbiològica de Catalunya. Barcelona. Agència de Salut Pública de Catalunya, 2018. Disponible a:  
<http://scientiasalut.gencat.cat/handle/11351/3646>
164. Centro Nacional de Epidemiología. CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Enfermedades prevenibles por la vacunación. Enfermedad

- neumocòcica invasiva. A: Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual 2016. Madrid. Instituto de Salud Carlos III, 2018; p.40-42. Disponible a:  
<http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=25/01/2019-d8ee271b6f>.
165. Ben-Shimol S, Greenberg D, Givon-Lavi N i col. Early impact of sequential introduction of 7-valent and 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on IPD in Israeli children <5 years: an active prospective nationwide surveillance. *Vaccine*. 2014;32(27):3452-3459. doi:10.1016/j.vaccine.2014.03.065
  166. Lepoutre A, Varon E, Georges S i col. Impact of the pneumococcal conjugate vaccines on invasive pneumococcal disease in France, 2001–2012. *Vaccine*. 2015;33(2):359-366. doi:10.1016/j.vaccine.2014.11.011
  167. Munoz-Almagro C, Jordan I, Gene A, Latorre C, Garcia-Garcia JJ, Pallares R. Emergence of invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes in the era of 7-valent conjugate vaccine. *Clin Infect Dis*. 2008;46(2):174-182. doi:10.1086/524660
  168. Feikin DR, Kagucia EW, Loo JD i col. Serotype-specific changes in invasive pneumococcal disease after pneumococcal conjugate vaccine introduction: A pooled analysis of multiple surveillance sites. *PLoS Med*. 2013;10(9):e1001517. doi:10.1371/journal.pmed.1001517
  169. Savulescu C, Krizova P, Lepoutre A i col. Effect of high-valency pneumococcal conjugate vaccines on invasive pneumococcal disease in children in SpIDnet countries: an observational multicentre study. *Lancet Respir Med*. 2017;5(8):648-656. doi:10.1016/S2213-2600(17)30110-8
  170. Ben-Shimol S, Givon-Lavi N, Grisaru-Soen G, Megged O, Greenberg D, Dagan R. Comparative incidence dynamics and serotypes of meningitis, bacteremic pneumonia and other-IPD in young children in the PCV era: insights from Israeli surveillance studies. *Vaccine*. 2018;36(36):5477-5484. doi:10.1016/j.vaccine.2017.05.059
  171. Ladhani SN, Collins S, Djennad A i col. Rapid increase in non-vaccine serotypes causing invasive pneumococcal disease in England and Wales, 2000–17: a prospective national observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(4):441-451. doi:10.1016/S1473-3099(18)30052-5
  172. Sempere J, de Miguel S, González-Camacho F, Yuste J, Domenech M. Clinical

- relevance and molecular pathogenesis of the emerging serotypes 22F and 33F of *Streptococcus pneumoniae* in Spain. *Front Microbiol.* 2020;11:309.  
doi:10.3389/fmicb.2020.00309
173. Ciruela P, Izquierdo C, Broner S i col. The changing epidemiology of invasive pneumococcal disease after PCV13 vaccination in a country with intermediate vaccination coverage. *Vaccine.* 2018;36(50):7744-7752.  
doi:10.1016/j.vaccine.2018.05.026
174. Balsells E, Guillot L, Nair H, Kyaw MH. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in the post-PCV era: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2017;12(5):e0177113.  
doi:10.1371/journal.pone.0177113
175. Ludwig G, Garcia-Garcia S, Lanaspá M i col. Serotype and clonal distribution dynamics of invasive pneumococcal strains after PCV13 introduction (2011-2016): surveillance data from 23 sites in Catalonia, Spain. *PLoS One.* 2020;15(2):e0228612. doi:10.1371/journal.pone.0228612
176. Tin Tin Htar M, Christopoulou D, Schmitt H-J. Pneumococcal serotype evolution in Western Europe. *BMC Infect Dis.* 2015;15(1):419. doi:10.1186/s12879-015-1147-x
177. Goettler D, Streng A, Kemmling D i col. Increase in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 associated parapneumonic pleural effusion/empyema after the introduction of PCV13 in Germany. *Vaccine.* 2020;38(3):570-577.  
