



# Real-time PCR per a la vigilància epidemiològica de la malaltia pneumocòccica invasiva (MPI) en pacients pediàtrics

Laura Selva Jové

**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)) 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. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (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)) 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. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (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 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 neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This 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.

Tesi Doctoral

REAL-TIME PCR PER A LA VIGILÀNCIA  
EPIDEMIOLÒGICA DE LA MALALTIA  
PNEUMOCÒCCICA INVASIVA (MPI) EN PACIENTS  
PEDIÀTRICS

Laura Selva Jové





## Facultat de Medicina

Departament d'Obstetrícia, Ginecologia , Pediatria, Radiologia i Medicina Física

### Programa de Doctorat en Medicina

Tesi Doctoral presentada per Laura Selva Jové per optar el títol de Doctora per la  
Universitat de Barcelona

Dra. Carmen Muñoz-Almagro  
Directora

Dra. Iolanda Jordan Garcia  
Directora

Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció de la Dra. Carmen Muñoz-Almagro i  
la Dra. Iolanda Jordan Garcia en el Departament de Microbiologia Molecular de  
l'Hospital Sant Joan de Déu.

Laura Selva Jové

Barcelona, maig 2012



Aquests estudis han estat finançats per:

Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 06/1597) del Ministerio de Sanidad

Fundación Caja de Navarra

Ajuts de suport a la recerca - Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) de la Generalitat de Catalunya (2009/SGR00136)

Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya

The University of Texas Health Science Center at San Antonio, TX, USA



*Al meu pare*





*M'agradaria fer un petit agraïment a totes les persones que en algun moment o altre, tant a nivell professional com a nivell personal, heu format part d'aquest camí que acaba amb aquesta tesi doctoral.*

*Primer de tot, a la Dra. Carmen Muñoz-Almagro, directora d'aquesta tesi doctoral. Mamen, voldria agrair-te tot el què m'has ensenyat i donar-te les gràcies per la confiança dipositada en mi, la paciència, l'ajuda i el temps que m'has dedicat des que vaig començar. Moltes gràcies per donar-me la oportunitat de formar part del teu equip i de desenvolupar-me professionalment al teu costat. Moltes gràcies per l'ajuda i el temps que has dedicat en aquesta tesi, pels teus comentaris i correccions i per tot el teu suport.*

*A la Dra. Iolanda Jordán, codirectora d'aquesta tesi doctoral. Iolanda, moltes gràcies per la teva disponibilitat a col·laborar amb nosaltres en tot moment. Gràcies per l'ajuda i el temps que has dedicat en aquesta tesi, pels comentaris i correccions i per tot el teu suport.*

*A tot el grup d'estudi del FIS per la seva implicació, dedicació i constància en el projecte. Als pediatres, de l'Hospital de la Vall d'Hebrón, Fernando Moraga i de l'Hospital Sant Joan de Déu, Juan-José García-García i Mariona Fernández de Sevilla. A les microbiòlogues de l'Hospital de la Vall d'Hebrón, Gemma Codina i Anna M. Planas, i a tot l'equip del Departament de Salut Pública, a Pilar Ciruela, Sergi Hernández, Joan Batalla, Neus Cardeñosa, Àngela Domínguez i Professor Lluís Salleras.*

*A l'Ordre Hospitalària Sant Joan de Déu, en especial al germà Fernando Aguiló, pel seu treball realitzat a l'Hospital Saint John of God de Lunsar (Sierra Leone) amb els pacients, metges i famílies.*

*Al Dr. Xavier Krauel i a tots els col·laboradors del programa "Apadrina un tractament" de l'Hospital Sant Joan de Déu per fer possible que els nens i nenes de l'Hospital Saint John of God de Lunsar (Sierra Leone) tinguin accés a tractaments o a l'assistència sanitària que necessiten.*

*Al Professor Román Pallarés, de l'Hospital de Bellvitge, per la seva aportació científica i per la oportunitat de poder treballar amb ell.*

*Al Dr. Carlos J. Orihuela, de la Universitat de Texas, i a tot el seu equip, per la seva col·laboració amb el nostre grup i per la seva experiència aportada.*

*A la Dra. Asunción Fenoll, del Centro de Referencia de Neumococos, del Instituto de Salud Carlos III, pel serotipat dels pneumococs.*

*A tots els laboratoris participants del grup d'estudi de la vigilància epidemiològica a Catalunya.*

*Al Dr. Jaume Pérez Payarols, director d'Innovació de l'Hospital Sant Joan de Déu, pel seu suport en tots els projecte de recerca de l'hospital.*

*Al Dr. Emili Bargalló, director de la Fundació Sant Joan de Déu, i a la Roser Arnalte i Maite López, gestores de projectes de la Fundació Sant Joan de Déu, pel seu suport en els diferents projectes d'investigació de la línia de malalties infeccioses.*

*Als investigadors de la línia d'investigació en malalties infeccioses, per la seva aportació científica.*

*Al Dr. Bonaventura Ruiz, responsable del Laboratori Clínic de l'Hospital Sant Joan de Déu i a tota la resta de personal del laboratori (adjunts, tècnics, residents, secretàries) pel dia a dia en el laboratori. Al departament de Microbiologia de l'hospital, als Drs. Amadeu Gené i Teresa Juncosa, adjunts del departament i a tot el seu equip.*

*Als meus companys del departament de Microbiologia Molecular. A la Pepi i la Cinta, per acollir-me tant bé des del principi i per ensenyar-me tots els secrets de la feina del dia a dia en el departament. A la Cristina, la Núria i l'Eva, les meves companyes d'investigació. Cristina, gràcies pels bons moments compartits i també pels bons consells que m'has aportat durant tota aquesta etapa. Núria, gràcies per ser com ets, per ser-hi sempre i per la teva disponibilitat en tot moment; gràcies pel dia a dia en el laboratori i perquè quan no hi ets, se't troba a faltar. A l'Eva, la última incorporació al grup, és d'agrair que hi hagi gent nova que comenci amb ganes i il·lusió el seu projecte en el departament. Al Pedro, que tot i que fa menys temps que estàs amb nosaltres, sempre són d'agrair els teus consells.*

*A les meves amigues, la Bet, la Cristina i la Isis, per tots els anys d'amistat, els moments viscuts i el què ens queda per compartir. A la Sònia i la Raquel, pels anys de convivència i l'amistat que n'ha sorgit. A la Marta, perquè passen els anys i segueixes aquí; gràcies pel teu suport i per totes les experiències viscudes.*

*A la família Vilella-Esteva, en especial, a la Montserrat i al Climent, per acceptar-me tant bé des del primer dia i fer-me sentir un més dels vostres. A la Rut, la Rebeca i el Lluís, l'Israel i la Judit, el Pau i la Kati i als més petits de la casa, la Mireia, el Martí, el Gaizka i la Cinta, per tots els moments que hem compartit i els que ens queden.*

*A la meva petita però gran família. Als meus avis Josep i Pilar, per cuidar sempre de nosaltres, pel dia a dia i per donar-ho tot per nosaltres.*

*Al meu germà Sergi, gràcies per ser com ets, una gran persona que es preocupa i cuida dels seus. Per mi, el millor germà. Tot i ser el petit, he après moltes coses de tu. Gràcies per tot!*

*Als meus pares Joan i M. Àngels, per donar-m'ho tot. Gràcies per l'educació que ens heu donat i els valors personals i familiars amb els que ens heu educat. Gràcies per estar sempre al meu costat i per donar-me suport en tot el què he fet. Gràcies al meu pare, una persona treballadora però sobretot lluitadora, que em va ensenyar que a la vida no et pots rendir fàcilment. Encara que no estiguis amb nosaltres, sempre seràs el meu exemple a seguir.*

*Gràcies a la meva mare, per estar sempre pendent de nosaltres, per escoltar-nos i aconsellar-nos, gràcies per ser una persona tant forta que ens ha ensenyat a estar units. Gràcies per tot!*

*I finalment, al Quirze. Gràcies per ser com ets i per demostrar-me dia a dia el teu afecte i el teu amor. Gràcies per la paciència que sempre tens, gràcies per escoltar-me i valorar-me, per donar-me ànims i per estar sempre al meu costat, en els bons i mals moments. Gràcies per tots aquests anys que hem viscut junts i gràcies per decidir compartir la teva vida amb mi. Aquesta tesi també és teva.*



# ÍNDEX

1	INTRODUCCIÓ .....	1
1.1	La infecció per <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	3
1.1.1	Història .....	3
1.1.2	Microbiologia .....	3
1.1.3	Patogènia i virulència.....	5
1.1.4	Diagnòstic.....	13
1.1.5	Serotipat .....	15
1.1.6	Genotipat.....	19
1.1.7	Resistència a antibiòtics .....	20
1.2	Vigilància epidemiològica.....	23
1.2.1	Vigilància epidemiològica de la malaltia en els països en vies de desenvolupament .....	23
1.3	La vacunació antipneumocòccica .....	26
1.3.1	Vacuna antipneumocòccica polisacàrida 23-valent.....	26
1.3.2	Vacuna antipneumocòccica conjugada 7-valent .....	27
1.3.3	Vacuna antipneumocòccica conjugada 10-valent .....	29
1.3.4	Vacuna antipneumocòccica conjugada 13-valent .....	30
1.3.5	Vacunes proteiques .....	31
1.4	Impacte global de la vacuna conjugada, reemplaçament de serotips i protecció indirecta. ....	32
1.4.1	Epidemiologia de la malaltia en els Estats Units. Canvis en la malaltia després de la introducció de la vacuna. ....	33
1.4.2	Epidemiologia de la malaltia a Europa. Canvis en la malaltia després de la introducció de la vacuna. ....	37
2	JUSTIFICACIÓ I HIPÒTESIS .....	41
2.1	Hipòtesis.....	42
3	OBJECTIUS .....	43
3.1	Estudi 1 .....	43

3.2	Estudi 2 .....	43
3.3	Estudi 3 .....	44
4	MATERIAL I MÈTODES .....	45
4.1	Estudi 1 (Objectiu 1) .....	45
4.1.1	Àmbit d'estudi .....	45
4.1.2	Pacients i període d'estudi.....	46
4.1.3	Dades epidemiològiques i clíniques.....	46
4.1.4	Conservació i preparació de les mostres .....	46
4.1.5	Extracció de l'ADN.....	47
4.2	Estudi 2 (Objectiu 2) .....	48
4.2.1	Àmbit d'estudi .....	48
4.2.2	Pacients i període d'estudi.....	48
4.2.3	Dades epidemiològiques i clíniques.....	48
4.2.4	Conservació i preparació de les mostres .....	49
4.2.5	Extracció de l'ADN.....	51
4.3	Estudi 3 (Objectiu 3) .....	52
4.3.1	Àmbit d'estudi .....	52
4.3.2	Pacients i període d'estudi.....	52
4.3.3	Conservació i preparació de les mostres .....	52
4.3.4	Extracció de l'ADN.....	52
4.4	Definició de malaltia invasiva .....	53
4.5	Proves microbiològiques.....	54
4.5.1	Cultiu microbiològic.....	54
4.5.2	Tècniques de microbiologia molecular: Diagnòstic i serotipat de les mostres per PCR en temps real.....	55
4.5.3	Serotipat.....	63
4.5.4	Anàlisis i interpretació de resultats de les proves basades en la PCR en temps real.....	65
4.5.5	Genotipat.....	67
4.6	Registre de dades i anàlisis estadístic .....	69

4.7	Procediments.....	71
4.7.1	Procediment 1: Preparació i conservació de les mostres per l'extracció del ADN de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	72
4.7.2	Procediment 2: Extracció de l'ADN de les mostres preparades .....	75
4.7.3	Procediment 3: Identificació del aïllats de <i>Streptococcus pneumoniae</i> per cultiu	80
4.7.4	Procediment 4: Reacció de PCR .....	81
4.7.5	Procediment 5: Serotipat per PCR.....	84
4.7.6	Procediment 6: PCR en temps real per a la detecció del gen <i>psrP</i> .....	87
4.7.7	Procediment 7: Genotipat per Multilocus Sequence Typing (MLST) .....	89
5	RESULTATS .....	95
5.1	Estudi 1 .....	97
5.1.1	Pacients inclosos a l'estudi.....	97
5.1.2	Diferències de la distribució de serotips en pacients amb cultiu positiu respecte els pacients amb cultiu negatiu .....	99
5.1.3	Diferències en la distribució de serotips d'acord amb l'edat i la tècnica microbiològica utilitzada per al diagnòstic .....	102
5.1.4	Diferències en la distribució dels serotips en pacients amb pneumònia d'acord amb la tècnica microbiològica utilitzada pel diagnòstic.....	102
5.1.5	Diferències en la distribució de serotips d'acord amb la teràpia antibiòtica prèvia i la tècnica microbiològica utilitzada pel diagnòstic.....	103
5.2	Estudi 2: .....	105
5.2.1	Soques control.....	105
5.2.2	Distribució de serotips en una població de pacients pediàtrics atesos en un hospital de Sierra Leone. ....	106
5.3	Estudi 3 .....	108
5.3.1	Prevalença de <i>psrP</i> en es aïllats clínics de pacients amb MPI i de portadors sans.....	108
5.3.2	Prevalença de <i>psrP</i> d'acord amb el serotip.....	110
5.3.3	Prevalença de <i>psrP</i> d'acord amb la sensibilitat antibiòtica de les soques	



5.3.4	Prevalença de <i>psrP</i> d'acord amb el tipus clonal.....	111
5.4	Resultats addicionals.....	114
5.4.1	Prevalença general de <i>pcpA</i> , <i>psrP</i> i pilus-1. ....	114
5.4.2	Prevalença de <i>pcpA</i> , <i>psrP</i> i pilus-1 d'acord amb la síndrome clínica i la sensibilitat antibiòtica.....	116
5.4.3	Prevalença de <i>pcpA</i> , <i>psrP</i> i pilus-1 d'acord amb el serotip i el clon.....	118
5.5	ANNEX DE RESULTATS .....	122
6	CONCLUSIONS .....	133
6.1	Estudi 1 .....	133
6.2	Estudi 2 .....	133
6.3	Estudi 3 .....	134
7	BIBLIOGRAFIA.....	135
8	ANNEX .....	147

# ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Micrografia electrònica d'escombratge de <i>Streptococcus pneumoniae</i> formant cadenes (Font: Science Photo Library).....	3
Figura 2. Cultiu de <i>Streptococcus pneumoniae</i> en placa d'agar sang (Font: Office of Medical Informatics).....	4
Figura 3. Biosíntesi de la càpsula polisacàrida de <i>Streptococcus pneumoniae</i> (Font: Kadioglu et al. 2008).....	8
Figura 4. Reacció de Quellung. Microfotografia de <i>S. pneumoniae</i> on s'observa un inflament de la càpsula quan la reacció és positiva (Font: Centers for Disease and Control and Prevention).....	16
Figura 5. Panell per a la identificació del serotip/serogrup de <i>S. pneumoniae</i> amb el kit Pneumotest-Latex (Font: Statens Seruminstitut).....	17
Figura 6. Canvis en la incidència (casos/100000 habitants) MPI per grups d'edat durant el període 1998-2007 en els Estats Units (Font: Pilishvili et al. 2010). ....	33
Figura 7. Incidència de la malaltia pneumocòccica invasiva causada pel serotip 19A a Estats Units durant el període 1998-2005 (Font: Moore et al. 2008). ....	34
Figura 8. Principals serotips de <i>S. pneumoniae</i> causants de malaltia pneumocòccica invasiva en nens menors de 5 anys durant els diferents períodes d'estudi (Font: Wenger et al. 2010). ....	35
Figura 9. Incidència de la malaltia pneumocòccica invasiva en una població de nens d'Alaska menors de 5 anys durant el període 1986-2007 (Font: Wenger et al. 2010). ....	36
Figura 10. Incidència de la MPI a Calgary, Atlanta, Canadà en el grup d'edat de 0 a 23 mesos durant el període 1998-2007 (Font: Kellner et al. 2010).....	36
Figura 11. Tendències temporals (A) dels serotips inclosos a la vacuna conjugada 7-valent (PCV7) i (B) dels serotips no inclosos a PCV7 (b) (Font: Fenoll et al. 2009).....	38
Figura 12. Taxes de malaltia pneumocòccica invasiva en nens, per grups d'edat i serotip (Font: Muñoz-Almagro et al. 2008).....	40
Figura 13. Esquema del procediment utilitzat per a la validació de la tècnica a partir de les soques de <i>Streptococcus pneumoniae</i> utilitzades com a control. ....	50
Figura 14. Esquema utilitzat en el departament de Microbiologia Molecular de l'Hospital Sant Joan de Déu per a la identificació i serotipat del pneumococ mitjançant els mètodes moleculars.....	53
Figura 15. Esquema general de la PCR (Font: Applied Biosystems by life technologies). ....	56

Figura 16. Esquema de la reacció de PCR amb sondes Taqman. (Font: Applied Biosystems by life technologies). .....	60
Figura 17. Estructura d'una sonda Taqman MGB. ....	61
Figura 18. Gràfica d'amplificació de la PCR en temps real, mostrant les fases de les que consta (Font: Applied Biosystems by life technologies). .....	65
Figura 19. El cicle de PCR en el qual la mostra arriba a una intensitat de fluorescència per sobre cicle Ct llinar (Font: Applied Biosystems by life technologies). ....	66
Figura 20. Distribució de serotips d'acord amb el diagnòstic microbiològic realitzat per cultiu. ....	100
Figura 21. Distribució de serotips d'acord amb el diagnòstic microbiològic realitzat per PCR en temps real. ....	100
Figura 22. Cobertura de les diferents vacunes conjugades. ....	101
Figura 23. Resultat del serotipat de les 15 mostres de sang seca positives per <i>S. pneumoniae</i> . Altres serotips: Correspon a la resta de serotips no detectats per PCR en temps real (1, 5, 19A, 19F/B/C, 14, 15B/C, 3, 7F/A, 4, 6A, 6B, 8, 9V/A/N/L, 18C/B, 23A, 23F). ....	107
Figura 24. Prevalença de <i>psrP</i> d'acord amb el serotip en grups de més de cinc aïllats. ....	110
Figura 25. Prevalença de <i>psrP</i> d'acord amb el tipus clonal en grups de més de cinc aïllats. ....	113
Figura 26. Prevalença de <i>pcpA</i> , <i>psrP</i> i pilus-1. ....	115
Figura 27. Prevalença de <i>pcpA</i> , <i>psrP</i> i pilus-1 de les soques que contenen les tres proteïnes i dues de les possibles combinacions de proteïnes incloent PcpA/PsrP, PsrP/Pilus-1, PcpA/Pilus-1 entre les soques aïllades de pacients amb MPI (A) i en els portadors sans (B). ....	116
Figura 28. Prevalença de <i>pcpA</i> , <i>psrP</i> i pilus-1 d'acord amb el síndrome clínic entre les soques aïllades de pacients amb MPI. ....	117
Figura 29. Prevalença de <i>pcpA</i> , <i>psrP</i> i pilus-1 d'acord amb els serotips inclosos a les actuals vacunes conjugades PCV7, PCV10 i PCV13. ....	120

# ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Sensibilitat de <i>Streptococcus pneumoniae</i> a la penicil·lina (Font: CLSI, 2011). .....	21
Taula 2. Indicacions de la vacuna antipneumocòccica polisacàrida 23-valent (Font: CDC-ACIP). .....	26
Taula 3. Indicacions de la vacuna antipneumocòccica conjugada 7-valent, juny 2000 (Font: CDC-ACIP). .....	27
Taula 4. Indicacions de la vacuna antipneumocòccica conjugada 7-valent proposades per la CDC-ACIP, octubre 2007 (Font: CDC-ACIP). .....	28
Taula 5. Pauta general de vacunació amb PCV7 (Font: Comité Asesor de Vacunas de la Asociación Española de Pediatría). .....	29
Taula 6. Pauta general de la PCV13 en nens que no han rebut immunització prèvia amb PCV7 o en els que, per edat, reben la primera dosi de PCV13 (Font: ACIP, Estats Units, 2010). .....	30
Taula 7. Calendari recomanat de transacció de la vacunació amb PCV7 a PCV13 en nens que han iniciat la immunització amb la vacuna PCV7 (Font: ACIP, Estats Units, 2010). .....	31
Taula 8. Procediment utilitzat per a la preparació de les soques control .....	50
Taula 9. Primers i sonda del gen de la pneumolisina utilitzats per a la detecció del pneumococ. .....	62
Taula 10. Primers i sonda del gen capsular wzg utilitzats per a la detecció del pneumococ. .....	62
Taula 11. Primers i sonda del gen <i>psrP</i> utilitzats per a la detecció de PsrP. .....	63
Taula 12. Serotips, gen diana, seqüències dels primers i sondes Taqman per al serotipat mitjançant la PCR en temps real (Font: Tarrago et al. 2008). .....	64
Taula 13. Seqüències dels gens <i>aroE</i> , <i>gdh</i> , <i>gki</i> , <i>recP</i> , <i>spi</i> , <i>xpt</i> i <i>ddl</i> utilitzats en el MLST. .....	67
Taula 14. Icones del sistema NucliSENS®easyMAG®. .....	78
Taula 15. <i>Master mix</i> per la PCR del gen de la pneumolisina. .....	82
Taula 16. <i>Master mix</i> per la PCR del gen capsular wzg. .....	82
Taula 17. <i>Master mix</i> per a les reaccions de PCR que contenen un fluoròfor (1 sonda). .....	85
Taula 18. <i>Master mix</i> per a les reaccions de PCR que contenen dos fluoròfors (2 sondes). .....	85
Taula 19. <i>Master mix</i> per la PCR del gen <i>psrP</i> . .....	87
Taula 20. <i>Master mix</i> per la PCR del gen <i>aroE</i> , <i>gdh</i> , <i>gki</i> , <i>recP</i> , <i>spi</i> , <i>xpt</i> , <i>ddl</i> . .....	90

Taula 21. Reacció de seqüenciació. ....	91
Taula 22. Llistat de reactius utilitzats en els procediments. ....	93
Taula 23. Llistat de materials i equips utilitzats en els procediments. ....	94
Taula 24. Distribució del tipus de mostres detectades per cultiu i només per PCR en temps real. ....	98
Taula 25. Presentació clínica de la malaltia en els nens diagnosticats per cultiu microbiològic respecte aquells diagnosticats només per PCR en temps real. ....	99
Taula 26. Distribució de serotips d'acord a l'exposició prèvia a teràpia antibiòtica i la tècnica microbiològica utilitzada per al diagnòstic dels pacients estudiats. ....	104
Taula 27. Resultat de la PCR en temps real dels gens específics per a detectar el serotip de les mostres (A) de sang inoculades en paper de filtre (DBS) i de la sang (B) en fresc de les dilucions 1:10. <i>Nota</i> : POS, Positiu; Ct>40; Detecció en un Ct superior a 40. ....	105
Taula 28. Sensibilitat de la PCR en temps real dels gens de la pneumolisina ( <i>ply</i> ), el gen capsular <i>wzg</i> i els gens específics per a detectar el serotip de les mostres de sang inoculades en paper de filtre (DBS) i de la sang en fresc de les dilucions seriades de les 15 soques control. ....	106
Taula 29. Prevalença de <i>psrP</i> en soques de pneumococ aïllades en pacients amb MPI i en portadors sans. ....	109
Taula 30. Prevalença de <i>psrP</i> d'acord amb la resistència antibiòtica (punts de tall meningis) en les soques aïllades amb pacients amb MPI i en portadors sans. ....	112
Taula 31. Prevalença de <i>pcpA</i> , <i>psrP</i> i <i>pilus-1</i> d'acord amb la sensibilitat antibiòtica. ....	117
Taula 32. Prevalença de <i>pcpA</i> , <i>psrP</i> i <i>pilus1</i> d'acord amb la distribució de serotips. ....	119
Taula 33. Prevalença de <i>pcpA</i> , <i>psrP</i> i <i>pilus-1</i> d'acord amb el tipus clonal. ....	121

# ACRÒNIMS I ABREVIATURES

ACIP	Advisory Committee on Immunization Practices
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ARN	Àcid ribonucleic
AEP	Asociación Española de Pediatría
APP	American Academy of Pediatrics
CB	Càrrega bacteriana
CC	Complex clonal
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	ADN complementari
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentració mínima inhibidora
CNM	Centro Nacional de Microbiología
CPI	Control positiu intern
<i>cps</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis
CST	Capsular Sequence Typing
CT	Capsular Type
Ct	Threshold cycle
DBS	Dried-Blood Spot
DLV	Double locus variant
DS	Dried-spot
FDA	Food and Drug Administration
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GAVI	Global Alliance for Vaccines and Immunization
<i>H.influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipus b
LCR	Líquid cefaloraquidi
MGB	Minor Groove Binder
MLEE	Multi-Locus Enzyme Electrophoresis
MLST	Multi-Locus Sequence Typing
MLVA	Multi-Locus Variable number of tandem repeat Analysis
MPI	Malaltia pneumocòccica invasiva
MT	MLVA Type
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NFQ	Non-fluorescent quencher
NTHi	<i>Haemophilus influenzae</i> no tipable
OMA	Otitis mitjana aguda
OMS	Organització Mundial de la Salut
PBP	Penicillin-binding proteins

PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PCV10	Vacuna antipneumocòccica conjugada 10-valent
PCV13	Vacuna antipneumocòccica conjugada 13-valent
PCV7	Vacuna antipneumocòccica conjugada 7-valent
PFGE	Pulse-Field Gel Electrophoresis
PI-I	Pilus-islet I
PI-II	Pilus-islet II
<i>ply</i>	Pneumolisina
PMEN	Pneumococcal Molecular Epidemiology Network
PNSP	Pneumococs no sensibles a penicil·lina
PPV-23	Vacuna antipneumocòccica polisacàrida 23-valent
PsrP	Pneumococcal serine-rich protein
qPCR	Quantitative-PCR
repPCR	Repetitive sequence-based PCR
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
SLV	Single locus variant
SNV	Serotips no vacunals
<i>S.pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
ST	Sequence type
SV	Serotips vacunals
UFC	Unitats Formadores de Colònies







# INTRODUCCIÓ

*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) és un colonitzador habitual del tracte respiratori superior dels humans. Es tracta d'un patògen comú de l'espècie humana que presenta una elevada taxa de morbiditat i mortalitat arreu del món.