doi:10.1016/j.vaccine.2019.10.056
178. Selva L, Ciruela P, Esteva C i col. Serotype 3 is a common serotype causing invasive pneumococcal disease in children less than 5 years old, as identified by real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(7):1487-1495.  
doi:10.1007/s10096-011-1468-7
179. van Hoek AJ, Sheppard CL, Andrews NJ i col. Pneumococcal carriage in children and adults two years after introduction of the thirteen valent pneumococcal conjugate vaccine in England. *Vaccine.* 2014;32(34):4349-4355.  
doi:10.1016/j.vaccine.2014.03.017
180. Brooks LRK, Mias GI. *Streptococcus pneumoniae*'s virulence and host immunity: aging, diagnostics, and prevention. *Front Immunol.* 2018;9.  
doi:10.3389/fimmu.2018.01366
181. Takeuchi N, Ohkusu M, Wada N i col. Molecular typing, antibiotic susceptibility,

- and biofilm production in nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in Japan. *J Infect Chemother.* 2019;25(10):750-757. doi:10.1016/j.jiac.2019.02.007
182. Chen Y-Y, Hsieh Y-C, Gong Y-N i col. Genomic insight into the spread of meropenem-resistant *Streptococcus pneumoniae* Spain 23F -ST81, Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(4):711-720. doi:10.3201/eid2604.190717
183. Kim L, McGee L, Tomczyk S, Beall B. Biological and epidemiological features of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in pre- and post-conjugate vaccine eras: a United States perspective. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(3):525-552. doi:10.1128/CMR.00058-15
184. Richter SS, Diekema DJ, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Doern G V. Changes in pneumococcal serotypes and antimicrobial resistance after introduction of the 13-valent conjugate vaccine in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(11):6484-6489. doi:10.1128/AAC.03344-14
185. González-Díaz A, Machado MP, Càmara J i col. Two multi-fragment recombination events resulted in the  $\beta$ -lactam-resistant serotype 11A-ST6521 related to Spain9V-ST156 pneumococcal clone spreading in south-western Europe, 2008 to 2016. *Euro Surveill.* 2020; 25(16):1900457. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.16.1900457
186. Ardanuy C, de la Campa AG, García E i col. Spread of *Streptococcus pneumoniae* serotype 8-ST63 multidrug-resistant recombinant clone, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(11):1848-1856. doi:10.3201/eid2011.131215
187. Malik B, Bhattacharyya S. Antibiotic drug-resistance as a complex system driven by socio-economic growth and antibiotic misuse. *Sci Rep.* 2019;9(1):9788. doi:10.1038/s41598-019-46078-y
188. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in Europe 2015 to 2018. *Streptococcus pneumoniae. A: Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018.* Stockholm. ECDC, 2019; p.49-53. Disponible a:  
<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2018.pdf>
189. Song JY, Choi JY, Lee JS i col. Clinical and economic burden of invasive pneumococcal disease in adults: a multicenter hospital-based study. *BMC Infect Dis.* 2013;13(1):202. doi:10.1186/1471-2334-13-202

190. Calderón C, Dennis R. Economic cost of *Streptococcus pneumoniae* community-acquired pneumonia, meningitis and bacteremia in an adult population that required hospitalization in Bogotá, Colombia. *Biomedica*. 2014;34(1):92-101. doi:10.1590/S0120-41572014000100012
191. Ceyhan M, Ozsurekci Y, Aykac K, Hacibedel B, Ozbilgili E. Economic burden of pneumococcal infections in children under 5 years of age. *Hum Vaccin Immunother*. 2018;14(1):106-110. doi:10.1080/21645515.2017.1371378
192. Brotons P, Gelabert G, Launes C, Sicuri E, Pallares R, Muñoz-Almagro C. Cost of hospitalizing children with invasive pneumococcal pneumonia. *Vaccine*. 2013;31(7):1117-1122. doi:10.1016/j.vaccine.2012.12.025
193. Mezones-Holguin E, Canelo-Aybar C, Clark AD i col. Cost-effectiveness analysis of 10- and 13-valent pneumococcal conjugate vaccines in Peru. *Vaccine*. 2015;33:A154-A166. doi:10.1016/j.vaccine.2014.12.039
194. Vučina VV, Filipović SK, Kožnjak N i col. Cost-effectiveness of pneumococcal conjugate vaccination in Croatia. *Vaccine*. 2015;33:A209-A218. doi:10.1016/j.vaccine.2014.12.043
195. Wilson MR, Wasserman MD, Breton M-C i col. Health and economic impact of routine pediatric pneumococcal immunization programs in Canada: a retrospective analysis. *Infect Dis Ther*. 2020;9(2):341-353. doi:10.1007/s40121-020-00294-6
196. Chen C, Cervero Liceras F, Flasche S i col. Effect and cost-effectiveness of pneumococcal conjugate vaccination: a global modelling analysis. *Lancet Glob Health*. 2019;7(1):e58-e67. doi:10.1016/S2214-109X(18)30422-4
197. Guevara M, Barricarte A, Torroba L i col. Direct, indirect and total effects of 13-valent pneumococcal conjugate vaccination on invasive pneumococcal disease in children in Navarra, Spain, 2001 to 2014: cohort and case-control study. *Euro Surveill*. 2016;21(14):30186. doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.14.30186
198. Miller E, Andrews NJ, Waight PA, Slack MPE, George RC. Effectiveness of the new serotypes in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Vaccine*. 2011;29(49):9127-9131. doi:10.1016/j.vaccine.2011.09.112
199. Deceuninck G, De Serres G, Boulianne N, Lefebvre B, De Wals P. Effectiveness of three pneumococcal conjugate vaccines to prevent invasive pneumococcal disease in Quebec, Canada. *Vaccine*. 2015;33(23):2684-2689. doi:10.1016/j.vaccine.2015.04.005

200. van der Linden M, Falkenhorst G, Perniciaro S, Fitzner C, Imöhl M. Effectiveness of pneumococcal conjugate vaccines (PCV7 and PCV13) against invasive pneumococcal disease among children under two years of age in Germany. *PLoS One*. 2016;11(8):e0161257. doi:10.1371/journal.pone.0161257
201. Moore MR, Link-Gelles R, Schaffner W i col. Effectiveness of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine for prevention of invasive pneumococcal disease in children in the USA: a matched case-control study. *Lancet Respir Med*. 2016;4(5):399-406. doi:10.1016/S2213-2600(16)00052-7
202. Su W-J, Lo H-Y, Chang C-H i col. Effectiveness of pneumococcal conjugate vaccines of different valences against invasive pneumococcal disease among children in Taiwan. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35(4):e124-e133. doi:10.1097/INF.0000000000001054
203. Cohen C, von Mollendorf C, de Gouveia L i col. Effectiveness of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in South African children: a case-control study. *Lancet Glob Health*. 2017;5(3):e359-e369. doi:10.1016/S2214-109X(17)30043-8
204. Andrews NJ, Waight PA, Burbidge P i col. Serotype-specific effectiveness and correlates of protection for the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine: a postlicensure indirect cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(9):839-846. doi:10.1016/S1473-3099(14)70822-9
205. van der Linden M, Falkenhorst G, Perniciaro S, Imöhl M. Effects of infant pneumococcal conjugate vaccination on serotype distribution in invasive pneumococcal disease among children and adults in Germany. *PLoS One*. 2015;10(7):e0131494. doi:10.1371/journal.pone.0131494
206. Moore MR, Link-Gelles R, Schaffner W i col. Effect of use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children on invasive pneumococcal disease in children and adults in the USA: analysis of multisite, population-based surveillance. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(3):301-309. doi:10.1016/S1473-3099(14)71081-3