El bacteri pot causar otitis mitjana, sinusitis o infeccions de tracte respiratori superior, (per contigüïtat) però també pot causar malaltia invasiva, quan habita en un territori habitualment estèril, produint pneumònia, bacterièmia, septicèmies i meningitis, entre d'altres.

La malaltia pneumocòccica és un important problema de salut pública i és la principal causa individual de mortalitat infantil en el món. Segons dades de la Organització Mundial de la Salut (OMS), s'estima que a l'any 2000 es van produir 14.5 milions d'episodis greus de malaltia pneumocòccica, que va resultar en 826 000 morts en nens menors de dos anys. Un 61% d'aquestes morts es van produir a l'Àfrica subsahariana i al sud-est asiàtic. Tanmateix, en aquests països i, en especial a les zones rurals, les capacitats de diagnòstic són limitades o inexistents i la identificació de l'agent etiològic es basa en signes i símptomes clínics. És molt important aïllar l'agent etiològic causant de malaltia per tal de poder avaluar el millor tractament possible. No obstant, les tècniques actuals per al diagnòstic de la malaltia presenten una limitada sensibilitat i especificitat.

El cultiu microbiològic, com a mètode de diagnòstic clàssic, té una baixa sensibilitat per a detectar el pneumococ. L'objectiu d'aquesta tesi és avaluar el potencial de les tècniques moleculars per al diagnòstic i caracterització de la malaltia pneumocòccica i discernir si l'ús de tècniques moleculars com la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) poden suposar un avantatge tant per la rapidesa del mètode com per la

detecció del patogen present en una mostra a baixa concentració. L'aplicació d'aquest tipus de tècniques en mostres biològiques impregnades en paper de filtre (*dried-spot*) i conservades a temperatura ambient poden ser un excel·lent sistema per a la detecció i serotipat de *S. pneumoniae* en països en vies de desenvolupament on la falta de recursos econòmics esdevé una de les principals limitacions.

La capacitat del pneumococ de causar malaltia depèn de la presència d'una càpsula polisacàrida que impedeix la fagocitosi. Tot i que la presència de la càpsula és un requisit perquè produeixi malaltia, no és suficient per conferir virulència, sinó que són necessaris una varietat de factors determinants addicionals, com ara les adhesines, les proteases, les toxines, els sistemes de transport i enzims que modifiquen el medi extracel·lular. Recentment, s'ha descobert un determinant de virulència del pneumococ que és la proteïna rica en repeticions de serina, PsrP (*Pneumococcal-serine rich Protein*). Es tracta d'una adhesina que intervé en l'adhesió del pneumococ a les cèl·lules pulmonars. PsrP és un important factor de virulència capaç de causar malaltia i un potencial candidat a una nova vacuna proteica.

## 1.1 La infecció per *Streptococcus pneumoniae*

### 1.1.1 Història

El pneumococ va ser aïllat per primera vegada al 1881 per Louis Pasteur, a partir de saliva d'un pacient infectat pel virus de la ràbia. El mateix any a Estats Units, George Miller Sternberg anunciava el descobriment del pneumococ, relacionant-lo com a principal causant de la pneumònia lobar (Heinemann, 2008). A finals del segle XIX, s'havia relacionat com a agent etiològic important en la pneumònia, meningitis i altres infeccions. A partir del 1926, es va anomenar *Diplococcus pneumoniae* a causa del seu aspecte característic en la tinció de Gram en esput però al 1974 va passar a anomenar-se *Streptococcus pneumoniae* per la morfologia que presenta en la formació de cadenes en medis líquids (Figura 1).

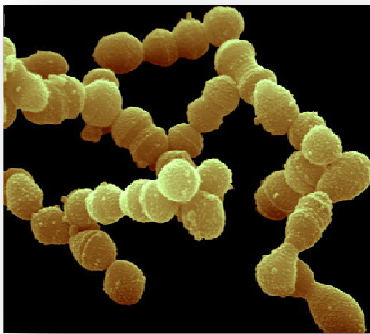


Figura 1. Micrografia electrònica d'escombratge de *Streptococcus pneumoniae* formant cadenes (Font: Science Photo Library).

### 1.1.2 Microbiologia

#### 1.1.2.1 Característiques microbiològiques

*Streptococcus pneumoniae* és un bacteri Grampositiu i alfa-hemolític del gènere *Streptococcus*. Té forma ovalada i l'extrem distal lanceolat, mesura de 0.5 a 1.5µm de diàmetre. No forma endòspores, és immòbil i presenta forma de diplococ. És un microorganisme microaeròfil, catalasa negatiu i fermenta la glucosa a àcid làctic (Heinemann, 2008).

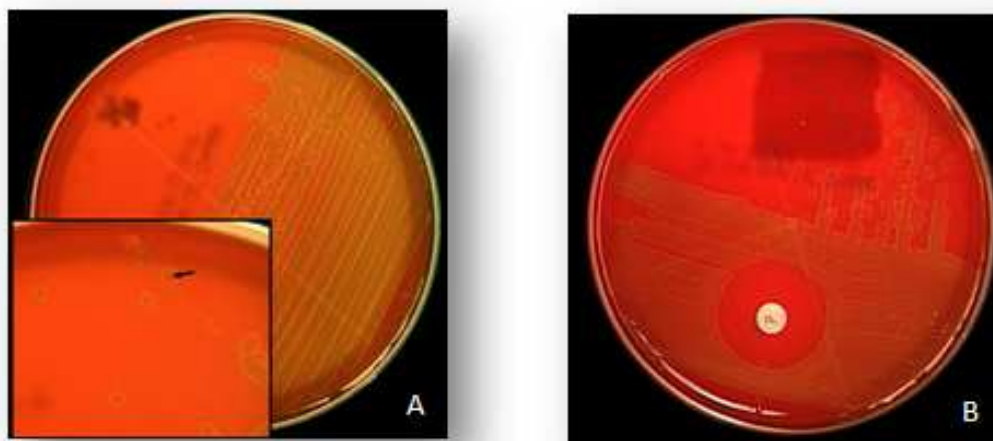
El pneumococ és un bacteri molt exigent, el màxim creixement s'aconsegueix a 37°C al 5% de diòxid de carboni en un medi que contingui sang. En agar sang, les colònies creixen rodejades (diàmetre de 0.5 a 1.5 mm) d'una petita zona verda d'hemòlisi alfa (Figura 2A), que permet diferenciar el *S. pneumoniae* dels estreptococs beta-hemolítics del grup A, però no dels estreptococs del grup viridans que també es troba freqüentment en el tracte respiratori superior. Es necessiten tests especials, com la

fermentació a inulina, la solubilitat a sals biliars o la sensibilitat a optoquina per diferenciar el pneumococ dels estreptococs del grup viridans.

*S. pneumoniae* es un bacteri fràgil que té la capacitat enzimàtica de trencar i desintegrar les cèl·lules. L'autolisina és l'enzim responsable, alliberada durant la fase estacionaria del seu creixement, produeix la mort bacteriana i dificulta la detecció del microorganisme en els cultius.

El criteri mínim per a la identificació i diferenciació dels pneumococs d'altres estreptococs són: alfa-hemòlisis en agar sang, negativitat en la prova de la catalasa, sensibilitat a optoquina i lisis en sals biliars (Tomasz, 2000).

*S. pneumoniae* és sensible a optoquina (Figura 2B) i en presència de sals biliars es produeix una destrucció o lisis bacteriana, aquestes característiques fenotípiques són la base per a la identificació de l'espècie.



*Nota: A. Alfa hemòlisis en una placa d'agar sang d'un cultiu pur de Streptococcus pneumoniae. La fletxa negra mostra una colònia rodejada d'un halo color verd-oliva d'hemòlisis. B. Test de la optoquina (disc P) per identificar Streptococcus pneumoniae. Al voltant del disc s'observa una zona d'inhibició del creixement del pneumococ.*

**Figura 2.** Cultiu de *Streptococcus pneumoniae* en placa d'agar sang (Font: Office of Medical Informatics).

### 1.1.2.2 Característiques estructurals

El pneumococ presenta una estructura complexa, està format per la membrana citoplasmàtica, la paret cel·lular i la càpsula. La paret cel·lular rodeja la membrana citoplasmàtica i confereix al pneumococ la morfologia típica. La composició de la paret del pneumococ està constituïda per un entramat de cadenes de peptidoglicà (mureïna) i els àcids teicoics i lipoteicoics associats a elles, a més de lipoproteïnes i hidrats de carboni formant aquest conjunt una estructura multi-laminar amb un gruix d'entre 15 a

40nm. El peptidoglicà té acció antigènica i els àcids teicoics i lipoteicoics actuen com a mediadors de l'adherència de les cèl·lules epitelials de la mucosa (Tomasz, 2000).

El pneumococ està envoltat per una càpsula externa a la paret cel·lular de naturalesa polisacàrida que durant el procés d'invasió esdevé un determinant essencial de la virulència (Avery i Dubos, 1931). La càpsula polisacàrida és un determinant fonamental de la patogenicitat del pneumococ i del serotip. No obstant això, els anticossos de la càpsula poden abrogar la virulència i proporcionar protecció específica de serotip (Cole, 1913). Actualment, es coneixen 93 tipus capsulars diferents (Calix i Naham, 2010).

### 1.1.3 Patogènia i virulència

*S. pneumoniae* és un colonitzador habitual del tracte respiratori superior i el procés de colonització pot tenir lloc durant els primers dies de vida. La nasofaringe és el principal nínxol ecològic de *S.pneumoniae*; la disseminació des de la nasofaringe al tracte respiratori inferior o a altres llocs, pot causar malaltia pneumocòccica invasiva (MPI). Els nens són portadors habituals del pneumococ, els principals factors de risc associats són tenir menys de 5 anys, tenir germans petits o anar a la guarderia (Nunes et al. 2005). En relació amb els adolescents o adults, els factors de risc que s'associen als portadors són fumar, l'asma o una infecció aguda del tracte respiratori (Regev-Yochay et al. 2004). La transmissió des dels nens als germans, familiars propers i els adults és una de les principals causes de la MPI (Regev-Yochay et al. 2004; Lynch et al. 2009a). La majoria dels nens tenen com a mínim una infecció pneumocòccica (la més freqüent, otitis mitja) durant els 5 primers anys de vida.

La incidència de la MPI és més gran en els individus  $\leq 2$  anys i en els  $\geq 65$  anys, sent els pacients immunodeprimits o amb comorbiditats més susceptibles a infeccions greus i invasives.

La taxa de colonització en nens sans, en països desenvolupats, s'estima al voltant del 30 al 50% (Rodrigues et al. 2009), però en els països en vies de desenvolupament s'estima que la taxa de colonització nasofaringe és de 2 a 3 vegades superior a la dels països desenvolupats (Hill et al. 2006; Dagan et al. 2010). Un estudi realitzat en una població de Gambia, mostrava una taxa de colonització de la població en general del 72%, que en el cas dels bebès menors d'un mes i en els nens menors d'un any, les taxes de colonització arribaven al 93% i 97%, respectivament (Hill et al. 2006).

Existeixen alguns factors que afavoreixen la transmissió del microorganisme com és la sobre població o el contacte proper d'individus en espais tancats. Alguns autors han descrit brots localitzats d'infeccions produïdes per pneumococ en poblacions tancades com campaments militars (Vainio et al. 2009), presons (Mehiri-Zghal et al. 2010), albergs municipals d'acollida d'individus sense sostre (Birtles et al. 2005) o llars d'infants (Rodrigues et al. 2009).

L'estat de portador del pneumococ és necessari per transmetre el bacteri i per causar malaltia invasiva. Les infeccions greus produïdes pel pneumococ són el resultat, per una banda, de les accions directes dels factors de virulència del bacteri i per altra banda, de la resposta immunitària de l'hoste al patogen. Els determinants de virulència del pneumococ i la corresponent resposta immunitària produeixen quatre efectes principals: Adhesió, invasió, inflamació i xoc (Gillespie i Balakrishnan, 2000). El pneumococ s'uneix a les cèl·lules epitelials de la mucosa de la nasofaringe. La malaltia és causada per disseminació del pneumococ cap al sinus o l'orella mitja, l'aspiració cap al pulmó o per la invasió al torrent sanguini. La progressió a pneumònia requereix factors addicionals (Tuomanen et al. 1995; Gillespie i Balakrishnan, 2000), ja que el pneumococ ha de sobrepassar amplis mecanismes de defensa del tracte respiratori que inclouen: cèl·lules secretores de muc, reflexes de l'epiglotis, cilis o tos. El principal mecanisme de defensa de l'hoste davant el pneumococ és la fagocitosis facilitada per la resposta immune humoral i cel·lular que inclou monòcits/macròfags, leucòcits polimorfonuclears, anticossos anticapsulars i limfòcits.

El pneumococ es transmet de persona a persona per secrecions (gotes) respiratòries. No tots els serotips tenen la mateixa capacitat de produir malaltia, hi ha serotips que colonitzen millor la nasofaringe però són poc invasius (per exemple, els serotips 19F o 23F) mentre que hi ha altres serotips que colonitzen poc però tenen una major predisposició a produir malaltia invasiva; serotips com el 1, 4 o 7F (Hausdorff et al. 2005).

Les manifestacions de la infecció per pneumococ es classifiquen en (CDC, 1997):

1. Portador nasofaringi asimptomàtic
2. Malaltia pneumocòccica no invasiva: Otitis mitjana aguda (OMA), sinusitis, infecció del tracte respiratori superior.
3. Malaltia pneumocòccica invasiva: Definida com l'aïllament de *Streptococcus pneumoniae* o detecció del seu ADN en un territori normalment estèril (sang, líquid cefaloraquídi, líquid pleural). Pot donar manifestacions clíniques com: Pneumònia bacterièmica amb o sense vessament pleural, bacterièmia,

meningitis o septicèmia entre altres (osteomielitis, artritis, endocarditis, cel·lulitis i abscess cerebral).

### **1.1.3.1 Principals factors de virulència**

*S. pneumoniae* produeix diferents factors de virulència que estan involucrats en el procés de producció de la malaltia. Els estudis de seqüenciació del genoma de diferents soques de pneumococ en combinació amb els estudis moleculars, han demostrat que la variabilitat del genoma té un paper important en la capacitat del pneumococ d'interaccionar amb l'hoste (van der Poll et al. 2009; Mithcell i Mitchell, 2010).

Entendre el paper que juguen aquests factors permetrà entendre la patogènia de la infecció i esdevindran possibles punts d'intervenció per al tractament o el desenvolupament de futures vacunes (Frolet et al. 2010).

Alguns d'aquest factors de virulència són: la càpsula, la pneumolisina, el pilus i algunes proteïnes de superfície.

### **Càpsula**

El polisacàrid capsular és, probablement, el factor de virulència més important del pneumococ. El paper de la càpsula en la virulència prové de la seva capacitat antifagocítica. La càpsula té un paper crucial durant els processos de colonització, invasió i disseminació a través del tracte respiratori.

La càpsula polisacàrida consisteix en la capa més externa de les cèl·lules de *S. pneumoniae*, i té un gruix aproximat de 200-400nm. Amb excepció del serotip 3 i possiblement algun altre, la càpsula està unida per enllaços covalents al peptidoglicà de la superfície més externa de la paret cel·lular. Actualment, es coneixen 93 tipus capsulars (serotips) diferents (Calix et al. 2010). La producció de la càpsula és indispensable per la virulència del pneumococ i és altament antifagocítica en individus no immunitzats (Kadioglu et al. 2008).

La majoria de les càpsules estan carregades a pH fisiològic i aquest fet pot interferir directament amb la interacció amb els fagòcits.



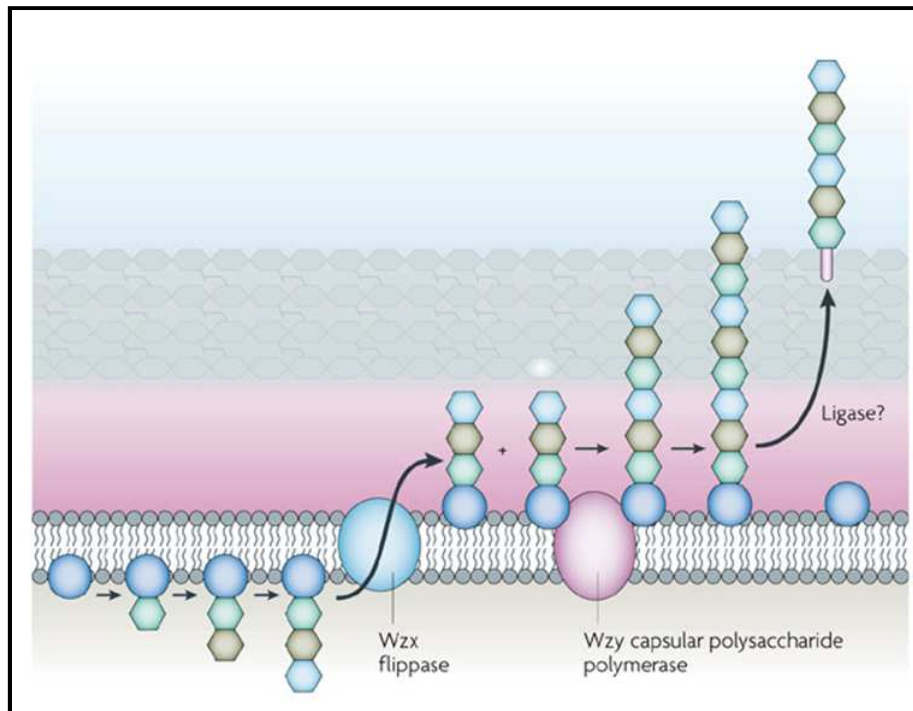


Figura 3. Biosíntesi de la càpsula polisacàrida de *Streptococcus pneumoniae* (Font: Kadioglu et al. 2008).

La biosíntesi de la càpsula polisacàrida està regulada pel locus *cps* (de l'anglès, *capsular polysaccharide biosynthesis*) (Garcia et al. 2000), que està localitzat entre els gens *dexB* i *aliA* (aquests dos gens no participen en la biosíntesi) i proper al gen codificant de la proteïna PBP1A (de l'anglès, *Penicillin-binding Protein 1A*). La capacitat de regular la producció del polisacàrid capsular a nivell transcripcional, translacional o post-translacional és important per la supervivència del pneumococ en diferents ambients de l'hoste. Fins al moment, no s'han identificat elements que regulin la transcripció del promotor *cps*. Els primers quatre gens del locus *cps* (*cpsA-D*) són comuns a gairebé tots els serotips del pneumococ, en excepció dels serotips 3 i 37. Les proteïnes que estan codificades per aquests gens, CpsA-D s'han associat a l'expressió del polisacàrid capsular. La regió central del locus *cps* compren gens que codifiquen glicosil-transferases específiques (Figura 3) que uneixen les repeticions d'oligosacàrids específiques de cada serotip a un transportador lipídic. En aquesta regió, hi ha un enzim "flipasa" (*Wzx*) que transporta les unitats repetitives a la cara externa de la membrana i una polimerasa (*Wzy*) que uneix les unitats entre elles (Kadioglu et al. 2008).

La càpsula forma una capa inerta que evita que tant la regió del fragment cristal·litzable de les immunoglobulines G com el component C3b del sistema de complement humà, el qual s'uneix a estructures més profundes de la superfície

cel·lular (per exemple, àcids teicoics i proteïnes de superfície), interaccionin amb els seus receptors a les cèl·lules fagocítiques. A més a més, la càpsula pot reduir la quantitat de complement que és dipositat a la superfície del bacteri (Kadioglu et al. 2008; Hyams et al. 2010).

La virulència del pneumococ està relacionada amb el gruix de la càpsula en una soca i serotip particulars. No obstant, no tots els serotips tenen la mateixa virulència o capacitat de produir malaltia. Aquest fet reflexa la seva capacitat relativa de resistir la fagocitosis, així com diferències en la seva capacitat per elidir la resposta immune humoral. S'ha reportat que hi ha diferències depenent del serotip, del lloc i la quantitat de C3b unit covalentment a la superfície de les cèl·lules del pneumococ opsonitzades així com diferències en el procés de degradació de C3b a iC3b i C3d (Hyams et al. 2010). En un estudi realitzat per Melin et al. (Melin et al. 2010) es va demostrar que els serotips 6B i 19F es diferencien en la resistència a la deposició del complement C3 i en el procés d'opsonofagotització. En aquest estudi es va avaluar la resistència al complement i la susceptibilitat a la opsonofagocitosis dels diferents serotips inclosos a les vacunes antipneumocòcciques disponibles i es va demostrar que la concentració d'anticossos anticapsulars necessaris per a opsonitzar estava inversament correlacionada amb la deposició de C3 en el serotip. En l'anàlisi, les soques de serotip 1 van mostrar major resistència a la deposició de C3, juntament amb els serotips 5 i 19F, mentre que el serotip 23F va ser el més sensible a la opsonofagocitosis (Melin et al. 2010).

També s'ha reportat que la càpsula confereix un grau de resistència a l'autòlisi espontània o induïda per antibiòtics, tot i que aquesta capacitat varia significativament entre serotips capsulars (Kadioglu et al. 2008).

L'anàlisi molecular ha demostrat que hi ha propietats o altres factors de virulència que estan relacionats amb un tipus clonal en particular, a més del serotip capsular. Aquest diferents factors també poden influir en el potencial de *S. pneumoniae* a causar malaltia invasiva en humans. És a dir, el pas de colonitzador nasofaringi a malaltia invasiva inclou un canvi important en l'expressió de determinants de virulència importants com l'adaptació del patogen al microambient alterat. La màxima expressió de la càpsula és essencial per la virulència sistèmica, però l'expressió d'altres estructures de la superfície, com ara les adhesines, també està influenciada pel gruix de la càpsula.

Tot i els estudis realitzats, avui en dia encara no se sap en quina mesura les diferències en la resposta inflamatòria induïda es deuen a la pròpia càpsula i /o una

altra relació genètica més estreta que probablement preval en les soques del mateix serotip, però, s'han obert noves línies d'investigació com és la recerca de l'expressió gènica. Estudis en aquest camp han mostrat que en models animals aquells gens amb uns nivells d'expressió més grans (i que per tant, són essencials per a la replicació i la virulència) estan involucrats en la biosíntesi de l'embolcall cel·lular (càpsula polisacàrida i paret cel·lular), en el metabolisme i la biosíntesi d'aminoàcids (Orihuela et al. 2004).

### **Pneumolisina**

La pneumolisina (*ply*), probablement, és el factor de virulència proteic més estudiat del pneumococ. Pertany a la família de les toxines formadores de porus i la produeixen més de 20 espècies de bacteris Gram positius, originalment, conegudes com a hemolisines. És una proteïna de 53 kDa produïda gairebé per totes les soques del pneumococ i s'allibera quan es produeix la lisis de la paret cel·lular, destruint les membranes cel·lulars que activen el complement, amplificant així, la resposta inflamatòria de l'hoste (Price i Camillili, 2009).

La pneumolisina es localitza en el citoplasma i s'allibera durant la fase de creixement logarítmica; durant la fase estacionaria, els nivells de *ply* augmenten significativament. L'alliberació de la pneumolisina coincideix amb la lisi de la cèl·lula.

La *ply* activa el sistema de complement, estimula l'apoptosis cel·lular de l'hoste i actua com a citolisina depenent de colesterol unint-se al colesterol de la membrana plasmàtica de les cèl·lules de l'hoste, oligomeritzant-se, insertant-se a la membrana i formant porus de 350-450Å de diàmetre (Price i Camillili, 2009). Presenta múltiples propietats biològiques, relacionades amb els efectes citotòxics i inhibidors en el teixit hoste i en les cèl·lules immunitàries, l'activació del complement i l'estimulació de citoquines pro inflamatòries i antiinflamatòries. En un estudi realitzat per Kadioglu et al. (Kadioglu et al. 2008) en un model de ratolí sèptic, es va observar que si s'expressava la pneumolisina, un elevat nombre de pneumococs eren presents en el torrent sanguini i l'hoste desenvolupava la infecció, no obstant, si no s'expressava la pneumolisina, també es detectava un elevat nombre de pneumococs en el torrent sanguini, però sense símptomes, i l'hoste desenvolupava una bacterièmia oculta. Els pacients colonitzats i els pacients amb pneumònia pneumocòccica no bacterièmica presenten nivells més elevats d'anticossos IgG que els pacients amb pneumònia pneumocòccica bacterièmica, el que suggereix que aquests anticossos poden tenir un paper en la protecció (Musher et al. 2001).

## Pilus

El pilus es va observar per primera vegada a la superfície del pneumococ al 2006. El pilus està involucrat en la virulència i intervé en l'adhesió del pneumococ a les cèl·lules. Els gens que codifiquen la producció del pilus, el locus *rlr* o el *pilus-islet I* (PI-I) codifiquen tres proteïnes estructurals (RrgA, RrgB i RrgC) i tres enzims sortasa (SrtB, SrtC i SrtD) que s'encarreguen de la unió de les subunitat (Hilleringmann et al. 2008). Recentment, s'ha descobert un segon tipus de pilus (*pilus-islet II*, PI-II) que està relacionat amb l'adhesió del pneumococ a les cèl·lules de la mucosa. El locus *rlr* no es troba universalment distribuït en les espècies, i la seva presència es correlaciona amb el genotip de *S. pneumoniae* i no amb el serotip (Moschioni et al. 2008).

En un estudi realitzat per Moschioni et al. (Moschioni et al. 2010) per avaluar la distribució dels dos tipus de pilus (PI-I i PI-II) en mostres clíniques d'OMA, van mostrar que el PI-I era present en el 30.1% de les mostres estudiades i que el PI-II era present només en el 7%. A més a més, van trobar que (1) el 50% de les mostres positives per PI-I corresponien a clons internacionals Spain9V-3 (ST156) i Taiwan19F-14 (ST236), (2) que el pilus PI-II no es trobava present en absència de PI-I i (3) que la freqüència de PI-I era superior entre mostres amb resistència antibiòtica.

Basset et al. (Basset et al. 2007) van estudiar la freqüència d'ocurrència del pilus determinada per la presència del gen *rrgC* (que codifica la proteïna RrgC) i analitzar l'associació amb la virulència, el serotip capsular i el genotip a partir d'una col·lecció de soques de pneumococ aïllades d'hemocultius realitzats en una població d'indis americans. Els resultats mostraven que el 21.4% de les soques presentaven el gen *rrgC*, però no es van observar diferències entre les mostres obtingudes de la nasofaringe (controls) d'aquelles obtingudes de llocs estèrils (sang, líquid pleural). Les soques de pneumococ que corresponien a un serotip vacunal, inclòs a a vacuna antipneumocòccia conjugada 7-valent, tenien més probabilitat de tenir el pilus que les soques amb un serotip no vacunal. Entre les soques amb un mateix *sequence-type* (ST), hi havia una elevada concordança entre el ST i la presència/absència del gen *rrgC*.

Els pneumococs que expressen pilus són capaços de produir una major resposta de factor de necrosis tumoral (TNF, de l'anglès *Tumor Necrosis Factor*) en infeccions sistèmiques que els mutants isogènics que no expressen pilus, fet que suggereix un paper en la resposta inflamatòria de l'hoste (Barocchi et al. 2006).

## Proteïnes de superfície

S'han estudiat diferents proteïnes de la superfície del pneumococ que cooperen amb la patogenicitat d'aquest microorganisme. Entre les més importants i més estudiades, destacar la proteïna de superfície A, la proteïna rica en serina - PsrP, les proteïnes d'unió a colina, com la PcpA, les neuraminidases, la hialuronidasa i els enzims lítics, en particular LytA que és la principal autolisina del bacteri.

La proteïna de superfície A es troba a la superfície de gairebé tots els pneumococs i actua inhibint l'activació del complement (Cao et al. 2010). L'autolisina LytA (i altres proteïnes com LytB, LytC i CbpE) formen part d'una família de proteïnes (*Choline-binding proteins*) implicades amb la patogenicitat que s'ancoren a la superfície del pneumococ mitjançant un mecanisme peculiar que implica el reconeixement dels residus de colina presents en els àcids teicoics de la paret cel·lular del pneumococ (Eldholm et al. 2009).

La neuraminidasa és un enzim present en tots els serotips de pneumococ, es coneixen dues formes de l'enzim, neuraminidasa A i neuraminidasa B. La neuraminidasa A es localitza a la superfície del bacteri i conté una seqüència a través de la qual podria unir-se al peptidoglicà.

La proteïna de superfície C (PspC, anomenada també CbpA) actua com a adhesina, unint-se al receptor polimèric de les immunoglobulines durant la invasió.

Una altra proteïna estudiada recentment és la PsrP (*Pneumococcal serine-rich Protein*), aquesta proteïna està involucrada en la formació d'agregats bacterians a la nasofaringe i als pulmons de ratolins infectats (Sanchez et al. 2010). La PsrP és una adhesina codificada dins d'una illa de patogenicitat *psrP-secY242* de 37 kb (Obert et al. 2006) que pertany a la família de les proteïnes riques en serina és la PsrP (Shivshankar et al. 2009) dels bacteris Grampositius. En el cas del pneumococ, la presència de PsrP està associada positivament amb les soques que causen malaltia en humans, i s'ha demostrat que la PsrP intervé en l'adhesió del pneumococ a la keratina 10 a les cèl·lules pulmonars (Shivshankar et al. 2009). Anticossos contra PsrP neutralitzen l'adhesió del pneumococ a les cèl·lules in vitro i inhibeixen la formació de biofilms (Rose et al. 2008; Sanchez et al. 2010). A més, la immunització passiva de ratolins amb antisèrum PsrP o la immunització activa amb una proteïna recombinant protegeix els ratolins contra el pneumococ (Rose et al. 2008). Per tant, PsrP és un important factor de virulència pel qual *S. pneumoniae* és capaç de produir malaltia i, per tant, esdevé un potencial candidat de vacuna.

La proteïna PcpA (*Pneumococcal choline-binding protein A*) es transcriu com a un transcript monocistrònic de 2.3kb que codifica una putativa proteïna de 79kDa que conté un domini d'unió a colina en l'extrem C-terminal. La PcpA conté diverses repeticions riques en leucina a l'extrem N-terminal. La proteïna està sota control del regulador depenent de magnesi *psaR* (Glover et al. 2008). Un estudi sobre mutagènesis realitzat per Hava and Camilli (Hava i Camilli, 2002) on els mutants es veien obligats a competir amb els bacteris *wt* durant les infeccions es va demostrar com els mutants de PcpA presentaven virulència disminuïda en models murins de sepsis i pneumònia. En aquest estudi, els ratolins van ser infectats amb el serotip 4 de *S. pneumoniae* per aspiració en els pulmons (model pneumònia) i per injecció intraperitoneal (model sepsis) (Hava i Camilli, 2002).

### **Factors relacionats amb l'hoste**

A més a més dels factors de virulència relacionats amb el microorganisme existeixen una sèrie de factors relacionats amb l'hoste com són les cèl·lules epitelials respiratòries, els macròfags alveolars, els neutròfils reclutats, les cèl·lules T CD4+, la opsonització per components del complement, la fagocitosi per les cèl·lules mieloides així com la producció d'una varietat de citokines pro-inflamatòries i anti-inflamatòries que actuen com a principals efectors de la resposta innata immune de l'hoste (Calbo et al. 2010).

Un article recent de van der Poll et al. (van der Poll et al. 2009) resumeix els descobriments sobre el mecanisme molecular essencial utilitzat per *S. pneumoniae* per evadir la resposta immune innata i adquirida de l'hoste.

#### **1.1.4 Diagnòstic**

Clàssicament, el cultiu bacterià ha estat la tècnica de referència o "gold-standard". La identificació d'un cas de MPI requereix l'aïllament i identificació de *S. pneumoniae*. El cultiu es pot realitzar en mostres de sang (hemocultiu), líquid cefaloraquidi (LCR), líquid pleural o altres teixits. El cultiu microbiològic requereix aïllar i identificar *S. pneumoniae* d'una mostra estèril i es necessiten de 48 a 72 hores per confirmar el resultat. Es tracta d'una tècnica molt específica però amb una baixa sensibilitat (Saha et al. 2011), ja que en el cas dels pacients pediàtrics, la dificultat per recollir un volum adequat de mostra de sang per l'hemocultiu o bé l'antibioteràpia prèvia que ha rebut el pacient, poden donar lloc a falsos negatius (Zhang et al. 1995; Lahti et al. 2006;

Flayhart et al. 2007; Resti et al. 2009). Aquesta baixa sensibilitat ha obligat a buscar mètodes complementaris per al diagnòstic.

Els mètodes basats en la PCR en temps real permeten identificar i quantificar fragments d'ADN del pneumococ en un temps inferior a tres hores. S'ha demostrat una elevada especificitat i sensibilitat de la PCR respecte el cultiu (Zhang et al. 1995; Tarrago et al. 2008; Muñoz-Almagro et al. 2011; Ceyhan et al. 2010; Azzari et al. 2011) a més a més dels avantatges que presenten les tècniques moleculars, com la rapidesa del mètode, no requereixen mantenir viu el bacteri i permeten la detecció del patogen present en una mostra a baixa concentració. Un altre avantatge que ofereixen els mètodes moleculars és la possibilitat de quantificar la càrrega bacteriana de l'ADN del pneumococ, que pot ser útil per al diagnòstic i maneig clínic dels pacients amb pneumònia i empiema (Muñoz-Almagro et al. 2011). Aquesta tècnica que ha estat validada pel nostre grup a l'hospital Sant Joan de Déu permet quantificar la càrrega bacteriana del pneumococ mitjançant una PCR en temps real (detecció del gen de la pneumolisina).

La detecció de seqüències conservades en gens de *S. pneumoniae* com la pneumolisina (gen *ply*) (Lahti et al. 2006; Matos et al. 2006; Corless et al. 2006) o l'autolisina (gen *lytA*) (McAvin et al. 2001; Llull et al. 2006) mitjançant la PCR o bé la PCR en temps real aplicada a mostres estèrils com plasma, líquid pleural o LCR, han incrementat el diagnòstic microbiològic de la MPI (Azzari et al. 2008). Azzari et al. (Azzari et al. 2008) en un estudi realitzat a partir de mostres clíniques mitjançant mètodes moleculars, reportava una sensibilitat superior respecte el cultiu i un increment de la incidència de MPI en nens italians.

Resti et al. (Resti et al. 2009) en un estudi comparatiu de l'efecte del tractament antibiòtic previ en el diagnòstic de la MPI mitjançant el cultiu i els mètodes moleculars, reportava un increment de la sensibilitat dels mètodes moleculars, principalment en aquells pacients exposats a antibiòtic previ i pacients amb pneumònia.

Tot i els avantatges que presenten els mètodes moleculars en el diagnòstic de la malaltia, el que s'observa en diferents estudis sobre l'ús de la PCR és que els resultats obtinguts poden ser molt heterogenis i fins i tot contradictoris. Recentment, Avni et al. (Avni et al. 2010) ha publicat un metanàlisi a partir d'una revisió de diferents estudis sobre mètodes moleculars basats en la PCR per al diagnòstic de *S. pneumoniae* causant de MPI a partir de mostres de sang. Els autors observen una heterogeneïtat en els resultats de diferents estudis pel fet que s'utilitzen diferents tipus de mètodes de PCR, diferents gens diana, s'emmagatzemen les mostres congelades i es processen

diferents tipus de mostres (sang total o plasma), a més a més de les característiques dels diferents pacients i en diferents síndromes clíniques. Els autors conclouen que “la falta d’un patró de referència adequat podria haver causat una subestimació dels resultats de la PCR” (Avni et al. 2010).

### 1.1.5 Serotipat

Els mètodes clàssics, per a l’estudi del polisacàrid capsular, basats en el cultiu, inclouen la reacció de Quellung (Hare et al. 2009), considerada el “gold-standard”, l’aglutinació en làtex (Sanz et al. 2010), la co-aglutinació (Rajalakshmi et al. 2001) i l’assaig dot-blot (Fenoll et al. 1997). L’elevat cost dels antisèrums, la subjectivitat en la interpretació o els requeriments tècnics especialitzats són alguns dels inconvenients que presenten aquests mètodes. A més a més, es requereix mantenir el bacteri viu i aquest fet esdevé un altre inconvenient en el cas dels cultius negatius. L’ús d’antibiòtics previ a l’ingrés hospitalari fa que, en alguns casos, no sigui possible aïllar el pneumococ per cultiu i per tant, no es puguin aplicar les tècniques de serotipat basades en el cultiu.

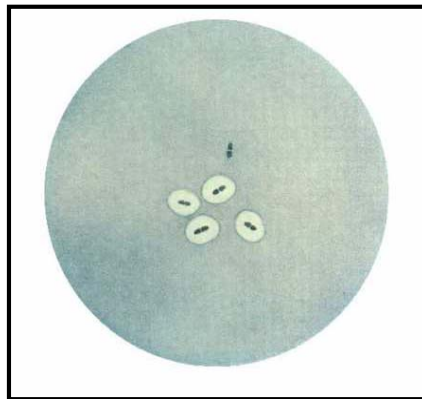
La reacció de Quellung ha esdevingut l’eina clàssica per al serotipat del pneumococ. Es va descriure per primera vegada a l’any 1902 pel científic Fred Neufeld i s’ha utilitzat per a identificar els 93 tipus capsulars que es coneixen. Consisteix en una reacció de immunoprecipitació entre antisèrums específics i l’antigen polisacàrid del bacteri, que fa visible la seva càpsula a nivell microscòpic quan s’utilitza un contrast de fase o afegint blau de metilè. Si la reacció és positiva, la càpsula esdevé opaca i sembla que s’engrandeixi (Hare et al. 2009). Quellung és la paraula alemanya per “sweelling” i descriu l’aparença microscòpica del pneumococ després de que l’antigen polisacàrid reaccionari amb l’anticòs específic. Com a resultat d’aquesta combinació i la precipitació de la molècula complexa formada, la càpsula sembla inflar-se, com a conseqüència de la major tensió superficial, i els seus contorns queden clarament demarcats (Figura 4).

El mètode de l’aglutinació en làtex (Pneumotest-Latex; Statens Seruminstitut) per al serotipat del pneumococ consisteix en un pool de 12 antisèrums (A-F, H, P-T) que permet tipar els 23 serotips inclosos a la vacuna polisacàrida 23-valent. Els antisèrums estan constituïts per micropartícules de làtex recobertes d’anticossos contra l’antigen específic del polisacàrid capsular que és específic dels serotips/serogrups. Les soques es classifiquen en serotips, serogrups o pools de serogrups a partir de colònies de pneumococ aïllades per cultiu. La identificació del serotip/serogrup es realitza



mitjançant la combinació de resultat dels diferents panells (Figura 5). Per confirmar definitivament els serotips d'alguns serogrupos es requereix una tècnica addicional (per exemple, la reacció de Quellung) (Sanz et al. 2010).

La tècnica de co-aglutinació permet visualitzar millor les reaccions d'aglutinació utilitzant, enlloc de partícules de làtex, cèl·lules de *Staphylococcus aureus* (soca Covan I) que contenen a la paret cel·lular una elevada proporció de proteïna A, que fixa només l'extrem de les cadenes pesades dels anticossos, deixant lliures els dos extrems reactius per fixar-se als antigens (Rajalakshmi et al. 2001).



**Figura 4.** Reacció de Quellung. Microfotografia de *S. pneumoniae* on s'observa un inflament de la càpsula quan la reacció és positiva (Font: Centers for Disease and Control and Prevention).

L'assaig dot-blot per al serotipat del pneumococ consisteix en una reacció antigen-anticòs més senzilla que un assaig western-blot, northern-blot o southern-blot amb la diferència que no es requereix el pas previ de l'electroforesi, sinó que es treballa directament sobre una membrana (nitrocel·lulosa). Sobre la membrana s'aplica una gota de solució concentrada que conté el pneumococ i s'incuba amb antisèrums específics de cadascun dels serotips testats. L'absorció de la gota provoca l'adhesió a la membrana, quedant en forma d'una taca o "dot". En el cas de reacció positiva, s'observen punts negres rodejats d'un halo (Fenoll et al. 1997).

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

Figura 5. Panell per a la identificació del serotip/serogrup de *S. pneumoniae* amb el kit Pneumotest-Latex (Font: Statens Seruminstitut).

#### 1.1.5.1 Nous mètodes de detecció molecular per al serotipat del pneumococ

Els mètodes moleculars, basats en la detecció del ADN no precisen mantenir el microorganisme viu i tenen el potencial per solucionar algunes de les dificultats associades al cultiu. Des de fa uns anys, s'han desenvolupat diferents tècniques moleculars basades en la PCR per al serotipat del pneumococ. Els primers estudis quedaven limitats a un reduït nombre de serotips (Brito et al. 2003; Lawrence et al. 2003) però Pai et al. (Pai et al. 2006) van desenvolupar una PCR múltiplex seqüencial per a determinar 29 serotips capsulars (1, 3, 4, 5, 6A/C, 6B/D, 7F, 7C, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B/C, 16F, 17F, 18, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 31, 33, 34, 35B, 35F i 38) diferents a partir de soques de *S. pneumoniae*. En el moment, les tècniques de PCR desenvolupades quedaven restringides a estudis realitzats en soques de *S. pneumoniae*, però, posteriorment, diferents autors van desenvolupar tècniques de PCR per al serotipat del pneumococ a partir de mostres de pacients amb cultiu negatiu (Saha et al. 2008; Tarrago et al. 2008; Azzari et al. 2010). Tarragó et al. (Tarragó et al. 2008), en col·laboració amb el nostre grup, van desenvolupar una PCR en temps real per al serotipat de mostres clíniques d'individus amb cultiu negatiu. Aquesta nova tècnica presentava una elevada sensibilitat i especificitat en detectar i identificar els diferents serotips testats. Aquesta tècnica permet detectar a través d'una PCR en temps real, mitjançant l'ús de sondes fluorescents, els serotips 1, 3, 5, 7F/A, 19A, 19F/B/C, 14, 15B/C, 4, 6A/C, 6B/D, 8, 9V/A/N/L, 18C/B, 23A i 23F. Les tècniques moleculars per al serotipat del pneumococ es basen en la detecció de gens presents en el locus cps, flanquejat pels gens *dexB* i *aliA*. Els primers quatre gens es troben

conservats en gairebé totes les soques de pneumococ, mentre que a la part central del loci hi ha els gens serotip-específic que són la base per a la diferenciació dels diferents pneumococs mitjançant els mètodes basats en la PCR. Les seqüències del loci cps de tots els diferents serotips estan disponibles a la web de l'Institut Sanger ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/S\\_pneumoniae/CPS/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pneumoniae/CPS/)).

Un altre avantatge que permeten els mètodes moleculars en comparació amb el mètode tradicional és la disminució del cost de la tècnica i del temps de treball necessari per realitzar-les (Morais et al. 2007; Dias et al. 2007).

Des de fa uns anys també s'utilitza la tecnologia microarray per al serotipat del pneumococ. Aquesta tecnologia permet l'anàlisi de diferents paràmetres en un sol experiment. Els mètodes basats en microarray són relativament ràpids, sensibles i adequats per a processar assaigs amb un elevat rendiment. Wang et al. (Wang et al. 2007) van desenvolupar un microarray per a la identificació dels serotips de *S. pneumoniae* inclosos a la vacuna antipneumocòccica polisacàrida 23-valent i uns altres 20 serotips relacionats. En aquest estudi també es van dissenyar sondes per a detectar l'ADN ribosòmic 16S i les sondes específiques dels serotips-serogrup estaven basades en les seqüències dels gens *wzy* i *capA*.

Recentment, Tomita et al. (Tomita et al. 2011) han publicat un nou sistema de microarray basat en oligonucleòtids per al serotipat del pneumococ que identifiquen seqüències específiques del gen de la glicosil-transferasa, que conté regions específiques serotip-serogrup. Amb aquest mètode, a diferència de Wang et al. (Wang et al. 2007) no només permet discriminar serotips sinó que permet obtenir informació de l'estructura del polisacàrid capsular.

El desenvolupament de microarrays basats en proteïnes, i concretament utilitzant anticossos, ha crescut darrerament en l'àrea de la proteòmica. Marimon et al. (Marimon et al. 2010) han desenvolupat una nova tècnica per al serotipat de *S.pneumoniae* basada en un microarray d'anticossos. El microarray desenvolupat contenia anticossos policlonals de conill (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) específics per tipar 83 dels 93 serotips de *S. pneumoniae*. El serotipat d'una soca es basava en una reacció positiva contra antisèrum del serotip/serogrup. Aquest nou microarray presenta certs avantatges respecte altres mètodes de serotipat: disminueix el treball i temps de processar grans volums de mostres i la lectura automatitzada de resultats disminueix el percentatge d'error respecte altres sistemes manuals.

Una altra tècnica per a determinar el serotip és el CST, de l'anglès *Capsular Sequence Typing*, que consisteix en genotipar el locus capsular per tal de determinar el serotip (Elberse et al. 2011b). Aquesta tècnica està basada en una part de la seqüència del gen *wzh* del locus capsular. Es va escollir aquest gen per a ser seqüenciat, ja que varia bastant entre diferents serotips, però es conserva suficientment per amplificar el mateix fragment del gen de varis serotips en una mateixa reacció de PCR. Després de seqüenciar un fragment de 506pb del gen *wzh*, s'assigna un tipus capsular o CT (de l'anglès, *capsular type*). El CT és un assignació composta, la primera part de l'assignació es basa en el fenotip avaluat per mètodes convencionals de serotipat i la segona part de l'assignació és el nombre consecutiu del tipus capsular que pertany al mateix serotip. Per exemple, CT09V-01 designaria la primera variant en la seqüència de *wzh* d'una soca de serotip 9V.

### 1.1.6 Genotipat

Fins a finals del 90, per a la caracterització molecular del pneumococ s'utilitzaven diferents procediments que incloïen repPCR (*Repetitive sequence-based PCR*), BOX-PCR, MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*) i PFGE (*Pulse-Field Gel Electrophoresis*). Un desavantatge que presentaven aquestes tècniques era la dificultat de comparar resultats entre laboratoris i per tant, la tècnica PFGE va esdevenir la tècnica més útil per a comparar resultats, amb un control molt acurat de les condicions experimentals, patrons de bandes similars es podien obtenir de les mateixes soques en diferents laboratoris. No obstant, comparar el tamany dels fragments en un gel no és ideal, en canvi, tècniques com MLST (*Multilocus Sequence Typing*) presentaven molts avantatges per als procediments de caracterització molecular (Enright et al. 1998).

Una de les eines més àmpliament utilitzades per a la caracterització genètica de *S. pneumoniae* és la tècnica MLST (Enright et al. 1998). Aquesta tècnica, basada en els principis de la tècnica MLEE, analitza els fragments interns (450 a 500pb) de 7 gens *housekeeping* que codifiquen enzims metabòlics mitjançant la seqüenciació de l'ADN (Enright et al. 1998). Per cada gen, les diferents seqüències corresponen als al·lels i els al·lels dels 7 loci donen lloc a un perfil al·lèlic, el qual defineix el *sequence-type* (ST) de cada soca. Un clon es defineix com un grup d'aïllats amb un perfil o ST idèntic. Els genotips amb perfils al·lèlics que només difereixen en 1 o 2 al·lels dels 7 al·lels dels locus s'anomenen single-locus variant (SLV) i doble locus variant (DLV) respectivament (Enright et al. 1999). Els SLV i DLV estan suficientment relacionats per ser considerats membres d'un clúster de genotips estretament relacionats. Aquest

conjunt s'anomena complex clonal (Enright et al. 1999). L'anàlisi dels ST i dels complexos clonals s'analitzen utilitzant el programa eBURST.

Recentment, s'ha desenvolupat una altra eina per al genotipat de *S. pneumoniae*, la tècnica del MLVA (*Multi-Locus Variable number of tandem repeat Analysis*). Aquest mètode es basa en la variació natural en el nombre de seqüències d'ADN repetides en tàndem que té lloc en molts llocs diferents en el genoma d'una varietat d'organismes (Elberse et al. 2011a). En la tècnica del MLVA per al genotipat de *S. pneumoniae* s'estudien 8 locus VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*). Els 8 locus s'amplifiquen en dues reaccions de PCR multiplex i posteriorment, es fa un anàlisi de fragments dels productes amplificats marcats amb fluorescència. Els resultats obtinguts amb aquesta tècnica es poden comparar a nivell internacional a la base de dades disponible on-line [www.mlva.net](http://www.mlva.net). A la pàgina web es poden importar els diferents perfils MLVA per avaluar el tipus MLVA (MT, de l'anglès *MLVA type*).