207. Horácio AN, Silva-Costa C, Lopes JP, Ramirez M, Melo-Cristino J. Serotype 3 remains the leading cause of invasive pneumococcal disease in adults in Portugal (2012–2014) despite continued reductions in other 13-valent conjugate vaccine serotypes. *Front Microbiol*. 2016; 7:1616. doi:10.3389/fmicb.2016.01616
208. Waight PA, Andrews NJ, Ladhani SN, Sheppard CL, Slack MPE, Miller E. Effect



- of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on invasive pneumococcal disease in England and Wales 4 years after its introduction: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(5):535-543. doi:10.1016/S1473-3099(15)70044-7
209. Demczuk WHB, Martin I, Griffith A i col. Serotype distribution of invasive *Streptococcus pneumoniae* in Canada after the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine, 2010–2012. *Can J Microbiol*. 2013;59(12):778-788. doi:10.1139/cjm-2013-0614
210. Wijmenga-Monsuur AJ, van Westen E, Knol MJ i col. Direct comparison of immunogenicity induced by 10- or 13-valent pneumococcal conjugate vaccine around the 11-month booster in dutch infants.. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144739. doi:10.1371/journal.pone.0144739
211. Snape MD, Klinger CL, Daniels ED i col. Immunogenicity and reactogenicity of a 13-valent-pneumococcal conjugate vaccine administered at 2, 4, and 12 months of age. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(12):e80-e90. doi:10.1097/INF.0b013e3181faa6be
212. Vanderkooi OG, Scheifele DW, Girgenti D i col. Safety and immunogenicity of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in healthy infants and toddlers given with routine pediatric vaccinations in Canada. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(1):72-77. doi:10.1097/INF.0b013e318233049d
213. Martínón-Torres F, Wysocki J, Center KJ i col. Circulating antibody 1 and 2 years after vaccination with the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in preterm compared with term infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2017;36(3):326-332. doi:10.1097/INF.0000000000001428
214. Dagan R, Patterson S, Juergens C i col. Comparative immunogenicity and efficacy of 13-valent and 7-valent pneumococcal conjugate vaccines in reducing nasopharyngeal colonization: a randomized double-blind trial. *Clin Infect Dis*. 2013;57(7):952-962. doi:10.1093/cid/cit428
215. Slotved H-C, Dalby T, Harboe ZB i col. The incidence of invasive pneumococcal serotype 3 disease in the Danish population is not reduced by PCV-13 vaccination. *Heliyon*. 2016;2(11):e00198. doi:10.1016/j.heliyon.2016.e00198
216. Fukusumi M, Chang B, Tanabe Y i col. Invasive pneumococcal disease among adults in Japan, April 2013 to March 2015: disease characteristics and serotype distribution. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):2. doi:10.1186/s12879-016-2113-y



217. Antachopoulos C, Tsolia MN, Tzanakaki G i col. Parapneumonic pleural effusions caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 in children immunized with 13-Valent conjugated pneumococcal vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33(1):81-83. doi:10.1097/INF.0000000000000041
218. Olarte L, Barson WJ, Barson RM i col. Pneumococcal pneumonia requiring hospitalization in US children in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine era. *Clin Infect Dis.* 2017;64(12):1699-1704. doi:10.1093/cid/cix115
219. Wiese AD, Griffin MR, Zhu Y, Mitchel EF, Grijalva CG. Changes in empyema among U.S. children in the pneumococcal conjugate vaccine era. *Vaccine.* 2016;34(50):6243-6249. doi:10.1016/j.vaccine.2016.10.062
220. Obando I, Muñoz-Almagro C, Arroyo LA i col. Pediatric parapneumonic empyema, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(9):1390-1397. doi:10.3201/eid1409.071094
221. Syrogiannopoulos GA, Michoula AN, Tsimitselis G, Vassiou K, Chryssanthopoulou DC, Grivea IN. Pneumonia with empyema among children in the first five years of high coverage with 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Infect Dis (Auckl).* 2016;48(10):749-753. doi:10.1080/23744235.2016.1192720
222. Moraga-Llop F, Garcia-Garcia J-J, Díaz-Conradi A i col. Vaccine failures in patients properly vaccinated with 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in Catalonia, a region with low vaccination coverage. *Pediatr Infect Dis J.* 2016;35(4):460-463. doi:10.1097/INF.0000000000001041
223. Carter E, Waldhausen J, Zhang W, Hoffman L, Redding G. Management of children with empyema: pleural drainage is not always necessary. *Pediatr Pulmonol.* 2010;45(5):475-80. doi:10.1002/ppul.21200
224. Hernández-Bou S, Garcí-a-García JJ, Esteva C, Genè A, Luaces C, Muñoz-Almagro C. Pediatric parapneumonic pleural effusion: epidemiology, clinical characteristics, and microbiological diagnosis. *Pediatr Pulmonol.* 2009;44(12):1192-1200. doi:10.1002/ppul.21114
225. McKee AJ, Ives A, Balfour-Lynn IM. Increased incidence of bronchopulmonary fistulas complicating pediatric pneumonia. *Pediatr Pulmonol.* 2011;46(7):717-721. doi:10.1002/ppul.21396
226. Pírez MC, Algorta G, Chamorro F i col. Changes in hospitalizations for pneumonia after universal vaccination with pneumococcal conjugate vaccines

- 7/13 valent and *Haemophilus influenzae* type b Conjugate Vaccine in a pediatric referral hospital in Uruguay. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33(7):753-759.  
doi:10.1097/INF.0000000000000294
227. Rokney A, Ben-Shimol S, Korenman Z i col. Emergence of *Streptococcus pneumoniae* serotype 12F after sequential introduction of 7- and 13-valent vaccines, Israel. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(3):453-461.  
doi:10.3201/eid2403.170769
228. Sub-direcció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública Pla d'informació de les infeccions respiratòries agudes a Catalunya (PIDIRAC). Barcelona. Agència de Salut Pública de Catalunya, 2016. Disponible a: <https://canalsalut.gencat.cat/ca/professionals/vigilancia-epidemiologica/pla-dinformacio-de-les-infeccions-respiratories-agudes-a-catalunya-pidirac/>
229. Ciruela P, Broner S, Izquierdo C i col. Invasive pneumococcal disease rates linked to meteorological factors and respiratory virus circulation (Catalonia, 2006–2012). *BMC Public Health.* 2016;16(1):400. doi:10.1186/s12889-016-3061-6
230. Nicoli EJ, Trotter CL, Turner KME, Colijn C, Waight P, Miller E. Influenza and RSV make a modest contribution to invasive pneumococcal disease incidence in the UK. *J Infect.* 2013;66(6):512-520. doi:10.1016/j.jinf.2013.02.007
231. Weinberger DM, Harboe ZB, Viboud C i col. Serotype-specific effect of influenza on adult invasive pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis.* 2013;208(8):1274-1280. doi:10.1093/infdis/jit375
232. Weinberger DM, Grant LR, Steiner CA i col. Seasonal drivers of pneumococcal disease incidence: impact of bacterial carriage and viral activity. *Clin Infect Dis.* 2014;58(2):188-194. doi:10.1093/cid/cit721
233. Ben-Shimol S, Greenberg D, Hazan G, Shemer-Avni Y, Givon-Lavi N, Dagan R. Seasonality of both bacteremic and nonbacteremic pneumonia coincides with viral lower respiratory tract infections in early childhood, in contrast to nonpneumonia invasive pneumococcal disease, in the pre-pneumococcal conjugate vaccine era. *Clin Infect Dis.* 2015;60(9):1384-1387.  