### 1.1.7 Resistència a antibiòtics

Tot i la disponibilitat de tractament antibiòtic, no s'ha aconseguit eradicar la infecció produïda pel pneumococ. Clàssicament, s'utilitzava penicil·lina per al tractament de les infeccions pneumocòcciques fins que al 1967 es va descriure el primer cas de resistència a penicil·lina (Gunnison et al. 1968). Durant els anys 70 es van detectar pneumococs no-sensibles a penicil·lina (PNSP) en algunes àrees geogràfiques localitzades (Espanya, Austràlia, Sud Àfrica) que ràpidament es van disseminar arreu del món. En algunes regions com Espanya, Àsia o França la taxa de PNSP era superior al 50% mentre que en altres àrees geogràfiques com Finlàndia, Suècia o Alemanya la taxa era inferior al 5% (Lynch et al. 2009b).

La resistència antimicrobiana s'identifica mesurant la concentració mínima inhibidora (CMI) d'un antimicrobià determinat. Els punts de tall de la CMI defineixen les soques com a sensibles, intermèdies o resistents davant l'antimicrobià utilitzat.

El *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), actualment *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) va crear un subcomitè per estandarditzar les proves de sensibilitat als antimicrobians (Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing). El seu objectiu era unificar els criteris metodològics per realitzar aquestes proves, amb la finalitat d'establir les correlacions entre els resultats obtinguts al laboratori i en la clínica. El CLSI descriu els punts de tall en termes de CMI per *S. pneumoniae* per a diferents antimicrobians.

En referència a la penicil·lina, tradicionalment, els punts de tall establerts NCCLS definien: sensible (S)  $\leq 0.06 \mu\text{g/mL}$ ; resistència intermèdia (I) 0.12 a  $1.0 \mu\text{g/mL}$ ; resistent (R)  $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ . La designació “*S. pneumoniae* no-sensible a penicil·lina” incloïa les soques amb resistència intermèdia i resistents. A l’any 2008 es van presentar els nous punts de tall del CLSI. A la taula 1 es mostren els punts de tall de la penicil·lina establerts internacionalment a través del CLSI (CLSI, 2011).

	Sensible (S)	Resistència intermèdia (I)	Resistent (R)
Penicil·lina oral; no meníngia	$\leq 0.06 \mu\text{g/mL}$	0.12 -1.0 $\mu\text{g/mL}$	$\geq 2 \mu\text{g/mL}$
Penicil·lina parenteral; meníngia	$\leq 0.06 \mu\text{g/mL}$		$\geq 0.12 \mu\text{g/mL}$
Penicil·lina parenteral; no meníngia	$\leq 2 \mu\text{g/mL}$	4 $\mu\text{g/mL}$	$\geq 8 \mu\text{g/mL}$

Taula 1. Sensibilitat de *Streptococcus pneumoniae* a la penicil·lina (Font: CLSI, 2011).

El grup d’antibiòtics més utilitzat en pediatria per al tractament del pneumococ és el dels beta-lactàmics (amoxicil·lina, cefotaxima i ceftriaxona) seguit dels macròlids. El mecanisme de resistència de *S. pneumoniae* a beta-lactàmics ve determinat, per la reestructuració dels receptors de les proteïnes que s’uneixen a la penicil·lina (PBP, de l’anglès *penicillin-binding proteins*). En funció del tipus de reestructuració i el nombre de receptors afectats es determina el nivell de resistència (Lynch P et al. 2009b). Els punts de tall no meningis per la cefotaxima i la ceftriaxona són:  $\leq 1 \mu\text{g/mL}$  (S);  $2 \mu\text{g/mL}$  (I);  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ , R. En referència als punts de tall meningis, CMI  $\geq 0.5 \mu\text{g/mL}$  es consideren resistents.

La resistència als macròlids com l’eritromicina, la claritromicina o l’azitromicina va augmentar paral·lelament amb la penicil·lina. A més a més, la resistència a macròlids es pot desenvolupar independent de la resistència a penicil·lina. En moltes parts del món, els pneumococs resistents a macròlids són més freqüents que els PNSP (Conly et al. 2002; Jenkins et al. 2008). La resistència a macròlids ve determinada per mecanismes diferents als beta-lactàmics, es relaciona amb alteracions moleculars en el gen *erm(B)*. Mutacions en el gen *erm(B)* s’associen a CMI per l’eritromicina  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ .

En referència a la resistència associada a les fluoroquinolones (ciprofloxacina, levofloxacina) també ha augmentat com a conseqüència d’un increment de l’ús d’aquest tipus d’antibiòtics. La resistència a fluoroquinolones és poc freqüent en els nens, d’acord amb un estudi realitzat per Canut et al. (Canut et al. 2007) en els adults

amb malaltia pulmonar obstructiva crònica les fluoroquinolones (ciprofloxacina, levofloxacina i moxifloxacina) són els antibiòtics més apropiats per al tractament respecte altres antibiòtics àmpliament utilitzats com la claritromicina o azitromicina.

Es defineix com a una soca multiresistent aquella que presenta resistència a tres o més classes d'antibiòtics. L'augment global de la resistència antibiòtica és degut, en part, a un mal ús dels antibiòtics que ha derivat en la disseminació d'uns clons internacionals (pandèmics). La xarxa *Pneumococcal Molecular Epidemiology Network* (PMEN) classifica els clons internacionals d'acord amb el país on s'ha identificat la soca per primera vegada, el serotip del clon inicial i el número de clon designat per la xarxa (per exemple, Spain9V-3) (McGee et al. 2001). La prevalença de clons específics és variable entre regions i ha anat variant al llarg del temps (Gheradi et al. 2007; Pérez-Trallero et al. 2003).

En un estudi realitzat a Estats Units per Richter et al. (Richter et al. 2009) a partir de 1647 soques de *S. pneumoniae*, mostraven un increment de la prevalença de les soques amb resistència intermèdia a penicil·lina d'acord amb els punts de tall meningis, del 12.7% al 17.9% durant els períodes 1999-2000 i 2004-2005, respectivament. Durant els mateixos períodes de temps, la prevalença de les soques resistents a penicil·lina va disminuir del 21.5% al 14.6% i la prevalença de soques resistents a eritromicina va augmentar del 25.7% al 29.1%. Els autors d'aquest estudi (Richter et al. 2009) destacaven un augment de la prevalença de 2 clons PMEN, des del període 1999-2000 al 2004-2005, el clon Taiwan19F-14 (increment del 14.6% al 36.7%) i el clon Utah35B-24 (increment del 0.9 al 16.3%).

Amb els nous punts de tall proposats pel CLSI, es va detectar una disminució de la resistència a penicil·lina. A Espanya, recentment, Pérez-Trallero et al. (Pérez-Trallero et al. 2010), van publicar els resultats d'un estudi sobre la resistència a antibiòtics de diferents patògens respiratoris realitzat durant 11 anys (1996-1997 fins 2006-2007). En aquest estudi, es mostrava que durant el període d'estudi, en el cas de *S. pneumoniae*, s'havia produït una disminució de la prevalença de les soques de pneumococ resistents a penicil·lina oral i parenteral, només 0.9% i 0.2% de les soques tenien una CMI  $\geq 2 \mu\text{g/mL}$  i  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ , respectivament. En el cas de l'eritromicina, la disminució de les resistències no era significativa. Aquests resultats concorden amb l'estudi realitzat per Fenoll et al. (Fenoll et al. 2009) sobre els patrons de resistència antibiòtica a Espanya durant un període de 30 anys.

## 1.2 Vigilància epidemiològica

La MPI causada per *S. pneumoniae* segueix sent una causa important de morbi-mortalitat a nivell mundial tot i la disponibilitat de tractament antibiòtic i vacunes. La OMS estima que cada any moren al voltant d'un milió de nens menors de 5 anys per malaltia pneumocòccica, la majoria d'ells en països en vies de desenvolupament (O'Brien et al. 2009).

Segons dades publicades per la OMS (O'Brien et al. 2009), l'estimació global de la càrrega de la malaltia causada per *Streptococcus pneumoniae* en nens menors de 5 anys era de 14,5 milions d'episodis de MPI a l'any 2000 en tot el món, d'aquests, s'estima que 826.000 nens van morir com a conseqüència de malaltia pneumocòccica. Els 10 països amb major nombre i proporció de casos de MPI es troben a Àfrica i Àsia i corresponen al 66% de tots els casos de malaltia en tot el món (Índia 27%, Xina 12%, Nigèria 5%, Pakistan 5%, Bangladesh 4%, Indonèsia 3%, Etiòpia 3%, Kenya 2%, Congo 3% i Filipines 2%) i al 61% del total de morts produïdes per *S. pneumoniae*.

### 1.2.1 Vigilància epidemiològica de la malaltia en els països en vies de desenvolupament

A l'Àfrica sub-sahariana les malalties causades per *S. pneumoniae* i *Haemophilus influenzae tipus b* (Hib) són causes importants de morbi-mortalitat en nens. Anualment, causen més de 500.000 morts col·lectivament en aquest país. Segons dades de l'Aliança Global per a la Immunització i la Vacunació (GAVI, de l'anglès *Global Alliance for Vaccines and Immunization*) durant el període 2000-2010 s'han evitat 560.000 morts amb la introducció de la vacuna conjugada contra Hib en els països en vies de desenvolupament, gràcies al suport de la GAVI. La vacuna conjugada contra Hib es va introduir a l'any 2001 en els països de l'Àfrica de l'Est, Kenya i Uganda.

En relació a la vacuna conjugada antipneumocòccica 7-valent, tot i estar disponible a Estats Units i a altres països des de l'any 2000, no va ser fins a l'any 2007 que es va decidir introduir en els programes nacionals d'immunització dels països amb major taxa de mortalitat infantil. L'Aliança GAVI s'ha compromès a donar suport a la introducció de la vacuna antipneumocòccica en 37 països en vies de desenvolupament i es calcula que a l'any 2015 ja seran 60 els països que disposaran d'aquesta vacuna en els seus programes d'immunització.

Per altra banda, la mortalitat associada a la MPI és elevada, tot i que varia molt segons la presentació clínica de la malaltia, sent en la meningitis la més alta.



Aproximadament 1.5 milions de morts ocorren cada any en nens menors de 5 anys com a conseqüència de infecció pneumocòccica, la majoria dels quals a l'Àfrica subsahariana. En els països en vies de desenvolupament, es coneix poca informació sobre l'epidemiologia d'aquestes malalties i és necessari tenir informació sobre la càrrega de la malaltia en una població per poder dissenyar millors estratègies de control, com la vacunació. Actualment, es disposa de poca informació sobre l'epidemiologia local de la MPI en aquests països, així com la càrrega de la malaltia i els serotips causants.

En un estudi publicat al 2006 per Roca et al. (Roca et al. 2006) sobre la incidència i les característiques epidemiològiques de la MPI en nens menors de 5 anys en una zona rural al sud de Moçambic, mostrava una taxa bruta d'incidència estimada de 416/100.000 per nen i any en risc. El grup amb major incidència de la malaltia eren els nens menors de 3 mesos i la manifestació clínica més comuna va ser la pneumònia, en 146 del 212 (68.8%) episodis de MPI diagnosticats.

Arifeen et al. (Arifeen et al. 2009) van publicar un estudi sobre la malaltia invasiva en nens d'una zona rural de Bangladesh des del 2004 al 2007. En aquest estudi es van incloure 22.378 nens, dels quals, 2.596 van requerir ingrés hospitalari i d'aquests, el 40% tenien pneumònia. Els serotips més prevalents eren els serotips 1, 5, 14, 18C, 19A i 38.

Resultats similars es van observar en un altre estudi sobre la incidència de MPI al Nepal (Williams et al. 2009) realitzat en nens amb febre i sospita de pneumònia, meningitis o bacterièmia, es mostrava que del total de pacients estudiats (885 nens menors de 5 anys), 56% tenien pneumònia i 9% meningitis. En aquests estudi, només es van poder aïllar 17 soques, i els principals serotips eren el 1 i el 12F.

En un altre estudi realitzat per Falade et al. (Falade et al. 2009), sobre MPI en nens menors de 5 anys a Nigèria on s'inclouïen 1210 casos, es van aïllar 23 soques de *S. pneumoniae*, de les quals, 11 van ser serotipades. Els resultats mostraven que la vacuna conjugada heptavalent cobria el 55% dels serotips identificats, ja que es els serotips detectats eren: serotips 5 (5 soques), serotip 19F (3 soques), serotip 4 (3 soques) i una soca no es va poder tipar.

Aquests estudis realitzats es basen en el cultiu i tal i com s'ha desenvolupat en l'apartat 1.1.4 sobre el diagnòstic, el cultiu bacterià, tot i ser una tècnica molt específica, té una baixa sensibilitat. A més a més, el procediment clàssic d'identificació dels serotips requereix personal especialitzat i una estructura determinada per realitzar-lo i afegir-hi l'elevat cost econòmic. En els països en vies de

desenvolupament no es disposa d'infraestructures adequades per poder realitzar aquests estudis, això fa que s'hagin d'enviar les mostres a centres internacionals de referència. L'enviament de les mostres requereix un procediment de conservació de les mostres per tal d'assegurar-se que arriben al laboratori de destí en bones condicions per tal de poder realitzar els estudis corresponents. En els països en vies de desenvolupament, les elevades temperatures, per exemple, poden esdevenir un problema en la conservació de les mostres. Siberry et al. (Siberry et al. 2001) van avaluar diferents mètodes, de baix cost, per a la conservació a llarg termini de *Streptococcus pneumoniae* en els tròpics, comparant diferents medis de cultiu i temperatures d'emmagatzematge. Els mètodes moleculars actuals requereixen l'enviament de mostres les mostres refrigerades, de manera que s'encareix el cost de l'enviament. És necessari desenvolupar nous sistemes d'enviament de mostres com ara mostres impregnades en paper de filtre (*dried-spot*). El sistema de les mostres de sang seca en paper de filtre, *Dried-Blood Spot* (DBS), és un mètode alternatiu per a recollir mostres de sang. El DBS consisteix en aplicar de 2 a 4 gotes (50µl) de sang (o un altre fluid) en unes targetes de paper de filtre (tipus Whatmann®). La mostra queda impregnada en el paper de filtre, es pot conservar a temperatura ambient i permet enviar la mostra sense requeriments especials de conservació. Aquest tipus de mostres utilitzades per al cribatge metabòlic neonatal han permès desenvolupar tècniques moleculars com el cribatge neonatal de la infecció congènita per citomegalovirus (Boppana et al. 2010). A més a més, s'han realitzat estudis per al diagnòstic del virus de l'hepatitis C (VHC) i el virus de la immunodeficiència humana tipus 1 (VIH-1) (De Crignis et al. 2010) a partir de mostres de DBS mostrant una elevada sensibilitat i especificitat de la tècnica.

### 1.3 La vacunació antipneumocòccica

Tal i com s'ha descrit, actualment, es coneixen 93 serotips diferents del pneumococ. Una vacuna que inclogués tots els serotips seria molt difícil d'obtenir per problemes tècnics, per tant, les vacunes que s'han desenvolupat estan formades per subgrups de serotips prevalents a la comunitat i causants de malaltia. El nombre de serotips inclosos a les vacunes va augmentar des de quatre a l'any 1945, fins a 14 als anys 70 i fins a 23 als anys 80.

#### 1.3.1 Vacuna antipneumocòccica polisacàrida 23-valent

La vacuna antipneumocòccica polisacàrida 23-valent (PPV-23), composta de polisacàrids purificats derivats de la superfície cel·lular de la càpsula del bacteri es va introduir a l'any 1983. La vacuna era una barreja dels polisacàrids capsulars de 23 serotips diferents: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F. Els serotips inclosos a la vacuna eren els causants del 80% de les infeccions pneumocòcciques en el món (Sessegolo et al. 1994). La composició de la vacuna actualment disponible és la següent: Cada dosi de 0.5ml conté 25µg dels polisacàrids capsulars de 23 serotips de *S. pneumoniae*.

Aquesta vacuna no és eficaç en nens menors de 2 anys i ofereix del 60 al 80% de protecció en individus adults, tot i que és menys efectiva en pacients immunodeprimits. (Vila-Corcoles et al. 2006; Vila-Corcoles et al. 2009). En els adults immunocompetents, s'ha demostrat que manté el títol elevat durant cinc anys, però també s'ha demostrat que no és efectiva per a disminuir l'estat de portador.

Les indicacions de la vacuna PPV-23 a Estats Units segons la CDC-ACIP (*Centers for Disease Control and Prevention-Advisory Committee on Immunization Practices*) es recullen a la taula 2:

- Adults ≥65 anys
- Pacients immunocompetents amb un risc incrementat per MPI degut a malaltia crònica.
- Nens ≤2 anys amb asplènia anatòmica o funcional.
- Nens ≥2 anys que conviuen en ambients amb un risc incrementat per MPI.
- Pacients immunodeprimits ≥2 anys.

**Taula 2.** Indicacions de la vacuna antipneumocòccica polisacàrida 23-valent (*Font: CDC-ACIP*).

A Espanya, les indicacions de la PPV-23 segons la Asociación Española de Pediatría (AEP) és en nens majors de 2 anys inclosos en uns grups de risc determinats per als quals la vacuna està clarament indicada. La vacunació amb PPV-23 no està indicada per a la prevenció de la OMA recurrent. La vacuna s'administra amb una única dosis injectable.

### 1.3.2 Vacuna antipneumocòccica conjugada 7-valent

Degut a la baixa immunitat que produïa la vacuna antipneumocòccica polisacàrida 23-valents en nens menors de 2 anys (tenint en compte que el 80% de les infeccions produïdes per *S. pneumoniae* es produeixen en aquesta edat) es van desenvolupar les vacunes antipneumocòcciques conjugades (que incorporaven adjuvants) similars a les vacunes contra Hib i *Neisseria meningitidis* tipus c.

Al febrer de 2000, es va introduir a Estats Units la vacuna antipneumocòccica conjugada 7-valent (PCV7) que incloïa els serotips 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F i 23F. Aquesta vacuna conjugada, incloïa els 7 serotips causants del 80% de MPI en nens d'Amèrica del Nord en aquell moment (Hausdorff et al. 2000). En aquell mateix any, el Comitè de Malalties Infeccioses de l'Acadèmia Americana de Pediatria, juntament amb el CDC, van publicar les indicacions de la PCV7 (Taula 3).

#### **Pacients pels quals PCV7 està recomanada:**

- Nens ≤ 23 mesos
- Nens 24 a 59 mesos amb un risc incrementat de malaltia pneumocòccica
  - .....- Pacients amb anèmia falciforme (*sickle cell disease*).
  - .....- Infecció per virus immunodeficiència humana.
  - .....- Malaltia crònica (pulmonar o cardíaca).
  - .....- Diabetis mellitus.
  - .....- Pacients immunodeprimits (neoplàsies, insuficiència renal crònica o síndrome nefròtica).
  - .....- Pacients amb quimioteràpia immunosupressora, pacients trasplantats d'òrgan sòlid).

#### **Pacients pels quals PCV7 s'ha de considerar:**

- Tots els nens de 24 a 59 mesos, donant prioritat a les següents poblacions:
  - Nens entre 24 i 35 mesos.
  - Nens d'Alaska o descendents d'indis americans
  - .....- Nens amb ascendència afroamericana
    - Nens que assisteixen a guarderies
- Tots els nens ≥ 5 anys i adults amb un risc incrementat de malaltia pneumocòccica

**Taula 3.** Indicacions de la vacuna antipneumocòccica conjugada 7-valent, juny 2000 (Font: CDC-ACIP).

A l'any 2007, el grup de treball en vacunes antipneumocòcciques de l'ACIP, va revisar les dades sobre la seguretat i la immunogeneïtat de la vacuna PCV7 en nens de 24 a 59 mesos. A l'octubre del 2007, sobre les bases de la revisió realitzada, la ACIP va aprovar més recomanacions per l'ús de PCV7 en nens de 24 a 59 mesos (Taula 4).

- Per a tots els nens sans de 24 a 59 mesos que no han complert qualsevol calendari recomanat, administrar una dosi de PCV7
- Per a tots els nens de 24 a 59 mesos amb condicions subjacents que han rebut 3 dosis de PCV7, administrar una dosi de PCV7
- Per a tots els nens de 24 a 59 mesos amb condicions subjacents que han rebut menys de 3 dosis de PCV7, administrar dues dosis de PCV7 (interval mínim 8 setmanes)

**Taula 4.** Indicacions de la vacuna antipneumocòccica conjugada 7-valent proposades per la CDC-ACIP, octubre 2007 (*Font:* CDC-ACIP).

A Espanya la PCV7 es va introduir al juny del 2001 però no estava inclosa en el calendari vacunal infantil sistemàtic, excepte a la Comunitat de Madrid que la va incloure al 2006, per tant, s'administrava de forma gratuïta.

Des d'un principi, la vacuna s'ha demostrat altament eficaç en reduir l'estat de portador pels serotips inclosos a la vacuna (Millar et al. 2008), el què faria pensar en una disminució de la circulació del microorganisme i com a conseqüència una disminució de les taxes de malaltia invasiva.

A Espanya, el Comité Asesor de Vacunas de la AEP va recomanar la inclusió de la PCV7 en el calendari sistemàtic de vacunes a partir de l'any 2003. La pauta general de vacunació de la PCV7 es resumeix a la taula 5.

Tot i que la AEP recomanava la vacunació, l'elevat cost de la vacuna, ha fet que la implementació de la vacuna a Espanya no assolís les mateixes taxes de vacunació que a altres països, com Estats Units, on la vacuna està coberta pel Sistema Nacional de Salut. Tot i així, en la nostra àrea geogràfica, durant el període 2007-2009, es va arribar a una cobertura del 50% segons un estudi publicat pel nostre grup (Dominguez et al. 2011).

Edat de la primera dosi	Sèrie primària	Booster
2-6 mesos	3 dosis separades de 2 mesos*	1 dosi als 12-15 mesos**
7-11 mesos	2 dosis separades de 2 mesos*	1 dosi als 12-15 mesos**
12-23 mesos	2 dosis separades de 2 mesos***	
24-59 mesos (sans)	1 dosi	
24-59 mesos (de risc)	2 dosis separades de 2 mesos***	

\*Interval mínim de 4 setmanes

\*\*Interval mínim de 8 setmanes després de la primovacunació

\*\*\*Interval mínim de 8 setmanes

**Taula 5.** Pauta general de vacunació amb PCV7 (Font: Comité Asesor de Vacunas de la Asociación Española de Pediatría).

### 1.3.3 Vacuna antipneumocòccica conjugada 10-valent

A principis de l'any 2009, la vacuna antipneumocòccica 10-valent (PCV10) conjugada amb la proteïna D d'*Haemophilus influenzae* no tipable (NTHi) (PHiD-CV), es va autoritzar en més de 40 països incloent-hi Europa, per a la prevenció de la malaltia pneumocòccica invasiva i de la otitis mitja en lactants i nens petits. Aquesta vacuna conté els polisacàrids de pneumococs del serotip 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F i 23F. A més a més, la proteïna D, és una proteïna altament conservada de la superfície de *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) que es va seleccionar pel seu potencial d'oferir protecció contra les soques no-encapsulades d'*H. influenzae* (Dagan et al. 2009).

Els serotips inclosos a la PCV7 eren els responsables del 80% dels casos de MPI en tot el món, mentre que els tres serotips addicionals corresponien a serotips molt invasius i amb una elevada prevalença, associats directament amb brots i malaltia greu en nens petits (Hausdorff et al. 2000; 2007).

El perfil de immunogeneïtat, seguretat i reactogeneïtat és comparable amb la PCV7 (Chevallier et al. 2009) i la compatibilitat amb altres vacunes anteriors s'ha demostrat en estudis de co-administració.

Aquesta nova vacuna també ofereix protecció contra la OMA. *S. pneumoniae* i NTHi són els principals responsables del 70% de tots els episodis clínics de OMA a nivell mundial. Es calcula que gairebé el 75% del nens menors de 3 anys han patit algun episodi de OMA i més d'una tercera part, experimentant infeccions recurrents.

### 1.3.4 Vacuna antipneumocòccica conjugada 13-valent

Al febrer del 2010, la Food and Drug Administration (FDA) va autoritzar la comercialització de la vacuna antipneumocòccica conjugada 13-valent (PCV13). PCV13 conté els polisacàrids dels antigens capsulars dels serotips de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F i 23F, conjugats amb una proteïna transportadora, la CRM197. Un volum de 0.5mL de PCV13 contenen 2 $\mu$  de cadascun dels 12 serotips i aproximadament 4 $\mu$  del serotip 6B; la concentració de CRM197 és aproximadament de 34 $\mu$ g.

Ofereix major cobertura de serotips del pneumococ enfront a malaltia invasiva, pneumònia i otitis mitja en lactants i nens d'entre 6 setmanes fins a 71 mesos. Els lactants i nens que hagin començat la vacunació amb PCV7 poden canviar a PCV13 en qualsevol moment de l'esquema vacunal.

L'autorització de la vacuna PCV13 s'ha basat en els resultats de 13 estudis clínics en fase 3, realitzats amb més de 4729 nens als quals se'ls va administrar com a mínim una dosi de PCV13 i 2760 nens als quals se'ls va administrar com a mínim una dosi de PCV7. Les dades obtingudes avalen la potencial efectivitat d'aquesta vacuna per prevenir la malaltia pneumocòccica i una bona tolerabilitat en lactants i nens petits (Bryant et al. 2009; Dinleyici et al. 2009).

La CDC-ACIP recomana vacunar amb la vacuna PCV13 tots els nens de 2 a 59 mesos. També recomana vacunar tots aquells nens de 60 a 71 mesos amb un risc incrementat per MPI (pacients immunocompetents amb un risc incrementat de MPI degut a malaltia crònica, pacients amb asplènia anatòmica o funcional, pacients immunodeprimits). A la taula 6 es mostra la pauta de vacunació recomanada per la CDC.

Edat de la primera dosi	Sèrie primària*	Booster**
2-6 mesos	3 dosis	1 dosi als 12-15 mesos
7-11 mesos	2 dosis	1 dosi als 12-15 mesos
12-23 mesos	2 dosis	
24-59 mesos (sans)	1 dosi	
24-59 mesos (de risc)	2 dosis	

\*Interval mínim entre dosis de 8 setmanes, excepte en nens vacunats <12 mesos que es de 4 setmanes. Edat mínima per administrar la primera dosi és 6 setmanes.

\*\*Interval mínim de 8 setmanes després de la primovacunació

**Taula 6.** Pauta general de la PCV13 en nens que no han rebut immunització prèvia amb PCV7 o en els que, per edat, reben la primera dosi de PCV13 (Font: ACIP, Estats Units, 2010).

A la taula 7 es mostren les recomanacions pels nens que havien iniciat la immunització amb la vacuna PCV7 que finalitzin la sèrie amb PCV13.

Series			Booster	Dosi complementaria PCV13
2 mesos	4 mesos	6 mesos	≥12 mesos	14-59 mesos
PCV7	PCV13	PCV13	PCV13	-
PCV7	PCV7	PCV13	PCV13	-
PCV7	PCV7	PCV7	PCV13	-
PCV7	PCV7	PCV7	PCV7	PCV13

**Taula 7.** Calendari recomanat de transacció de la vacunació amb PCV7 a PCV13 en nens que han iniciat la immunització amb la vacuna PCV7 (Font: ACIP, Estats Units, 2010).

### 1.3.5 Vacunes proteiques

Des de fa uns anys, s'ha demostrat la importància de les proteïnes de *S. pneumoniae*, principalment, les proteïnes de superfície, en la virulència del patogen. En aquest camp, la recerca ha portat a testar algunes d'aquestes proteïnes com a candidates per al desenvolupament de vacunes (Barocchi et al. 2007). S'ha demostrat que, a més a més del polisacàrid capsular, les proteïnes de superfície participen en diversos estadis del procés de colonització i/o transició a malaltia. En la revisió realitzada per Barocchi et al. (Barocchi et al. 2007) els autors pretenien proporcionar al lector una comprensió de la complexitat capsular de *S. pneumoniae* en el marc del desenvolupament de les vacunes actuals. En aquesta revisió es discutia la necessitat de desenvolupar una nova vacuna obtinguda d'antigens proteics de la càpsula descoberts *in silico*, així com la identificació dels antigens de superfície immunogènica i avaluació de la seva eficàcia, imprescindibles per al desenvolupament de vacunes amb capacitat de protegir contra la malaltia invasiva independentment del serotip. L'avantatge d'aquestes vacunes és que tindrien un menor cost i un major potencial de cobertura, en comparació amb el cost i la cobertura de les vacunes conjugades existents.

En fer una cerca de bibliografia sobre vacunes proteiques i *S. pneumoniae*, els resultats són escassos, pel fet, que els estudis actuals es centren en experimentar sobre el paper d'aquestes proteïnes en el procés de virulència. Recentment, en un estudi publicat per Frolet et al. (Frolet et al. 2010) es mostrava el resultat d'estudiar les interaccions de 19 proteïnes del pneumococ, que ha portat al descobriment de 20 interaccions noves amb les proteïnes de l'hoste. Estudis com aquest, obren una ruta per a fer un estudi en profunditat sobre el paper que tenen aquestes proteïnes en el procés de virulència.



## 1.4 Impacte global de la vacuna conjugada, reemplaçament de serotips i protecció indirecta.

Des de la introducció de la vacuna PCV7, la incidència de MPI (meningitis pneumocòccica, pneumònia i bacterièmies) i de colonització nasofàrinx per serotips vacunals ha disminuït en tots els grups d'edats, incloent pacients immunodeprimits i gent gran (Park et al. 2010). Per tant, la PCV7 ha esdevingut beneficiosa en aquells individus vacunats (protecció directa) però també s'ha observat un efecte protector en individus que no havien rebut la vacuna (protecció indirecta). La disminució en els adults ha esdevingut molt considerable i és degut a l'efecte de la protecció indirecta que ofereix la vacuna (referit erròniament com a "*herd-immunity*"), a nens més grans, adults o gent gran que conviuen amb nens petits vacunats (Millar et al. 2008). Isaacmann et al. (Isaacman et al. 2007) en un article sobre els efectes indirectes associats a la vacunació amb la PCV7, parlava del fenomen de *herd protection* o *community immunity*. Isaacman et al. (Isaacman et al. 2007) feia referència al fet de que els efectes en una comunitat tenen lloc quan la presència d'individus vacunats fa disminuir tan la taxa de colonització com la d'infecció en la població general. Els individus vacunats tenen protecció davant la colonització, deixen de ser portadors i deixen de disseminar agents infecciosos des d'individus colonitzats a individus no colonitzats de la població.

Els estudis realitzats demostren que la vacuna PCV7 és altament eficaç en la prevenció de la malaltia produïda pels serotips inclosos, però hi ha molts altres serotips que causen malaltia greu en nens (Weatherholtz et al. 2010), d'altra banda, s'ha observat un increment de malaltia pneumocòccica produïda per serotips no vacunals (reemplaçament de serotips).

El reemplaçament de serotips es produeix perquè la vacuna conjugada és eficaç en l'eradicació de soques de pneumococ colonitzants a la nasofaringe, que expressen serotips inclosos a la vacuna. Si desapareixen els serotips vacunals del nínxol ecològic de la nasofaringe humana, la resta de serotips, adquireixen un avantatge ecològic i, com a conseqüència, augmenta la seva prevalença com a colonitzants podent causar, en una segona etapa, malaltia (O'Brien et al. 2003; Frazão et al. 2010). Un estudi realitzat per Frazão et al. (Frazão et al. 2010) sobre l'impacte d'una única dosi de PCV7 en la colonització mostrava que, abans d'administrar la vacuna, el 60% dels serotips corresponien a serotips vacunals (SV) (6B, 14, 19F i 23F), mentre que un mes més tard i després d'administrar una dosi de PCV7, la freqüència dels SV havia

disminuït del 60 al 39%, però la freqüència dels serotips no vacunals (SNV) havia augmentat significativament del 40 al 61%.

#### 1.4.1 Epidemiologia de la malaltia en els Estats Units. Canvis en la malaltia després de la introducció de la vacuna.

Abans de la introducció de la vacuna PCV7 a finals del 2000, en els Estats Units, es produïen anualment 65.000 casos de MPI. Els nens menors de 5 anys corresponien al 25% dels episodis de MPI, i el 80% de malaltia en aquest grup d'edat era causada pels set serotips inclosos a la vacuna.

La taxa de vacunació va augmentar del 9% al 2000 al 93% en aquells nens nascuts al 2006. Ràpidament, es va detectar una reducció dràstica de la incidència de la MPI tant en nens com a adults (Whitney et al. 2003; Tsigrelis et al. 2009).

En un estudi realitzat per Pilishvili et al. (Pilishvili et al. 2010) es mostrava com la incidència de MPI al 2007 era 45% menor per tots els grups d'edat i un 76% menor en els nens menors de 5 anys, en comparació amb l'era prevacunat. Després de la dràstica reducció de la incidència de la malaltia, durant el període 2002-2007 es va mantenir estable (Figura 6). La incidència de la MPI en nens menors de 5 anys va disminuir fins a <1 cas per 100.000 persones.

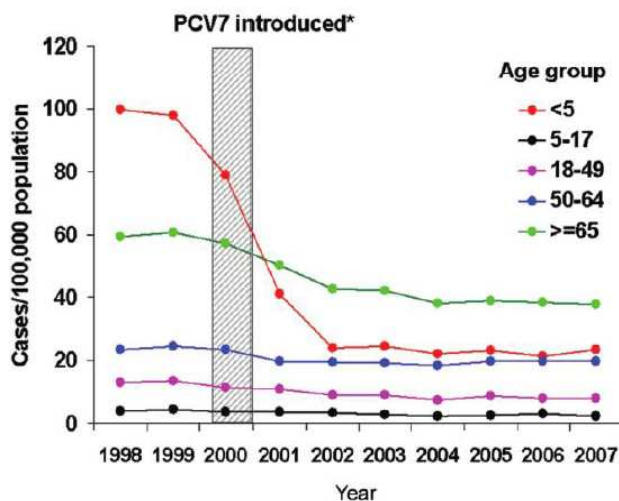


Figura 6. Canvis en la incidència (casos/100000 habitants) MPI per grups d'edat durant el període 1998-2007 en els Estats Units (Font: Pilishvili et al. 2010).

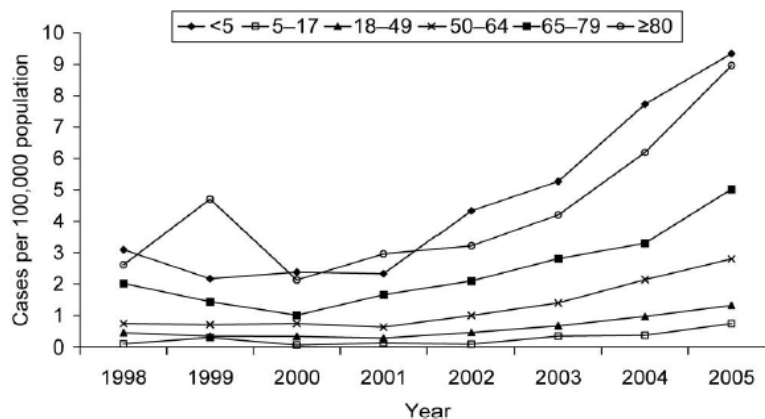
Whitney et al. (Whitney et al. 2003) en un article publicat a l'any 2003 mostrava una disminució de la taxa de malaltia d'una mitjana de 24,3 casos/100.000 persones durant els anys 1998-1999 a una mitja de 17.3 casos/100.000 persones a l'any 2001.

Abans de l'ús de PCV7, la taxa de MPI era 5-24 vegades superior en els Indis Americans i els nadius d'Alaska en comparació amb altres poblacions dels Estats Units

(Singleton et al. 2007; Weatherholtz et al. 2010). Singleton et al. (Singleton et al. 2007), en un estudi realitzat amb nens nadius d'Alaska, va observar des del 2004 un augment del 140% de la taxa de MPI causada per serotips no vacunals en comparació amb el període prevacunal. No obstant, durant aquest mateix període, es va observar una disminució del 96% de la taxa de MPI causada pels serotips inclosos a la vacuna. Altres articles han confirmat que s'ha detectat un augment de la taxa de MPI causada per serotips no vacunals des de la introducció de la PCV7. Un altre estudi realitzat per Weatherholtz et al. (Weatherholtz et al. 2010) sobre la malaltia invasiva una dècada després de la introducció de PCV7 en una població d'indis Americans (Navajo) es mostrava com la taxa de MPI causada per serotips vacunals en nens de <1 any, de 1 a <2 anys i de 2 a <5 anys havia disminuït de 210, 263 i 51 casos per 100.000 persones durant el període 1995-1997 a 0 casos en el període 2004-2006. En aquest estudi, no es va detectar un augment general de la MPI causada per serotips no vacunals, sinó que es detecta un augment en alguns serotips en concret (1, 3, 7F i 19A).

Als Estats Units, la incidència del serotip 19A ha augmentat després de la introducció de la PCV7. Tot i que el serotip 19A és un membre del mateix serogrup que el serotip vacunal 19F, no s'observa protecció creuada envers el serotip 19A.

Segons Moore et al. (Moore et al. 2008) la incidència de la MPI per serotip 19A va incrementar de 0.8 a 2.5 casos per 100.000 persones entre el 1998 i el 2005 (Figura 7), seguit d'un increment de la incidència de MPI del 6.7% al 35% degut a soques del serotip 19A resistents a penicil·lina; moltes d'aquestes soques eren multiresistents, la majoria pertanyien al complex clonal 320 relacionat amb el clon multiresistent Taiwan19F-14.

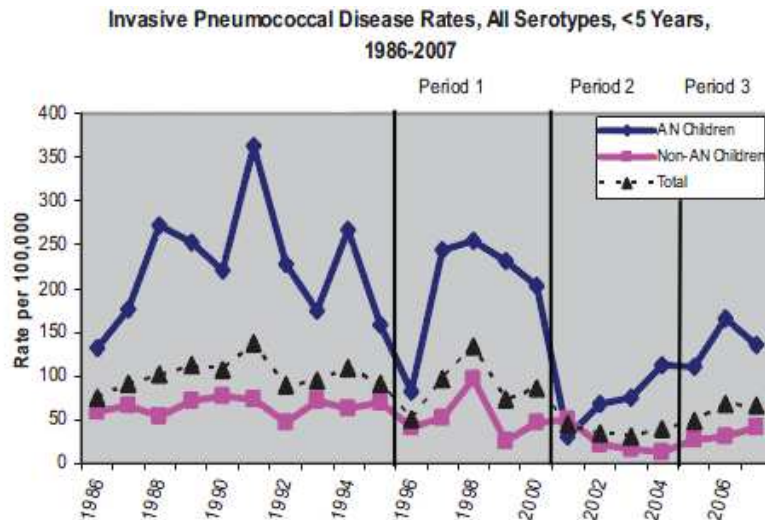


**Figura 7.** Incidència de la malaltia pneumocòccica invasiva causada pel serotip 19A a Estats Units durant el període 1998-2005 (Font: Moore et al. 2008).

En un estudi realitzat en una població de nens d'Alaska (Wenger et al. 2010), la introducció de la vacuna PCV7 va resultar en l'eliminació de la MPI causada per serotips vacunals, però seguida de l'augment de la MPI causada per serotips no vacunals (Figura 8). Durant el primer període d'estudi (1996-2000) abans de la introducció de la vacuna, 11 serotips eren els causants del 92% de tots els episodis de MPI. Durant el segon període d'estudi (2001-2004), primer període d'introducció de PCV7, eren 18 serotips els principals causants de malaltia, 8 dels quals causants de MPI durant el primer període més 10 nous serotips. En el tercer període d'estudi (2005-2007), els principals serotips causants de MPI eren els serotips vacunals 19A, 6A i 7F i els 11 serotips causants de malaltia durant el primer període, corresponien al 56% del total de MPI. En aquest estudi es mostrava una disminució dels casos de MPI en tots els nens d'Alaska de 97 casos/100.000 nens/any a 41/100.000nens/any durant el període 2001-2004. Les taxes de malaltia en nens nadius d'Alaska eren de 2 a 5 vegades superiors que les taxes de malaltia en nens no nadius (Figura 9).

Serotype	Period 1: 1996-2000 Cases, (%)	Period 2: 2001-2004 Cases, (%)	Period 3: 2005- 2007 Cases, (%)
14* (PCV7)	67 (31)	7 (9)	-
6B* (PCV7)	30 (14)	4 (5)	-
19F* (PCV7)	27 (12)	2 (3)	-
18C* (PCV7)	15 (7)	2 (3)	-
9V* (PCV7)	12 (6)	1 (1)	1 (1)
23F* (PCV7)	11 (5)	3 (4)	1 (1)
19A* (PCV7)	10 (5)	18 (24)	30 (31)
4* (PCV7)	9 (4)	-	-
6A* (PCV7)	8 (4)	4 (5)	6 (6)
1* (PCV7)	7 (3)	-	-
7F* (PCV7)	5 (2)	2 (3)	20 (20)
38	†	5 (7)	1 (1)
33F	3 (1)	4 (5)	4 (4)
15C	1 (0.5)	3 (4)	1 (1)
22F	3 (1)	3 (4)	4 (4)
10A	†	3 (4)	2 (2)
15B	1 (0.5)	3 (4)	1 (1)
12F	†	2 (3)	6 (6)
3*	†	2 (3)	6 (6)
8	†	2 (3)	-
22A	1 (0.5)	2 (3)	1 (1)
23B	†	1 (1)	3 (3)
15A	1 (0.5)	-	2 (2)
16F	†	-	2 (2)
35F	1 (0.5)	-	2 (2)
9N	2 (1)	-	2 (2)
17F	§	1 (1)	1 (1)
% of IPD (top 3 serotypes)	58%	41%¶	58%¶
% of IPD (top 5 serotypes)	71%	51%¶	71%¶
% of IPD (top 10 serotypes)	92%	73%¶	86%¶
% of IPD (PCV7 serotypes)	80%	26%¶	2%¶
% of IPD (6 additional serotypes in PCV13)	13%	35%¶	65%¶
% of IPD (PCV13 serotypes)	92%	61%¶	67%¶

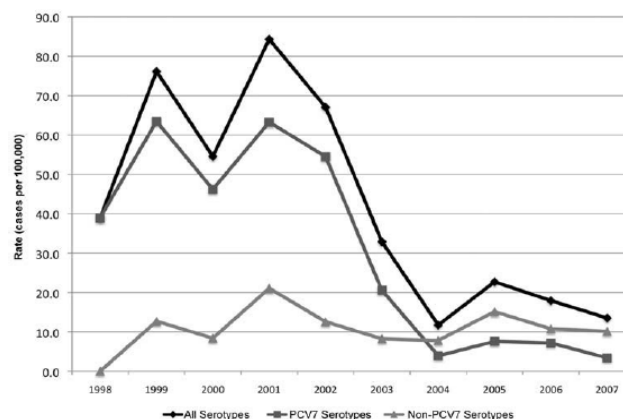
Figura 8. Principals serotips de *S. pneumoniae* causants de malaltia pneumocòccica invasiva en nens menors de 5 anys durant els diferents períodes d'estudi (Font: Wenger et al. 2010).



Nota: En el gràfic es mostra la taxa total (línia amb triangles negres), la taxa total de nens d'Alaska no nadius (línia amb requadres) i la taxa total de nens nadius d'Alaska (línia amb rombes). [Casos/ 100 000 nens/any].

**Figura 9.** Incidència de la malaltia pneumocòccica invasiva en una població de nens d'Alaska menors de 5 anys durant el període 1986-2007 (Font: Wenger et al. 2010).

En un altre estudi realitzat al Canadà (Kellner et al. 2010) sobre els canvis en l'epidemiologia de la MPI en un període de 10 anys, tant en nens com en adults, es va mostrar una disminució de la incidència de la MPI causada per serotips vacunals en tots els grups d'edat estudiats, així com el nombre total de casos. En el grup d'edat de 0 a 23 mesos, durant els 10 anys d'estudi (Figura 10) es va observar que comparant l'any 2007 *versus* el període 1998-2001 es produïa, en general, una disminució del 79% de la incidència de la malaltia (serotips vacunals i no vacunals), una disminució del 94% de la incidència de la malaltia causada per serotips vacunals i alhora, un augment del 139% de la incidència de la malaltia produïda per serotips vacunals.



Nota: En el gràfic es mostra tots incidència de tots els serotips (línia amb rombes), dels serotips vacunals (línia amb requadres) i la dels serotips no vacunals (línia amb triangles).

**Figura 10.** Incidència de la MPI a Calgary, Atlanta, Canadà en el grup d'edat de 0 a 23 mesos durant el període 1998-2007 (Font: Kellner et al. 2010).

### **1.4.2 Epidemiologia de la malaltia a Europa. Canvis en la malaltia després de la introducció de la vacuna.**

Estudis similars s'han realitzat en molts altres països i també a Europa. Entre els països europeus, destaquen Alemanya (Rückinger et al. 2009), el Regne Unit (Trotter et al. 2010), Noruega (Vestheim et al. 2010) i Espanya (Muñoz-Almagro et al. 2008).

Recentment, Isaacmann et al (Isaacmann et al. 2010) han publicat un article de revisió sobre la càrrega de la MPI i la distribució de serotips a Europa. Aquest article realitzat a partir d'una cerca bibliogràfica a bases de dades com MEDLINE i EMBASE amb les paraules: invasive pneumococcal disease, serotypes, *Streptococcus pneumoniae*, pneumococcus, pneumococcal, and pneumococcal conjugate vaccine, tracta sobre l'epidemiologia i els serotips causants de MPI en nens durant el període 1990 – 2008. Aquest estudi reporta dades sobre la càrrega de la MPI i l'impacte de la vacuna PCV7 que han posat de manifest el paper important que ha jugat la PCV7 en la prevenció de la MPI a Europa. Inclou, també, dades sobre la mortalitat, les tendències generals de la resistència a antibiòtics, les principals poblacions de risc i els efectes indirectes de l'ús de la vacuna conjugada. Els resultats d'aquest estudi conclouien que (1) la major incidència de la malaltia es trobava en els nens menors de 2 anys, (2) en els països en que s'administrava la PCV7 rutinàriament, la proporció de serotips vacunals causants de MPI era menor en l'era prevacunal, (3) s'havia produït un augment de la incidència dels serotips 1, 19A, 3, 6A/C i 7F, pel que destaca la necessitat d'incloure aquests serotips en futures vacunes.

A Europa, la incidència general de la MPI s'estima de 31.1 casos per 100.000 persones amb un rang de 3.1 casos per 100.000 a Portugal fins a 110 casos per 100.000 persones a Espanya, sent el grup de nens <2 anys el grup amb major incidència de malaltia.

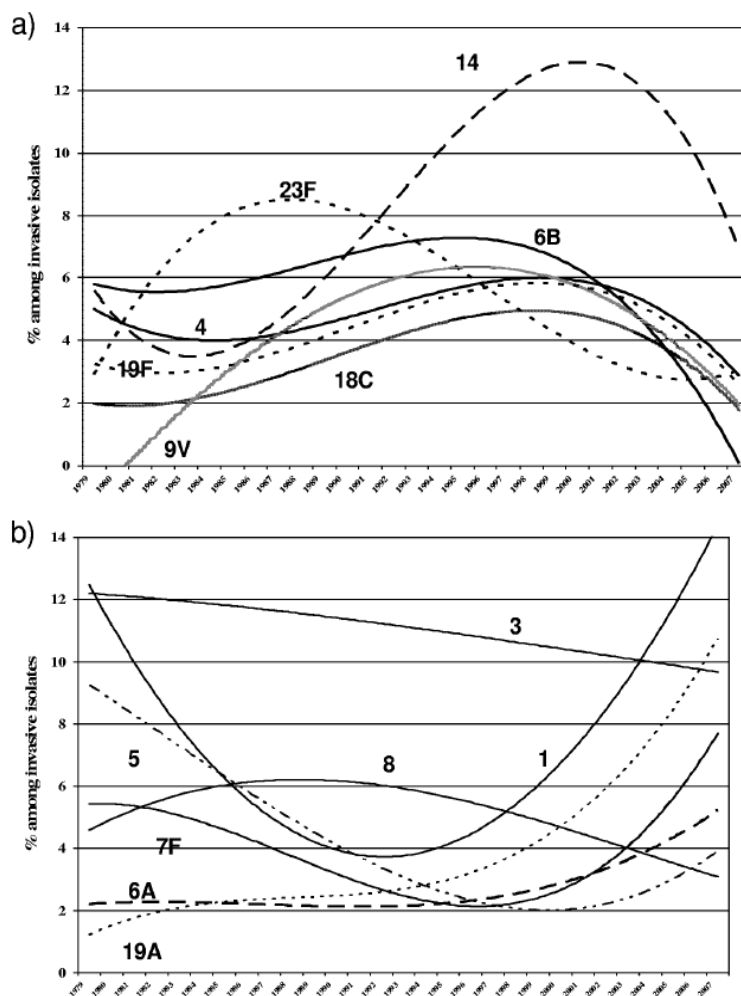
#### **1.4.2.1 Epidemiologia de la infecció a Espanya**

A Espanya, durant el període 1996-2006, la incidència de la malaltia a causa de serotips vacunals va disminuir, mentre que es va detectar un augment dels serotips no vacunals (principalment, el serotip 1 i el serotip 19A) (Fenoll et al. 2009). L'increment de serotips inclosos a PCV7 que havia augmentat durant els anys 80 i 90, va disminuir després de la introducció de la PCV7. Canvis en els serotips causants de MPI reflecteixen els patrons de l'ús d'antibiòtics (Fenoll et al. 2009).

En un estudi realitzat per Fenoll et al. (Fenoll et al. 2009) a partir de soques invasives de 190 hospitals espanyols durant un període de 30 anys remeses al Centro de

Referència de Neumococos (Centro Nacional de Microbiologia, Instituto de Salud Carlos III) per a l'estudi del serotip i la sensibilitat antibiòtica, es mostren les tendències temporals dels serotips durant el període d'estudi (Figura 11).