doi:10.1093/cid/civ023
234. Launes C, García-García J-J, Triviño M, Peris N, Pallarés R, Muñoz-Almagro C. Respiratory viruses, such as 2009 H1N1 influenza virus, could trigger temporal trends in serotypes causing pneumococcal disease. *Clin Microbiol Infect.*

- 2014;20(12):O1088-O1090. doi:10.1111/1469-0691.12744
235. Launes C, De-Sevilla M-F, Selva L, Garcia-Garcia J-J, Pallares R, Muñoz-Almagro C. Viral coinfection in children less than five years old with invasive pneumococcal disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(6):650-653. doi:10.1097/INF.0b013e31824f25b0
236. del Amo E, Selva L, de Sevilla MF i col. Estimation of the invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children by the use of direct capsular typing in clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(4):705-711. doi:10.1007/s10096-014-2280-y
237. Fleming-Dutra KE, Taylor T, Link-Gelles R i col. Effect of the 2009 Influenza A(h1n1) pandemic on invasive pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis*. 2013;207(7):1135-1143. doi:10.1093/infdis/jit008
238. Nelson GE, Gershman KA, Swerdlow DL, Beall BW, Moore MR. Invasive pneumococcal disease and pandemic (H1N1) 2009, Denver, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(2):208-216. doi:10.3201/eid1802.110714
239. Palacios G, Hornig M, Cisterna D i col. *Streptococcus pneumoniae* coinfection is correlated with the severity of H1N1 pandemic influenza. *PLoS One*. 2009;4(12):e8540. doi:10.1371/journal.pone.0008540
240. Ampofo K, Bender J, Sheng X i col. Seasonal invasive pneumococcal disease in children: role of preceding respiratory viral infection. *Pediatrics*. 2008;122(2):229-237. doi:10.1542/peds.2007-3192
241. de Sevilla MF, García-García J-J, Esteva C i col. Clinical presentation of invasive pneumococcal disease in Spain in the era of heptavalent conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(2):124-128. doi:10.1097/INF.0b013e318241d09e
242. McGarry LJ, Gilmore KE, Rubin JL, Klugman KP, Strutton DR, Weinstein MC. Impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) in a pandemic similar to the 2009 H1N1 in the United States. *BMC Infect Dis*. 2013;13(1):229. doi:10.1186/1471-2334-13-229
243. Kaplan SL, Barson WJ, Lin PL i col. Early trends for invasive pneumococcal infections in children after the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(3):203-207. doi:10.1097/INF.0b013e318275614b
244. Tanır Basaranoglu S, Karadag Oncel E, Aykac K i col. Invasive pneumococcal

- disease: From a tertiary care hospital in the post-vaccine era. *Hum Vaccin Immunother.* 2017;13(4):962-964. doi:10.1080/21645515.2016.1256519
245. Almeida AF, Sobrinho-Simões J, Ferraz C, Nunes T, Vaz L. Pneumococcal pneumonia vaccine breakthroughs and failures after 13-valent pneumococcal conjugated vaccine: Table 1. *Eur J Public Health.* 2016;26(5):887-889. doi:10.1093/eurpub/ckw089
246. Heininger U, Bachtiar NS, Bahri P i col. The concept of vaccination failure. *Vaccine.* 2012;30(7):1265-1268. doi:10.1016/j.vaccine.2011.12.048
247. Baldo V, Cocchio S, Baldovin T i col. A population-based study on the impact of hospitalization for pneumonia in different age groups. *BMC Infect Dis.* 2014;14(1):485. doi:10.1186/1471-2334-14-485
248. Lagos R, Muñoz A, Espinoza A i col. Costos médicos directos de enfermedades neumocócicas invasoras y neumonías con diagnóstico radiológico en niños chilenos. *Rev Panam Salud Pública.* 2009;26(2):101-111. doi:10.1590/S1020-49892009000800002
249. Ricketson LJ, Conradi NG, Vanderkooi OG, Kellner JD. Changes in the nature and severity of invasive pneumococcal disease in children before and after the seven-valent and thirteen-valent pneumococcal conjugate vaccine programs in Calgary, Canada. *Pediatr Infect Dis J.* 2018;37(1):22-27. doi:10.1097/INF.0000000000001709