La figura 11 mostra les tendències temporals dels serotips inclosos a PCV7 i dels principals serotips no inclosos durant un període de 30 anys. En referència als serotips vacunals (Figura 11A), en general, s'observava una lleugera disminució a partir de la introducció de la vacuna a Espanya al juny del 2001, a excepció, del serotip 23F. Pel contrari, en el cas dels serotips vacunals, s'observava un augment, a excepció dels serotips 3 i 8, que s'observava una lleugera disminució. En aquesta figura es pot observar com els serotips 4, 3 i 8 s'han mantingut d'una forma més o menys estable al llarg dels anys.



**Figura 11.** Tendències temporals (A) dels serotips inclosos a la vacuna conjugada 7-valent (PCV7) i (B) dels serotips no inclosos a PCV7 (Font: Fenoll et al. 2009).

En referència a la població pediàtrica espanyola i en diferents comunitats autònomes, segons dades d'un estudi realitzat al País Basc i Navarra (Aristegui et al. 2007), es mostrava una reducció de la incidència de la MPI després de la introducció de la vacuna PCV7. En aquest estudi, es demostrava com després de 2 anys d'introduir la vacuna, la incidència de la MPI havia disminuït un 64.3%, 39.7% i 37.5% en nens menors de 12, 24 i 60 mesos, respectivament.

A Catalunya, també es va detectar un canvi en els serotips causants de MPI en nens menors de 2 anys després de la introducció de la PCV7 (Salleras et al. 2009). En un estudi realitzat a 22 hospitals de Catalunya, les dades mostraven que entre 1997-99 i 2005-07, la proporció de serotips vacunals causants de MPI a Catalunya va disminuir de 70.54% al 31.67%. La proporció de serotips relacionats, principalment, el serotip 19A va augmentar de 9.82% al 32.50% i la proporció de serotips no vacunals i no relacionats del 19.64% al 35.83%.

Un altre estudi sobre la MPI en nens realitzat a l'Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona, el nostre grup (Muñoz-Almagro et al. 2008) va reportar una emergència de la MPI causada per serotips no vacunals després de la introducció de PCV7 (Figura 12). Comparant el període prevacunal (1997-2001) amb el període vacunal (2002-2006) entre els nens menors de 2 anys, la taxa de MPI va augmentar des de 32.4 episodis per 100.000 persones a 51.3 casos per 100.000 persones (un increment del 58%) i entre els nens de 2 a 4 anys, l'increment va ser de 11.3 episodis a 26.5 episodis per 100.000 persones (un increment del 135%). A més a més, la incidència de la pneumònia i/o empiema en nens menors de 5 anys va augmentar un 320%. Durant el període vacunal, es va produir una emergència de clons virulents relacionats amb els serotips no vacunals 1 i 5 i també es va detectar un increment de la prevalença dels serotips 19A i 6A.

En relació amb el serotip 19A, un altre estudi realitzat també pel nostre grup (Muñoz-Almagro et al. 2009) sobre l'emergència del serotip 19A, comparant els períodes prevacunals i vacunals, s'observava un increment de l'1.7% al 21.9%, respectivament, del nombre de casos deguts a serotip 19A. També, es mostrava un increment de la resistència a penicil·lina de les soques aïllades després de la introducció de PCV7. L'anàlisi clonal va demostrar que l'emergència del serotip 19A estava associada a l'emergència de clons internacionals multiresistents.

Recentment, el nostre grup ha publicat un estudi sobre els canvis en l'epidemiologia del serotip 1 en nens (Esteva et al. 2011) que mostra que comparant la proporció d'episodis causats per serotip 1 respecte el total d'episodis de MPI, hi ha hagut un



augment significatiu del serotip 1 al llarg del període d'estudi (1989-2008). Durant el període 1989-1993 un 2% dels episodis eren causats per serotip 1 mentre que en el període 1999-2003, un 23.8% del total d'episodis eren causats per aquest serotip.

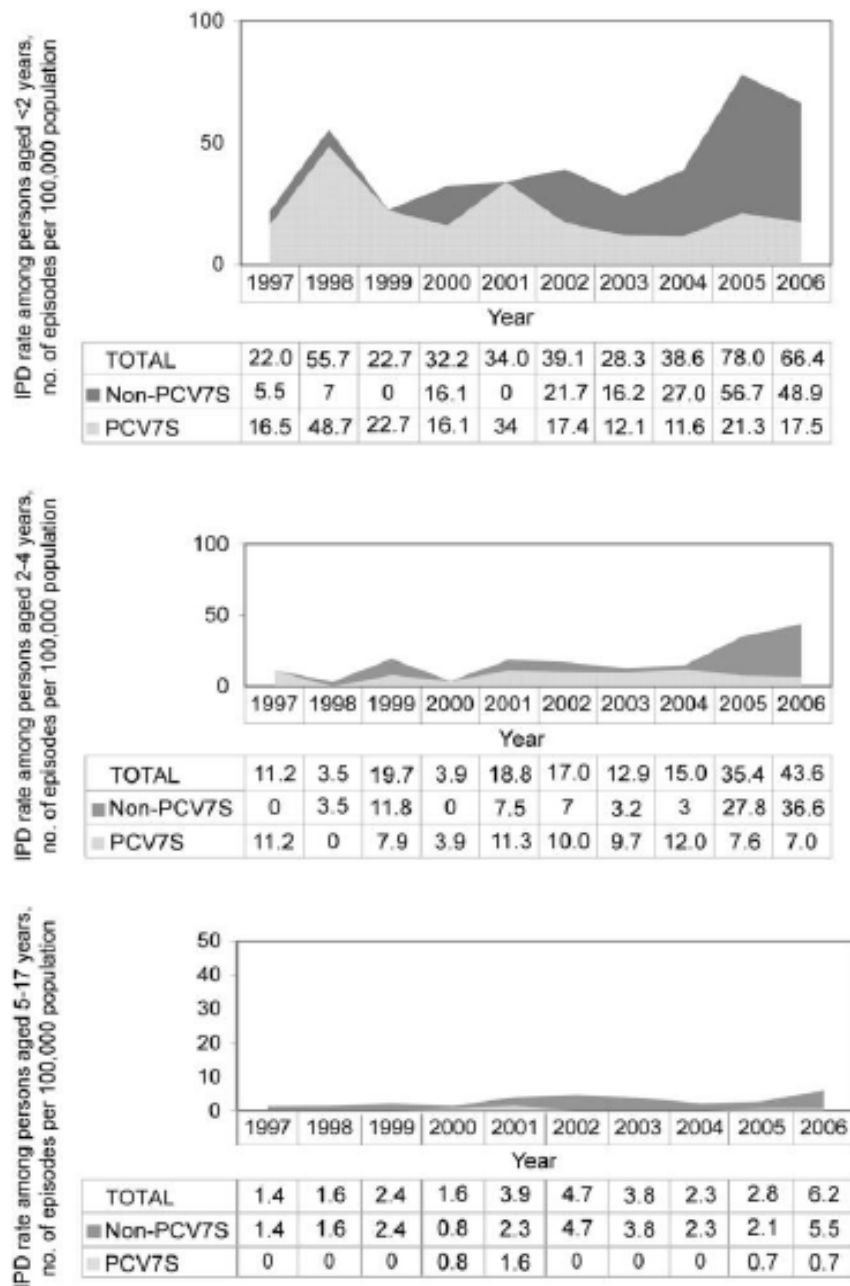


Figura 12. Taxes de malaltia pneumocòccica invasiva en nens, per grups d'edat i serotip (Font: Muñoz-Almagro et al. 2008).

# JUSTIFICACIÓ I HIPÒTESIS

La malaltia pneumocòccica és una infecció bacteriana causada per *Streptococcus pneumoniae*. La seva elevada morbi-mortalitat té un impacte en la salut mundial ja que es tracta d'una de les principals causes de mort en nens i adults en tot el món. La OMS estima que cada any moren més de 1.6 milions de persones com a conseqüència d'aquesta malaltia, d'aquestes, més de 800.000 corresponen a morts en nens menors de 5 anys. El 85% de les morts tenen lloc a l'Àfrica i el sud-est asiàtic. La pneumònia és la manifestació clínica més comú de la malaltia pneumocòccica invasiva. Tot i que la MPI provoca en nens més morts que altres malalties com la sida, la malària o el xarampió combinats, la seva importància sol ser subestimada. Part del problema és la complexitat i els costos de la infraestructura de laboratori i eines de diagnòstic necessaris per identificar l'organisme. D'aquesta manera, països en vies de desenvolupament, necessiten ajuda externa per garantir una assistència mèdica amb un mínim de qualitat.

S'han identificat 93 tipus diferents (serotips) de *Streptococcus pneumoniae* i no tots tenen la mateixa capacitat invasiva. S'ha demostrat que la incidència dels serotips responsables de malaltia invasiva poden canviar al llarg del temps i en les diferents àrees geogràfiques. Aquestes característiques s'han de considerar en les diferents estratègies de prevenció, com la implementació de vacunes.

## 2.1 Hipòtesis

Les tècniques de detecció i serotipat clàssiques no reflecteixen la distribució real dels serotips de *Streptococcus pneumoniae* causants de malaltia invasiva degut al baix rendiment de les tècniques de cultiu.

S'observa una diferència en la distribució de serotips de *Streptococcus pneumoniae* en funció de les manifestacions clíniques, l'edat o el tractament antibiòtic previ comparant els pacients confirmats per cultiu respecte els pacients diagnosticats només per les tècniques moleculars. Respecte a l'últim aspecte, les tècniques de PCR oferirien avantatges.

La conservació de mostres biològiques en paper de filtre (*dried-spot* o DS) seria un sistema molt útil per implantar estudis de vigilància epidemiològica de la malaltia pneumocòccica invasiva en països on és difícil l'accés als sistemes tradicionals de serotipat.

Degut al fenomen de reemplaçament de serotips que s'ha observat, els esforços actuals es centren en un intent d'identificar els antigens del pneumococ que podrien ser utilitzats en una nova generació de vacunes proteiques amb cobertura per tots els serotips. Es creu que serien necessaris varis antigens pel fet de que no tots els determinants d'una proteïna es conserven o es troben en totes les soques de pneumococ. Amb aquesta finalitat, el coneixement de la prevalença real d'una proteïna considerant a més a més la seva distribució en els diferents clons i serotips de *Streptococcus pneumoniae* és necessari per considerar qualsevol proteïna com a candidat d'una nova vacuna.

# OBJECTIUS

## 3.1 Estudi 1

### Objectiu 1:

- 1.1. Comparar la utilitat de la PCR respecte el cultiu en el diagnòstic de la MPI.
- 1.2. Determinar la distribució de serotips de *Streptococcus pneumoniae* causants de malaltia invasiva incloent pacients amb cultiu negatiu diagnosticats per PCR en temps real en pacients atesos a dos centres pediàtrics de Barcelona.

### Objectius secundaris:

- 1.3. Comparar la distribució de serotips de *Streptococcus pneumoniae* d'acord amb les manifestacions clíniques i característiques epidemiològiques en pacients amb cultiu positiu respecte aquells diagnosticats només per PCR.

## 3.2 Estudi 2

### Objectiu 2:

- 2.1. Desenvolupar una tècnica de serotipat en mostra directa, conservada a temperatura ambient i en suport paper de filtre.

### Objectiu secundari:

- 2.2. Conèixer la distribució de serotips en una població de pacients pediàtrics atesos en un hospital en Sierra Leone a través del serotipat en mostra directa, conservada a temperatura ambient i en suport paper de filtre.

### 3.3 Estudi 3

#### Objectiu 3:

- 3.1. Conèixer la prevalença de la proteïna PsrP (*Pneumococcal serine-rich protein*), candidata, per una vacuna proteica, en una col·lecció de soques invasives pediàtriques i en soques aïllades de portadors nasofaringis sans.

#### Objectiu secundari:

- 3.2. Determinar la distribució serotípica i clonal de PsrP en els aïllats de la col·lecció.

# MATERIAL I MÈTODES

## 4.1 Estudi 1 (Objectiu 1)

### 4.1.1 Àmbit d'estudi

L'Hospital Sant Joan de Déu d'Esplugues, Barcelona, és un hospital capdavanter i de referència per a l'assistència pediàtrica i obstètrico-ginecològica, universitari i d'alta tecnologia i especialització. Forma part de l'Ordre Hospitalari de Sant Joan de Déu, que està present a 50 països dels 5 continents. L'Hospital Universitari Sant Joan de Déu disposa de 362 llits i 12 quiròfans, registra més de 25.000 altes cada any, rep més de 200.000 visites per consultes externes i atén a 115.000 urgències. Neixen més de 4.000 nens cada any i es fan 14.000 intervencions quirúrgiques.

L'Àrea Maternoinfantil de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron està integrada dins del gran complex de centres hospitalaris que formen l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, juntament amb l'Àrea General, l'Àrea de Traumatologia i Rehabilitació i l'Àrea de Cirurgia sense ingrés. L'Àrea Maternoinfantil és un centre líder en el camp de l'atenció pediàtrica, obstètrica i ginecològica, amb més de 1600 professionals al servei de les mares i dels nens. Actualment, l'Àrea Maternoinfantil disposa de 215 llits i 6 quiròfans, al 2009, va registrar 11.502 admissions.

#### 4.1.2 Pacients i període d'estudi

Pacients menors de 5 anys amb MPI atesos a l'Hospital Universitari Sant Joan de Déu i l'Hospital Universitari Vall d'Hebron (Àrea Maternoinfantil) en el període de temps comprès entre gener de 2007 i desembre de 2009.

#### 4.1.3 Dades epidemiològiques i clíniques

Per cada cas es va dissenyar un full de recollida de dades en forma de fitxa epidemiològica amb les següents variables:

- Dades d'identificació: Número d'identificació hospitalària, hospital d'admissió, municipi de residència.
- Dades clíniques: Data d'hospitalització, data d'alta, evolució, diagnòstic clínic i presència de factors de risc segons l'Acadèmia Americana de Pediatria (*American Academy of Pediatrics; AAP*): malaltia cardíaca crònica, malaltia pulmonar crònica, immunodepressió (nourat, tractament amb immunosupressors o immunodeficiències congènites o adquirides), asplènia, fístula de líquid cefaloraquidi, diabetis *mellitus*, malaltia neurològica crònica.
- Dades epidemiològiques d'interès: Edat, sexe, tractament antibiòtic previ durant el mes anterior a l'inici de la malaltia, antecedent de vacunació antipneumocòccica conjugada 7-valent (nombre de dosis, data d'administració).

#### 4.1.4 Conservació i preparació de les mostres

##### 4.1.4.1 Estudi a partir de mostra directa

Les mostres fresques de sang (plasma), líquid cefaloraquidi, líquid pleural o altres es van conservar congelades a  $-70^{\circ}\text{C}$  fins al moment de ser processades (Veure Procediment 1).

##### 4.1.4.2 Estudi a partir de soques

Les colònies de pneumococ crescudes en plaques de cultiu es van resuspendre en 300µl de tampó fosfat salí (PBS, de l'anglès *phosphate buffered saline*) estèril, es va homogeneïtzar la mostra mitjançant el vòrtex. Les mostres biològiques es van

conservar al congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$  fins al moment de ser processades (Veure Procediment 1).

#### **4.1.5 Extracció de l'ADN**

L'extracció de l'ADN de les soques conservades en PBS es va realitzar utilitzant la resina Chelex-100 al 20% w/v (BioRad® Laboratories, Hercules, CA) (Veure Procediment 2).

Per a l'extracció l'ADN de les mostres directes (plasma, líquid pleural, etc) es va utilitzar el sistema d'extracció automàtica amb el robot NucliSENS®easyMag® (bioMérieux, Boxtel, The Netherlands) d'acord amb els instruccions del fabricant. Un volum de 200µl de mostra es van eluir en un volum final de 110µl (Veure Procediment 2).



## 4.2 Estudi 2 (Objectiu 2)

### 4.2.1 Àmbit d'estudi

L'Hospital Saint John of God de Mabesseneh, Lunsar, Sierra Leone és un hospital rural amb serveis de pediatria, medicina interna, ginecologia-obstetrícia i cirurgia. El servei de pediatria de l'Hospital de Saint John of God rep actualment la demanda assistencial d'una població infantil aproximada de 40.700 nens menors de 15 anys. El servei de pediatria consta d'una consulta externa, urgències 24 hores i 36 llits d'hospitalització. L'Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona va començar al juny del 2005 un programa de cooperació amb l'Hospital Saint John of God de Mabesseneh. El programa es va crear amb l'objectiu de desenvolupar globalment l'hospital de Lunsar, centrant-se inicialment en l'ajuda en l'assistència pediàtrica i la formació del personal local d'aquesta àrea.

### 4.2.2 Pacients i període d'estudi

#### 4.2.2.1 Objectiu 2.1. Soques control i validació de la tècnica

Mostres corresponents a una col·lecció de soques invasives de *S. pneumoniae* aïllades en pacients amb MPI disponible al Departament de Microbiologia Molecular de l'Hospital Sant Joan de Déu.

#### 4.2.2.2 Objectiu 2.2. Aplicació de la tècnica per al diagnòstic i serotipat de la MPI

Dades corresponents a pacients menors de 10 anys amb febre sense focus i sospita de MPI reclutats a l'hospital Saint John of God, Lunsar, Sierra Leone durant el període de temps comprès entre gener i desembre de 2009.

### 4.2.3 Dades epidemiològiques i clíniques

Per cada cas es va dissenyar un full de recollida de dades en forma de fitxa epidemiològica amb les següents variables:

- Dades d'identificació: Codi d'identificació, data d'extracció i tipus de mostra.
- Dades demogràfiques: Registre d'identificació hospitalària, municipi.

- Dades epidemiològiques: Sexe, data de naixement o edat, tractament antibiòtic previ durant els tres mesos anteriors, factors de risc (infecció amb el virus de la immunodeficiència humana, malària).
- Dades clíniques: Diagnòstic clínic, ingrés hospitalari, evolució.

#### 4.2.4 Conservació i preparació de les mostres

##### 4.2.4.1 Objectiu 2.1: Preparació de les soques control

Es van seleccionar 15 soques representatives de 15 serotips diferents (1, 5, 19A, 19F, 14, 3, 7F, 4, 6A, 6B, 8, 9N, 18C, 23A, 23F) de la col·lecció de soques de *S. pneumoniae* del departament de microbiologia molecular de l'Hospital Sant Joan de Déu. Les soques disponibles estaven serotipades mitjançant una PCR en temps real (realitzada en el nostre laboratori) i confirmades mitjançant la reacció de Quellung i/o dot-blot (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid).

Les soques es van conservar congelades a  $-70^{\circ}\text{C}$  en un medi de llet (*skim milk*). Les soques utilitzades com a control es van cultivar en plaques de cultiu en una atmosfera al 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^{\circ}\text{C}$  durant tota la nit. Es va realitzar una suspensió de cadascuna de les soques amb sèrum salí i es va ajustar la terbolesa al patró número 0.5 de l'escala McFarland. L'escala McFarland és una escala numerada de l'1 al 10 la qual representa una concentració específica de bacteris per ml. El número 0.5, correspon a  $10^8$  Unitats Formadores de Colònies (UFC) per ml (UFC/ml). Per assegurar-se de la densitat d'una suspensió que correspon a un estàndard de l'escala McFarland es pot comprovar amb un espectrofotòmetre. Per cada estàndard 0.5 de l'escala McFarland, l'absorbància a una longitud d'ona de 625nm ha d'estar entre 0.08 i 0.1.

Es va llegir l'absorbància de cadascuna de les suspensions ajustades a l'estàndard 0.5 de l'escala McFarland amb un espectrofotòmetre (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) a 600nm. Es va comprovar que totes les lectures d'absorbància a 600nm es trobessin entre 0.08 i 0.1.

Es van fer dilucions decimals de les suspensions de cadascuna de les soques i es van inocular en sang humana procedent d'un individu voluntari d'acord amb el procediment detallat a la taula 8.

Dilució	Procediment	Concentració en sang (UFC/ml)	Concentració a l'extracte ADN (UFC/ml)	Concentració a l'extracte ADN (UFC/ $\mu$ l)	Concentració a la reacció de PCR (UFC equivalents / reacció de PCR)
A	50 $\mu$ l solució stock + 0.450 $\mu$ l sang	$1.5 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	200	1000
B	50 $\mu$ l dilució A + 0.450 $\mu$ l sang	$1.5 \times 10^4$	$2 \times 10^4$	20	100
C	50 $\mu$ l dilució B + 0.450 $\mu$ l sang	$1.5 \times 10^3$	$2 \times 10^3$	2	10

Taula 8. Procediment utilitzat per a la preparació de les soques control

Cent microlitres de la mostra homogeneïtzada es van inocular a 2 dels *spots* de paper de filtre. Les mostres es van conservar a temperatura ambient durant una setmana. A continuació es mostra un esquema del procediment (Figura 13).

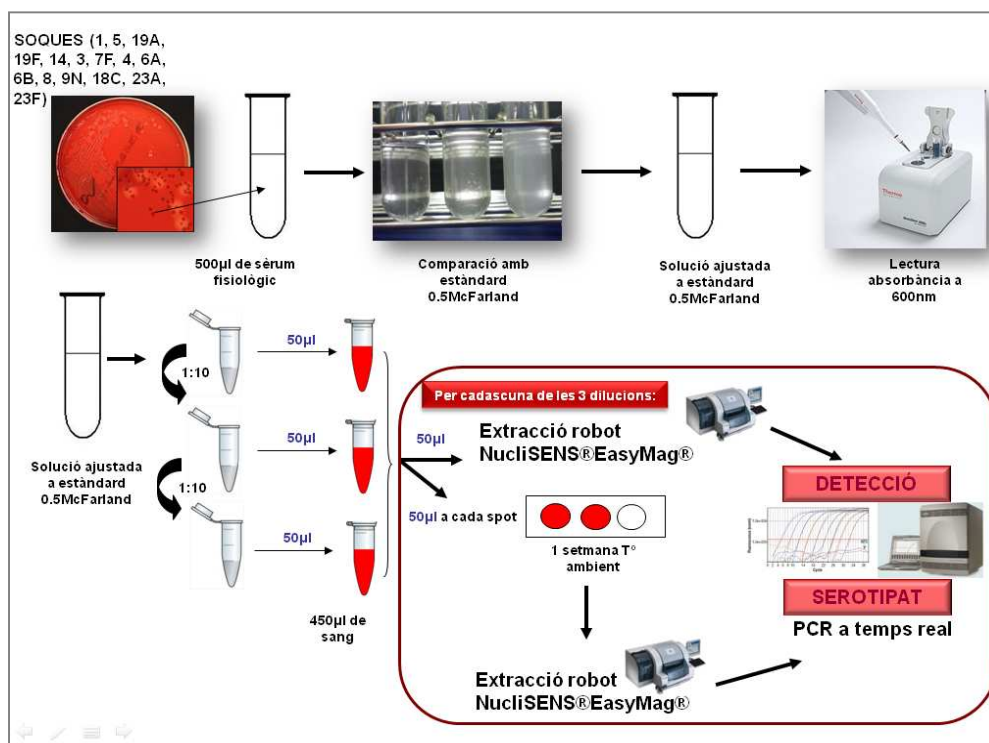


Figura 13. Esquema del procediment utilitzat per a la validació de la tècnica a partir de les soques de *Streptococcus pneumoniae* utilitzades com a control.

#### **4.2.4.2 Objectiu 2.2. Aplicació de la tècnica**

En els papers de filtre (*dried-spot*) es van inocular 150 µl de sang de pacients amb sospita de MPI atesos a l'Hospital Saint John of God, Lunsar. Les mostres es van enviar des de l'Hospital Saint John of God a l'Hospital Sant Joan de Déu i es van conservar a temperatura ambient fins al moment de ser processades (Veure Procediment 1).

#### **4.2.5 Extracció de l'ADN**

##### **4.2.5.1 Objectiu 2.1. Extracció de l'ADN de les soques de *S. pneumoniae* inoculades en sang (mostra en fresc).**

Per a l'extracció de l'ADN de les soques inoculades en sang i utilitzades com a controls es va utilitzar el sistema d'extracció automàtica amb el robot NucliSENS®easyMag® (bioMérieux, Boxtel, The Netherlands) d'acord amb les instruccions del fabricant. Cent microlitres de mostra es van eluir en un volum final de 50µl (Veure Procediment 2).

##### **4.2.5.2 Objectiu 2.2. Extracció de l'ADN de les soques de *S. pneumoniae* impregnades en paper de filtre (mostra *dried-blood spot*)**

Per a l'extracció de l'ADN es va utilitzar el robot NucliSENS®easyMag® (bioMérieux, Boxtel, The Netherlands) d'acord amb les instruccions del fabricant. La mostra, 2 discs de paper de filtre (*spots*) equivalent a 100 µl, es va eluir en un volum de 50µl (Veure Procediment 2).

### 4.3 Estudi 3 (Objectiu 3)

#### 4.3.1 Àmbit d'estudi

El departament de Microbiologia Molecular de l'Hospital Sant Joan de Déu s'encarrega de la vigilància molecular de la malaltia pneumocòccica invasiva a Catalunya des de l'any 2009, en col·laboració amb 30 hospitals de Catalunya que envien les soques invasives aïllades per a la caracterització del pneumococ. A Catalunya, amb una població de 7 milions de persones, aproximadament, de les quals, 1.2 milions són menors o iguals de 18 anys, aquests 30 hospitals, representen 40.5% (395.361 de 977.211) de totes els ingressos hospitalaris i, en concret, el 63% (61.575 de 98.216) dels ingressos hospitalaris pediàtrics durant l'any 2009.

#### 4.3.2 Pacients i període d'estudi

Mostres corresponents a una col·lecció de soques invasives de *S. pneumoniae* aïllades en pacients amb MPI disponible al Departament de Microbiologia Molecular de l'Hospital Sant Joan de Déu, des del gener de 2004 fins al novembre de 2009. Les soques invasives es van aïllar dels pacients ingressats a l'Hospital Sant Joan de Déu i des del 2009, dels pacients atesos en 30 hospitals de tot Catalunya.

També es van incloure mostres corresponents a una col·lecció de soques de portador de *S. pneumoniae* aïllades en pacients sans disponible al Departament de Microbiologia Molecular de l'Hospital Sant Joan de Déu, durant el període 2004-2008.

#### 4.3.3 Conservació i preparació de les mostres

Les colònies de pneumococ crescudes en plaques de cultiu es van resuspendre en 300µl de tampó fosfat salí (PBS) estèril, es va homogeneïtzar la mostra mitjançant el vòrtex. Les mostres biològiques es van conservar al congelador a -70°C fins al moment de ser processades (Veure Procediment 1).

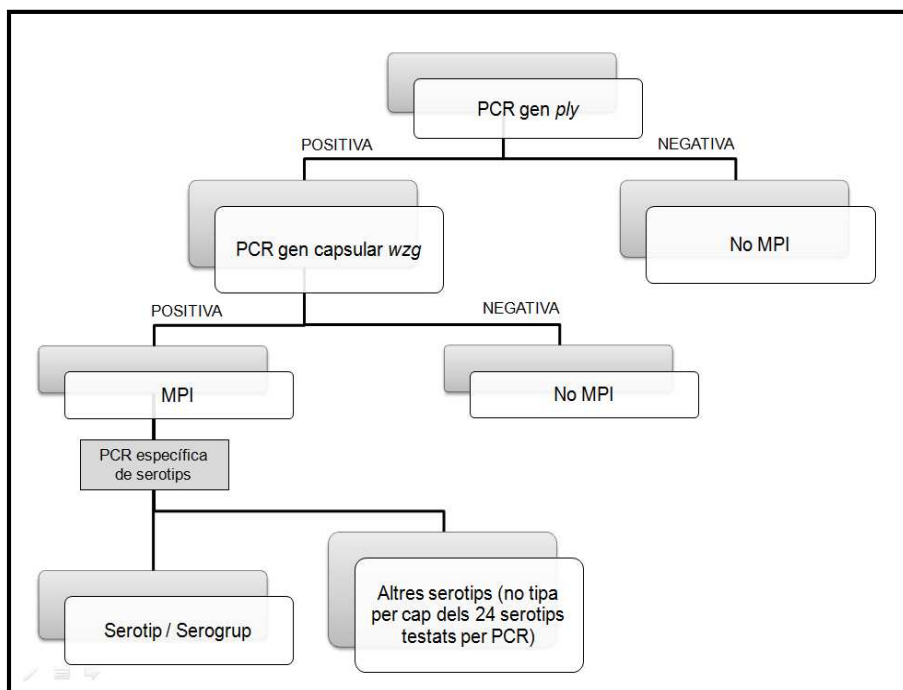
#### 4.3.4 Extracció de l'ADN

L'extracció de l'ADN de les soques en tampó fosfat salí (PBS) es va realitzar utilitzant la resina Chelex-100 al 20% w/v (BioRad® Laboratories, Hercules, CA) (Veure Procediment 2).

#### 4.4 Definició de malaltia invasiva

La malaltia pneumocòccica invasiva es defineix com la presència clínica de signes d'infecció juntament amb l'aïllament per cultiu o detecció d'ADN de dos gens diferents de *S. pneumoniae* en sang, líquid cefaloraquídi o qualsevol altre fluid estèril.

En el departament de Microbiologia Molecular de l'Hospital Universitari Sant Joan de Déu es realitza la detecció del gen de la pneumolisina (*ply*) i el gen capsular *wzg* (Figura 14). En primer lloc, es realitza una PCR per al gen de la pneumolisina (*ply*). Si el resultat de la PCR és negatiu, es descarta un cas de MPI, però si el resultat de la PCR és positiu, es confirma realitzant la PCR d'un segon gen, el gen capsular *wzg*. Si el resultat de la PCR del gen capsular *wzg* és negatiu es descarta un cas de MPI i si el resultat és positiu, es confirma el cas de MPI. En aquells casos confirmats, es realitza una PCR específica (serotips 1, 5, 19A/F/B/C, 14, 15B/C, 3, 7F/A, 4, 6A/B, 8, 9V/A/N/L, 18C/B, 23A/F), per tal de poder determinar el serotip/serogrup. La seqüència d'actuació es defineix en la figura 14.



**Figura 14.** Esquema utilitzat en el departament de Microbiologia Molecular de l'Hospital Sant Joan de Déu per a la identificació i serotipat del pneumococ mitjançant els mètodes moleculars.

## 4.5 Proves microbiològiques

### 4.5.1 Cultiu microbiològic

La identificació de *Streptococcus pneumoniae* per cultiu es va realitzar als laboratoris de microbiologia de cada hospital participant segons mètodes habituals (Veure Procediment 3):

- Sembra en plaques agar sang incubades en una atmosfera al 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C (20 a 24 hores).
- Tinció de Gram
- Sensibilitat a la optoquina
- Aglutinació en làtex

L'estudi de la sensibilitat antibiòtica i determinació de la CMI d'acord amb els punts de tall del *Clinical Laboratory Institute* (CLSI, 2010) es va realitzar al Laboratorio de Referencia de Neumococos en el Centro Nacional de Microbiologia (CNM) (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid) a totes les soques aïllades de pneumococ.

El mètode utilitzat al Laboratorio de Referencia de Neumococos per a determinar la sensibilitat antibiòtica és el mètode de dilució en agar (Fenoll A et al. 1991). Aquest mètode consisteix en incorporar l'antimicrobià que es vol avaluar en un medi amb agar. L'antimicrobià s'afegeix quan el medi està fos; el medi de cultiu utilitzat és agar Mueller-Hinton suplementat al 5% amb sang d'ovella. Per aconseguir un rang de dilucions es preparen una sèrie de plaques, cadascuna amb una concentració determinada d'antimicrobià. Quan el medi ha solidificat, les plaques s'inoculen amb els aïllats de *S. pneumoniae* amb l'ajuda d'un replicador automàtic (replicador de Steers). Els replicadors dispensen gotes (aproximadament de 5mm de diàmetre) amb un volum de 1-2µl. Les plaques inoculades es deixen a temperatura ambient fins que l'inòcul s'asseca. Les plaques s'incuben de 16-20h a 35°C fins a la lectura. La CMI és la concentració menor d'antimicrobià que inhibeix completament el creixement bacterià. Els antimicrobians testats en el CNM i el rang de dilucions són: penicil·lina (0.007-8µg), tetraciclina (0.25-128µg), cloramfenicol (0.25-64µg), eritromicina (0.015-128µg).

#### 4.5.1.1 Serotipat de referència de les soques aïllades per cultiu

El serotipat de referència de les soques aïllades per cultiu es va realitzar al Laboratorio de Referencia de Neumococos en el Centro Nacional de Microbiología (CNM) (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid) a totes les soques aïllades de pneumococ. El mètode utilitzat en el CNM és la reacció de Quellung, utilitzant l'antisèrum Omni-serum (Statens Serum Institute, Copenhagen) que identifica 91 serotips diferents del pneumococ. El mètode utilitzat consisteix en barrejar una gota de suspensió de la mostra que es vol testar (densitat 0.5 a l'escala de McFarland) amb una gota de l'antisèrum i una gota de blau de metilè a l'1%, es tapa amb un cobreobjectes i es visualitza al microscopi (x1000) com es produeix un inflament de la càpsula del pneumococ. Es produeix una reacció de Quellung quan un anticòs tipus específic s'uneix al polisacàrid capsular del pneumococ i causa un canvi en l'índex de refracció de la càpsula, les soques es tenyeixen de blau fosc amb el blau de metilè i estan envoltades per un halo finament delimitat, que representa la vora externa de la càpsula, la llum transmesa a través de la càpsula apareix més brillant que la cèl·lula pneumocòccica o el fons.

#### 4.5.2 Tècniques de microbiologia molecular: Diagnòstic i serotipat de les mostres per PCR en temps real

##### 4.5.2.1 La reacció en cadena de la polimerasa

La reacció en cadena de la polimerasa o PCR (de l'anglès, *Polymerase Chain Reaction*) és una tècnica de biologia molecular desenvolupada pel bioquímic Kary Mullis (1983) per amplificar l'ADN de forma artificial. Aquesta tècnica consisteix en la síntesi enzimàtica de seqüències d'ADN mitjançant cicles repetitius en els que es va variant la temperatura. La reacció consta de diferents etapes (Figura 15) on es produeixen canvis de temperatura anomenats cicles, cada cicle consta de les següents etapes:

1. Desnaturalització: En aquesta primera etapa, es produeix la separació de la doble cadena de l'ADN que es vol amplificar incrementant la temperatura a 94-96°C. A aquesta temperatura, l'ADN es desnaturalitza i s'obtenen dues cadenes simples.
2. Hibridació dels encebadors: A la segona etapa, es produeix la unió dels dos oligonucleòtids, anomenats encebadors (en anglès, *primers*), a l'extrem de



cada cadena simple formada, mitjançant la complementarietat de bases nitrogenades. Aquest fet s'aconsegueix baixant la temperatura a 50°C aproximadament, aquesta temperatura varia en funció de la seqüència del parell d'encebadors que s'utilitza.

3. **Elongació:** Extensió de cada cadena simple de l'ADN, afegint els nucleòtids (dNTPs) complementaris en direcció 5'→3', unint el grup 5'-fosfat dels nucleòtids amb el grup 3'-hidroxil del final de la cadena d'ADN creixent. L'enzim termostable que catalitza la incorporació dels nucleòtids és la Taq DNA polimerasa que s'obté del bacteri termòfil *Thermus aquaticus*. Aquest enzim treballa en condicions òptimes a 72°C, per tant, la tercera etapa de la reacció, la temperatura depèn de l'ADN polimerasa que es faci servir, però el rang de temperatures oscil·la entre els 70-74°C.

Després de cada cicle, l'ADN es duplica i cada còpia pot actuar com a motlle del següent cicle. L'ADN s'amplifica exponencialment al llarg dels cicles obtenint  $2^n$  còpies, on n correspon al nombre de cicles, que sol estar comprès entre 25 i 45.

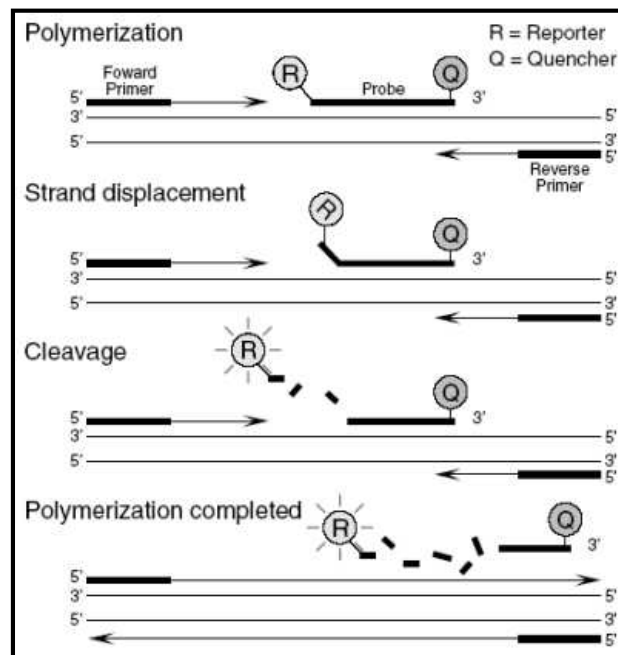


Figura 15. Esquema general de la PCR (Font: Applied Biosystems by life technologies).

Per a la reacció de PCR es necessiten els següents reactius:

- Desoxinucleòtids trifosfats o dNTP, s'utilitzen com a substrat per a la polimerització de l'ADN que es formarà.

- Dos encebadors oligonucleòtids, cadascun dels quals és complementari a una de les dues cadenes de l'ADN. Els encebadors són seqüències curtes de nucleòtids, d'uns 25 o 30 parells de bases. La polimerasa reconeix els encebadors i s'inicia la reacció. El disseny dels encebadors és un dels factors crítics que determina l'especificitat de la PCR.
- Ions divalents, com el magnesi ( $Mg^{+2}$ ), agregat comunament en forma de clorur de magnesi ( $MgCl_2$ ).
- Ions monovalents, com el potassi.
- Una solució amortidora que manté el pH adequat pel funcionament de l'ADN polimerasa.
- Taq DNA polimerasa
- ADN motlle, ADN de partida que actua com a motlle.

La reacció d'amplificació es realitza en uns tubs de PCR especialment dissenyats per a que es puguin introduir en unes cavitats d'un bloc d'alumini d'un termociclador, formats d'una paret molt fina que afavoreix una bona conductivitat tèrmica. El termociclador és l'aparell que permet escalfar i refredar els tubs de reacció per controlar al temperatura necessària a cadascuna de les etapes que conformen un cicle.

Tradicionalment, el producte amplificat per PCR s'analitza per electroforesi en gel d'agarosa. La migració el producte en el gel depèn de la mida molecular del fragment amplificat, com més gran és el fragment, menor és el seu desplaçament. El fragment es visualitza amb l'addició de bromur d'etidi que s'intercala a la doble cadena d'ADN i permet una fluorescència intensa en ser irradiat amb llum ultraviolada. La banda obtinguda en el gel es compara amb les bandes d'un marcador que conté fragments de diferents pesos moleculars coneguts. Actualment, també s'utilitza el GelRed<sup>TM</sup> per a la tinció dels àcids nucleics en substitució del bromur d'etidi en els gels d'agarosa, ja que es tracta d'un component no mutagènic ni citotòxic que és estable en el temps.

Actualment existeixen moltes variants de la PCR entre les quals hi destaquen:

- RT-PCR (de l'anglès, *Reverse Transcriptase PCR*): permet l'amplificació de RNA convertint-lo prèviament a ADN amb un enzim anomenat transcriptasa

reversa. Posteriorment, l'ADN complementari (cDNA) format s'amplifica per PCR.

- PCR multiplex: És una PCR amb la qual s'amplifica més d'una seqüència en una mateixa reacció. Es fa servir més d'un parell d'encebadors en un únic tub de reacció per produir l'amplificació de més d'un gen o fragment d'ADN d'un mateix organisme o d'organismes diferents.
- PCR *in situ*: Permet l'amplificació directa d'ADN o ARN dins de cèl·lules o teixits. La detecció del producte amplificat es realitza amb la hibridació de sondes marcades.
- PCR en temps real: Combina l'amplificació de l'ADN amb la detecció del producte amplificat al llarg dels cicles de la PCR, a temps real.

#### 4.5.2.2 PCR en temps real

En aquest apartat es descriuen les característiques de la PCR en temps real i en concret, mitjançant l'ús de sondes Taqman i sondes Taqman MGB, l'estratègia per a la detecció del producte de PCR que s'ha utilitzat en aquesta tesi doctoral.

La PCR en temps real (en anglès *real-time PCR*), també anomenada PCR quantitativa (*qPCR*, de l'anglès *quantitative-PCR*), és una tècnica d'amplificació i quantificació simultània del producte amplificat. En la PCR en temps real s'utilitzen sondes o molècules fluorescents que permeten fer el seguiment de l'amplificació del producte d'interès a cada cicle de la PCR.

L'especificitat del mètode de la PCR en temps real depèn de les substàncies utilitzades per generar i monitoritzar la reacció d'amplificació i de l'instrument utilitzat per monitoritzar la senyal. S'han desenvolupat diferents tècniques: colorants d'intercalació (bromur d'etidi, SYBR Green I) i sondes d'hibridació (sondes Taqman, sondes FRET, *molecular beacons*, sondes *Scorpions*, sondes Taqman MGB).

#### Sondes Taqman

Les tècniques basades en sondes específiques es basen en l'activitat 5'→3' exonucleasa de l'enzim Taq DNA polimerasa i l'ús d'una sonda fluorescent. La sonda és un oligonucleòtid amb un grup emissor de fluorescència (*reporter*) a l'extrem 5' i un grup amortiguador (*quencher*) a l'extrem 3', amb una seqüència específica que hibrida a la zona intermèdia entre els dos encebadors, l'encebador directe (*forward*) i l'invers

(*reverse*). Així doncs, quan la sonda està intacta, presenten una transferència energètica de fluorescència per ressonància (FRET, de l'anglès *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), el *quencher* absorbeix la fluorescència del *reporter* i no s'emet fluorescència. Aquesta FRET no es produeix quan els dos fluorocroms estan distants però quan es degrada la sonda mitjançant l'activitat 5'→3' exonucleasa de l'ADN polimerasa, el *reporter* es separa del *quencher* i s'emet radiació fluorescent. L'increment de fluorescència es registra a cada cicle d'amplificació i es relaciona directament amb l'amplificació del fragment d'interès (Figura 16).

Existeixen diferents tipus de fluoròfors *reporter* com FAM (6-carboxifluoresceïna), VIC, TET (tetracoloro-6-carboxifluoresceïna) o NED, entre altres. En referència al *quencher*, TAMRA (6-carboxi-tetrametil-rodamina) és el fluoròfor més utilitzat tot i que també s'utilitzen com a *quencher* els fluoròfors foscos (de l'anglès, *dark quencher*) que no emeten fluorescència basal, de manera que redueixen el soroll basal, com és en el cas de les sondes Taqman MGB que utilitzen NFQ o *quencher* no fluorescents (de l'anglès, *non-fluorescent quencher*).

Existeixen dos tipus de sondes Taqman:

- Sondes Taqman (amb fluoròfor TAMRA com a *quencher*)
- Sondes Taqman MGB

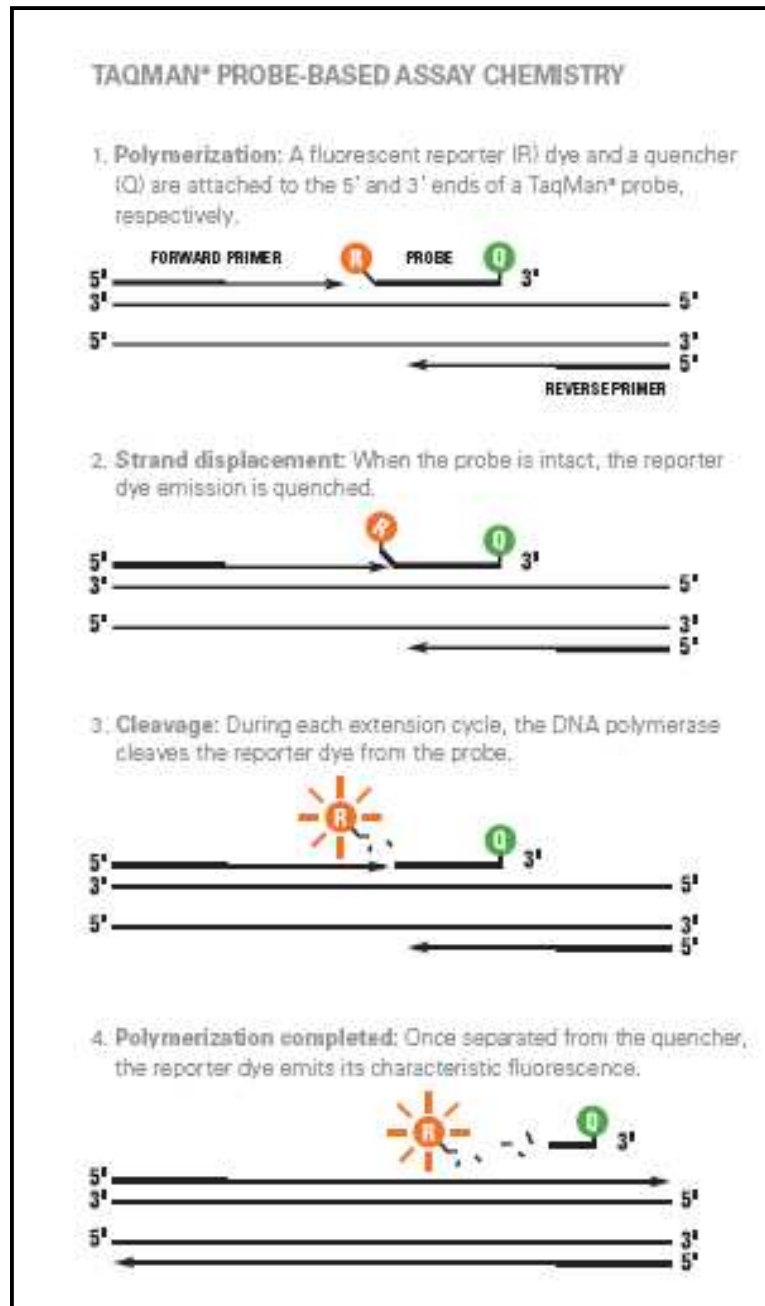
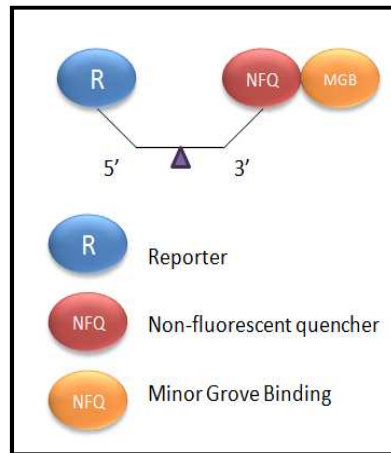


Figura 16. Esquema de la reacció de PCR amb sondes Taqman. (Font: Applied Biosystems by life technologies).

### Sondes Taqman MGB

Un MGB (de l'anglès, *Minor Groove Binder* o "enllaçant al solc menor") és una petita molècula en forma de mitja lluna que encaixa molt bé en el solc menor de l'ADN bicatenari. En les sondes Taqman, el grup MGB es troba unit a l'extrem 3' amb el *quencher* (Figura 17). Quan la sonda Taqman s'hibrida, el MGB estableix la unió

incorporant-se en el solc menor de l'ADN bicatenari creat entre la sonda específica i l'ADN diana.



**Figura 17.** Estructura d'una sonda Taqman MGB.

Les sondes Taqman MGB presenten certs avantatges en la PCR quantitativa, principalment en els assaigs múltiples. El principal avantatge és que les sondes Taqman MGB són més curtes (de 13 a 20 parells de bases) en comparació amb les sondes Taqman estàndard (de 18 a 40 parells de bases). Com que les sondes són més petites, es facilita el disseny dels assaigs, ja que les sondes es poden encaixar en regions diana més curtes. A més a més, com que incorporen un *quencher* no fluorescent, disminueixen el *background* o soroll de fons i ofereixen una major sensibilitat.

#### **4.5.2.3 Detecció de l'ADN de *Streptococcus pneumoniae* per PCR en temps real**

Per a la detecció de *S. pneumoniae* es van amplificar per PCR en temps real, en dos tubs per separat, dos gens específics de *S. pneumoniae*, el gen de la pneumolisina (*ply*) i el gen capsular *wzg*, per cadascuna de les mostres (veure Procediment 4).

##### **4.5.2.3.1 PCR en temps real del gen de la pneumolisina**

Detecció de la seqüència genètica d'una regió altament conservada del ADN del pneumococ d'un fragment del gen de la pneumolisina (*ply*) mitjançant la PCR en temps real seguint un protocol descrit prèviament (Corless et al. 2006). Els primers i sonda específica del gen de la pneumolisina utilitzats es mostren a la taula 9. Els primers i sonda són comercials i els va proveir Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA). La sonda utilitzada està marcada a l'extrem 5' amb la molècula fluorescent 6-FAM i a l'extrem 3', com a *quencher*, la molècula TAMRA (Veure Procediment 4).

Primer / Sonda	Seqüència (5'→3')
Primer <i>forward</i>	TGCAGAGCGTCCTTTGGTCTAT
Primer <i>reverse</i>	CTCTTACTCGTGGTTTCCAAGTGA
Sonda	FAM-TGGCGCCCATAAGCAACTCGAA-TAMRA

Taula 9. Primers i sonda del gen de la pneumolisina utilitzats per a la detecció del pneumococ.

#### 4.5.2.3.2 PCR en temps real del gen capsular *wzq*

Detecció de la seqüència genètica d'una regió d'un gen capsular (gen *wzq*) del pneumococ mitjançant PCR en temps real seguint un protocol descrit prèviament (Tarrago et al. 2008). Els primers i sonda específica del gen capsular *wzq* (*cpsA*) utilitzats es mostren a la taula 10 Els primers i sonda són comercials i els va proveir Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA). La sonda utilitzada és del tipus Taqman MGB, està marcada a l'extrem 5' amb la molècula fluorescent 6-FAM i a l'extrem 3' conté un *quencher* no fluorescent (NFQ) (Veure Procediment 4).

Primer / Sonda	Seqüència (5'→3')
Primer <i>forward</i>	ATCCTTGTGAGCTCTGTGTC
Primer <i>reverse</i>	TCACTTGCAACTACATGAAC
Sonda	FAM-TCTATGTTAGTGGGAATTGAC

Taula 10. Primers i sonda del gen capsular *wzq* utilitzats per a la detecció del pneumococ.

#### 4.5.2.3.3 Detecció del gen *psrP* de *Streptococcus pneumoniae* per PCR en temps real

Per a la detecció de l'adhesina PsrP (*Pneumococcal serine-rich repeat protein*) de *S. pneumoniae* es va amplificar per PCR en temps real el gen *psrP*. El gen *psrP* codifica per a la proteïna PsrP descoberta per investigadors de la nostra xarxa de treball, el Dr. Orihuela i col·laboradors de la Universitat de Texas (Obert et al. 2006).

Els primers i sonda específica del gen *psrP* utilitzats es mostren a la taula 11. Aquests primers i sonda estan dissenyats per a identificar una regió conservada en el domini de la regió bàsica de *psrP*. Els primers i sonda són comercials i els va proveir Applied Biosystems. La sonda MGB utilitzada esta marcada a l'extrem 5' amb la molècula fluorescent 6-FAM (Veure Procediment 6).

Primer / Sonda	Seqüència (5'→3')
Primer forward	CTTTACATTTACCCCTTACGCTGCTA
Primer reverse	CTGAGAGTGACTTAGACTGTGAAAGTG
Sonda	FAM-CTGGTCGTGCTAGATTC

Taula 11. Primers i sonda del gen *psrP* utilitzats per a la detecció de PsrP.

### 4.5.3 Serotipat

#### 4.5.3.1 Serotipat de les soques de *S. pneumoniae*

El serotipat de les soques aïllades per cultiu es va realitzar al Laboratorio de Referencia de Neumococos en el CNM (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid) a totes les soques aïllades de pneumococ, com s'ha explicat anteriorment en el punt 4.5.1.1.

#### 4.5.3.2 Serotipat directe per PCR multiplex en temps real

El serotipat de les mostres amb cultiu negatiu es va realitzar a l'Hospital Sant Joan de Déu mitjançant una PCR multiplex en temps real descrita prèviament (Tarrago et al. 2008). Aquesta PCR seqüencial permet diferenciar entre 24 serotips: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F/A, 8, 9 V/A/N/L, 14, 15B/C, 18C/B, 19A, 19F/B/C, 23A i 23F. A la taula 12 es mostren els gens diana i els primers i sondes Taqman utilitzades per al serotipat. Els primers i sondes són comercials i els va proveir Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA). La sondes TaqMan MGB utilitzades estaven marcades a l'extrem 5' amb la molècula fluorescent 6-FAM (6-carboxi-fluoresceïna) i VIC (Veure Procediment 5).



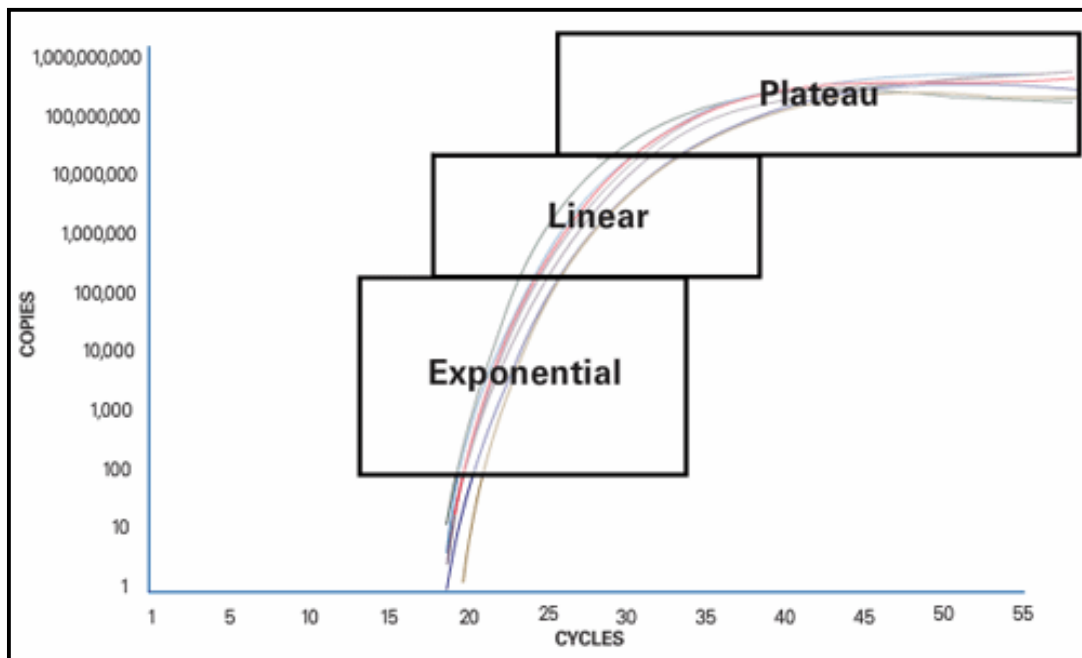
MATERIAL I MÈTODES

Serotip	Gen	Primers forward / reverse (5'→3')	Sonda TaqMan MGB
1	<i>udg</i>	TKYWGTSARGCWGTYATTGA/TCCCGTAAAAAYTCAGGACTAAASA	FAM-CAGTTATGAAATATAATCCTGATGC
5	<i>udg</i>	TKYWGTSARGCWGTYATTGA/TCCCGTAAAAAYTCAGGACTAAASA	VIC-ATTGCGGTTAATTTGAAG
3	<i>wchE</i>	GGACGCCTAGAACCTTGAGTGA/TTGTCGTTACCCACCTATTTTTT	FAM-TTGCTGAAGCCTTTTGT
4	<i>wciJ</i>	CGGCAGGCAAACCAATTAT/CATCTCGTTCGGGACTAACA	FAM-CAGGAGATGCTAAAATA
6A	<i>wciP</i>	GCTAGAGATGGTTCCTTCAGTTGAT/CATACTCTAGTGCAAACCTTTGCAAAT	FAM-CTGGCTATGATAGTT
6B	<i>wciP</i>	GCTAGAGATGGTTCCTTCAGTTGAT/CATACTCTAGTGCAAACCTTTGCAAAT	VIC-ACTGTCTCATGATAATT
7F/A	<i>wcwA</i>	AAGCACAGTGCGTGAACAAT/AAAATCTCCCTGTCCCTTCC	FAM-CTATTCCAGAAGAATCTC
8	<i>udg</i>	ACTTACCTWGCKTTGCGTGTTTCTTA/CRTASCCRAAGGAWGGATTGTT	FAM-CACGAATCGGCTCTC
9V/A/N/L	<i>udg</i>	ACTTACCTWGCKTTGCGTGTTTCTTA/CRTASCCRAAGGAWGGATTGTT	VIC-CCACGTATAGGAAATCAT
14	<i>wzy</i>	TGTAYGARGAATCYCTWAAAGCT/TGAYWCCTGCKCCAAGT	FAM-AATGGAATGGAAATGTTAC
15B/C	<i>wzy</i>	TGTAYGARGAATCYCTWAAAGCT/TGAYWCCTGCKCCAAGT	VIC-TAATGGGCTGGGAATT
19A	<i>wchO</i>	AATKCKGTRTTTATGGGRGTTGG/AGAGACGTTTAGGCTCATTWGC	FAM-ATGCAAATGCTCACCTAG
19F/B/C	<i>wchO</i>	AATKCKGTRTTTATGGGRGTTGG/AGAGACGTTTAGGCTCATTWGC	VIC-ATGCAAAGTCAAATTTAGA
18C/B	<i>gct</i>	CCCTGAAACTAGTTGGGAACA/TTCCAATCATCACCCATTACA	FAM-AAAGTCAGATGTAAAGACTAC
23F	<i>wchV</i>	CTGGGCCAAGATATTTAAAAGAGAGT/AATTYCGCATCAGAGTATGCAA	FAM-TTGCTCTTCGAAAAATGT
23A	<i>wchV</i>	CTGGGCCAAGATATTTAAAAGAGAGT/AATTYCGCATCAGAGTATGCAA	VIC-TTGCTCCTCGAAAAGTGT

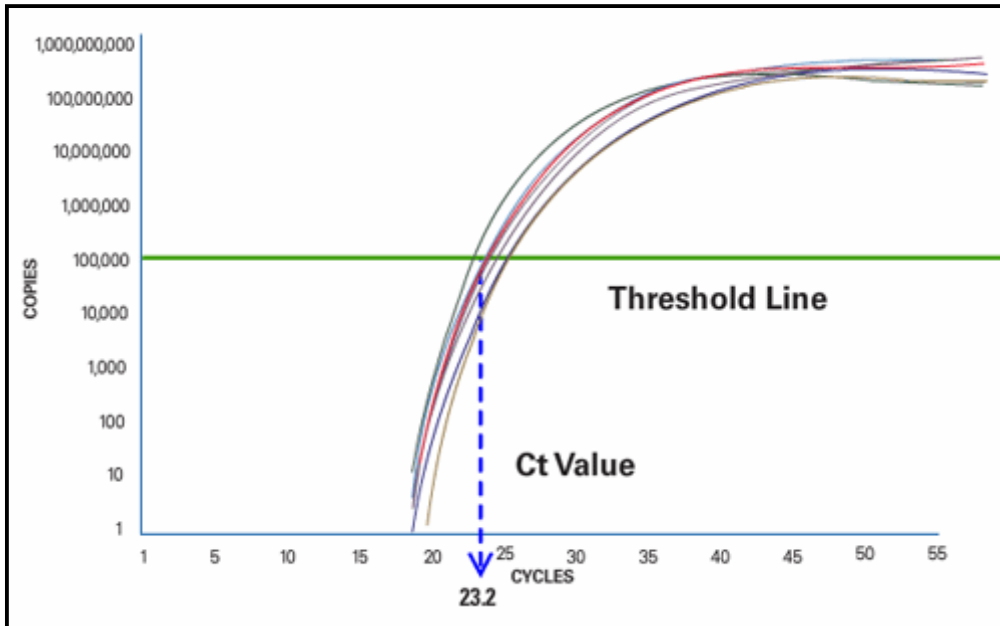
Taula 12. Serotips, gen diana, seqüències dels primers i sondes Taqman per al serotipat mitjançant la PCR en temps real (Font: Tarrago et al. 2008).

#### 4.5.4 Anàlisis i interpretació de resultats de les proves basades en la PCR en temps real.

El resultat d'una PCR en temps real es visualitza en un gràfic d'amplificació. En aquesta gràfica es mostra a l'eix de les ordenades, la fluorescència llegida pel termociclador i en l'eix de les abesses, els cicles de la PCR. D'aquesta manera, la corba d'amplificació consta d'una fase inicial on la producció de fluorescència està per sota del nivell de detecció del termociclador, una segona fase en la que es produeix un increment de fluorescència, de forma exponencial a l'inici, i una tercera fase (*plateau*) on finalitza la reacció i s'estabilitza la fluorescència (Figura 18). El cicle llindar de fluorescència (Ct, de l'anglès *Threshold cycle*) es calcula determinant el punt en què la fluorescència excedeix el valor llindar escollit, i els valors de Ct corresponen al nombre de cicles que la PCR ja havia efectuat en arribar a aquest punt. Els valors de Ct són inversament proporcionals a la quantitat de ADN/cADN de partida que hi ha a la mostra, com més quantitat de seqüència hi ha més producte s'amplificarà a la reacció de PCR, més fluorescència s'alliberarà i abans assolirà el valor llindar determinat, en un menor nombre de cicles (Figura 19). Si l'eficiència de la reacció és òptima cada vegada que es dilueixi una mostra 10 vegades, el valor del Ct augmenta 3.3 cicles.



**Figura 18.** Gràfica d'amplificació de la PCR en temps real, mostrant les fases de les que consta (Font: Applied Biosystems by life technologies).



**Figura 19.** El cicle de PCR en el qual la mostra arriba a una intensitat de fluorescència per sobre cicle Ct llindar (*Font: Applied Biosystems by life technologies*).

En el present estudi, es van considerar resultats negatius tots aquells que tenien un valor de Ct superior a 40.

Per tal de poder distingir els resultats negatius veraders de falsos resultats negatius causats per un mal funcionament de la PCR (degut a inhibicions, deteriorament dels reactius, etc) s'afegeix a cada reacció un control positiu intern (CPI). Aquest CPI consisteix en l'amplificació independent d'una seqüència d'ADN artificial o d'un gen humà (per exemple, la ribonucleasa P, RNase P) que és present a la mostra biològica i que es coamplifica amb l'ADN diana del patogen durant la PCR. El CPI s'incorpora a la mix de reacció a una concentració ajustada, de manera que l'especificitat i sensibilitat del test no resultin afectades per l'amplificació competitiva d'ambdós ADNs. Així doncs, la senyal d'amplificació del CPI pot desaparèixer en mostres positives amb un alt contingut d'ADN del patogen. No obstant, la senyal del CPI s'ha de detectar sempre en les mostres negatives (absència del patogen); si no s'obté una senyal de CPI ni del patogen, s'ha de buscar la causa del mal funcionament de la reacció de PCR.

#### 4.5.5 Genotipat

El genotipat de les soques es va realitzar a l'hospital Sant Joan de Déu mitjançant la tècnica del Multilocus Sequence Typing (MLST) segons el protocol normalitzat de treball del Departament de Microbiologia Molecular (Veure procediment 7).

La tècnica del MLST analitza fragments interns d'un número determinat de gens codificants per diferents enzims metabòlics mitjançant la seqüenciació de l'ADN. Són gens amb poca variabilitats genètica i es coneixen amb el nom de gens "housekeeping". La comparació de les seqüències entre els diferents aïllats permetrà establir identitats o diferències clonals d'utilitat per l'anàlisi epidemiològic. Els gens analitzats són *aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt* i *ddl* mitjançant els primers descrits per Enright i Spratt (Enright i Spratt, 1998). A la taula 13 es mostren les seqüències dels primers d'aquests gens.

Gen		Primers forward / reverse (5'→3')
<i>aroE</i>	shikimate dehydrogenase	GCC TTT GAG GCG ACA GC/ TGC AGT TCA (G/A)AA ACA T(A/T)T TCT AA
<i>gdh</i>	glucose-6-phosphate dehydrogenase	ATG GAC AAA CCA GC(G/A/T/C) AG(C/T) TT/ GCT TGA GGT CCC AT(G/A) CT(G/A/T/C) CC
<i>gki</i>	glucose kinase	GGC ATT GGA ATG GGA TCA CC/ TCT CCC GCA GCT GAC AC
<i>recP</i>	transketolase	GCC AAC TCA GGT CAT CCA GG/ TGC AAC CGT AGC ATT GTA AC
<i>spi</i>	singal peptidase I	TTA TTC CTC CTG ATT CTG TC/ GTG ATT GGC CAG AAG CGG AA
<i>xpt</i>	xanthine phosphoribosyltransferase	TTA TTA GAA GAG CGC ATC CT/ AGA TCT GCC TCC TTA AAT AC
<i>ddl</i>	D-alanine-D-alanine ligase	TGC (C/T)CA AGT TCC TTA TGT GG/ CAC TGG GT(G/A) AAA CC(A/T) GGC AT

Taula 13. Seqüències dels gens *aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt* i *ddl* utilitzats en el MLST.

Per cada gen, les diferents seqüències corresponen als al·lels i els al·lels dels 7 loci donen lloc a un perfil al·lèlic, el qual defineix el ST. L'assignació dels al·lels es realitza a través de la base de dades disponible on-line a [www.mlst.net](http://www.mlst.net), la qual pertany a l'Imperial College de Londres. Aquesta base de dades permet relacionar ST's a nivell mundial i obtenir complexes clonals.

Un clon es defineix com un grup d'aïllats amb un perfil o ST idèntic. Els genotips amb perfils al·lèlics que només difereixen en 1 o 2 al·lels dels 7 al·lels dels locus s'anomenen SLV i DLV, respectivament. Els SLV i els DLV estan suficientment relacionats per ser considerats membres d'un cluster de genotips estretament relacionats. Aquest conjunt s'anomena complex clonal (CC). Els ST i dels CC

s'analitzen utilitzant el programa eBURST. Aquest programa compara un conjunt de ST i els agrupa en genotips relacionats i complexes clonals.

A part, hi ha una xarxa internacional (Pneumococcal Molecular Epidemiology Network o PMEN) la qual registra els clons d'especial vigilància, per exemple, els que presenten una elevada capacitat de disseminació; a data d'avui hi ha registrats 43 clons PMEN (<http://www.sph.emory.edu/PMEN/>).

Per aquests clons, hi ha una nomenclatura diferent.

- Un clon per ser considerat PMEN ha de complir els següents requisits:
  - Ha de trobar-se mínim en 2 continents diferents.
  - Ha de ser resistent a 1 o més antibiòtics d'ampi ús clínic.
  - Les dades sobre el clon han de publicar-se o en premsa abans de la ratificació.
  - Per ser admès un nou clon, s'ha de presentar en la reunió anual del PMEN.
  - S'ha de posar a disposició de la xarxa per tipificar-lo i analitzar-lo abans d'introduir-lo a la xarxa PMEN.
  - S'ha de dipositar a la col·lecció de clons ATCC.
  - Els clons estaran disponibles en el laboratori de referència de pneumococs d'Alemanya i a la Univeristat Emory al Estats Units.

## 4.6 Registre de dades i anàlisi estadístic

Les dades dels pacients inclosos a l'estudi es van emmagatzemar en una base de dades informàtica. Totes les dades es van analitzar amb el paquet estadístic Statistical Package for Social Sciences (SPSS Incl, Chicago IL. Versió 17.0). Primer es va efectuar l'anàlisi descriptiu i després l'estadística inferencial.

La relació entre dues variables qualitatives es va estudiar mitjançant el test Chi-quadrat per a taules de contingències, amb l'aplicació del test exacte de Fisher per a taules 2 x 2. Es van calcular intervals de confiança del 95%.

La comparació entre dues variables quantitatives es va realitzar mitjançant el test de Student-Fisher per a variables que compleixen l'assumpció de normalitat o el test U de Mann-Withney en cas contrari. Per a descriure les variables contínues es van utilitzar els paràmetres estadístics descriptius com la mitja, la mitjana, la desviació estàndard i el rang interquartil (IQR, P25 a P75) per les variables que segueixen una distribució normal.

Els estudis de correlació simple es van realitzar amb el coeficient de correlació de Pearson ( $r$ ) i la seva significança bilateral. Es van assumir nivells de significació estadística de  $p < 0.05$ .

Les comparacions entre grups es van realitzar amb el test de Kruskal-Wallis.



## 4.7 Procediments

A continuació es descriuen els diferents procediments utilitzats per al desenvolupament de la metodologia utilitzada per a la identificació dels aïllats de *Streptococcus pneumoniae* per cultiu, la preparació i conservació de les mostres, l'extracció de l'ADN, la reacció de PCR i el serotipat de les soques i les mostres.

En el final d'aquest apartat s'inclouen dues taules on es resumeixen el llistat de reactius (taula 22) i materials i equips (taula 23) utilitzats en els diferents procediment.

Procediment 1: Preparació i conservació de les mostres per l'extracció del ADN de *Streptococcus pneumoniae*.

Procediment 2: Extracció de l'ADN de les mostres preparades.

Procediment 3: Identificació del aïllats de *Streptococcus pneumoniae* per cultiu.

Procediment 4: Reacció de PCR

Procediment 5: Serotipat per PCR

Procediment 6: PCR en temps real per a la detecció del gen *psrP*

Procediment 7: Genotipat per Multi-Locus Sequence Typing (MLST)



#### 4.7.1 Procediment 1: Preparació i conservació de les mostres per l'extracció del ADN de *Streptococcus pneumoniae*

##### 4.7.1.1 Estudi 1

###### 4.7.1.1.1 Estudi a partir de mostra directa

Les mostres fresques de sang (plasma), LCR, líquid pleural o altres es conserven congelades a -70°C fins al moment de ser processades. La sang es pot conservar a la nevera un màxim de 72h i el LCR un màxim de 7 dies.

###### **Reactius i material:**

- Tubs Eppendorff 1.7mL
- Pipetes amb filtre de 2-20 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL i puntes
- Centrífuga

###### **Procediment:**

###### ***Preparació del plasma.***

- a) Centrifugar la mostra a  $3000 \pm 500$  rpm durant 15 minuts.
- b) Separar el plasma amb una pipeta i transferir-lo en un tub Eppendorff de 1.7mL amb rosca, lliure de ADNases i ARNses.
- c) Numerar el tub amb la clau del laboratori corresponent.

###### 4.7.1.1.2 Estudi a partir de soques

Les suspensions bacterianes es preparen resuspenent una colònia ben aïllada de *Streptococcus pneumoniae* en PBS.

###### **Reactius i material:**

- Aigua destil·lada
- Placa d'agar sang amb creixement de *Streptococcus pneumoniae*
- Tampó PBS
- Pipetes amb filtre de 2-20 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL i puntes
- Tubs Eppendorff 1.7mL
- Vórtex

**Procediment:**Preparació del tampó fosfat salí (PBS)

- Dissoldre un vial de PBS enrasant a 1 litre amb aigua destil·lada.
- Aquest reactiu es pot conservar durant 1 mes en nevera.
- Preparar tants tubs Eppendorff de 1.7mL amb tap de rosca com mostres i controls treballarem. Numerar els tubs amb la numeració del laboratori.
- Afegir a cada tub 300µl de PBS.
- Inocular en cada tub una colònia de pneumococ amb una nansa estèril. Homogeneïtzar la mostra mitjançant el vòrtex.
- Les mostres biològiques poden conservar-se al congelador a -70°C fins al moment de ser processades.

**4.7.1.2 Estudi 2 (Objectiu 2.2)****Objectiu**

Preparació de les mostres de sang conservades en paper de filtre (*Dried-Blood Spot*) per a la posterior extracció amb el robot automatitzat NucliSENS®easyMAG®.

**Reactius i material:**

- NucliSENS® easyMAG® Extraction Buffer 1 4x1L
- NucliSENS® easyMAG® Extraction Buffer 2, 4 x 1L
- NucliSENS® easyMAG® Extraction Buffer 3, 4 x 1L
- NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica
- NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer, 4 x 1L
- Instrument NucliSENS®easyMAG™
- Microplaques Greiner (bioMérieux)
- Pipeta electrònica i puntes bioHit
- Pipetes amb filtre de 2-20 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL i puntes
- Cubetes d'extracció NucliSENS®easyMAG®
- Tubus Eppendorff 1.7mL

**Procediment:**

- 1) Retallar dos discs de paper impregnats de sang (cada disc correspon a una gota de sang, conté aproximadament 50µl de mostra).
- 2) Introduir els discs retallats en un tub Eppendorff de 1.7mL amb rosca, lliure de ADNases i ARNases.
- 3) Afegir un 1mL de NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer.
- 4) Incubar els tubs que contenen els discs de paper i el buffer de lisis durant 30 minuts a temperatura ambient, agitant regularment.
- 5) Transferir el volum total de cadascun dels dos tubs a una cubeta d'extracció.

## 4.7.2 Procediment 2: Extracció de l'ADN de les mostres preparades

### 4.7.2.1 Mètode del Chelex-100

#### Objectiu:

Extracció de mostres biològiques utilitzant el mètode Chelex-100

#### Reactius i material:

- Resina Chelex-100
- Buffer EDTA, 0.5M
- Cabina de flux laminar
- Centrífuga tubs eppendorff
- Pipetes amb filtre de 2-20  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$ , 200-1000  $\mu\text{L}$  i puntes
- Termòstat de bloc
- Tubs Eppendorff 1.7mL

#### Procediment:

##### Preparació del reactiu d'extracció Chelex-100

- Preparar tampó EDTA 1x: 24.75mL d'aigua + 0.25mL de tampó EDTA buffer 100X.
- Pesar 5 grams de Chelex-100 i enrasar fins a 25 mL amb el tampó EDTA 1X preparat.
- Aquest reactiu té una durada de temps de 1 mes de conservació si es conserva en nevera.

##### Extracció

- 1) Preparar tants tubs Eppendorff de 1.7mL amb tap de rosca com mostres i controls treballarem. Numerar els tubs amb la numeració del laboratori.
- 2) Agitar la solució de Chelex-100 preparada. Abans que sedimenti, afegir 150 $\mu\text{l}$  de reactiu a cadascun dels tubs preparats.
- 3) Afegir 50 $\mu\text{l}$  de la mostra. Barrejar amb el vòrtex durant 5 segons.
- 4) Incubar les mostres 20 minuts a 56°C.
- 5) Agitar amb el vòrtex 5 segons.
- 6) Incubar les mostres 10 minuts a 100°C.

- 7) Deixar temperar a temperatura ambient i deixar sedimentar completament la resina Chelex-100.

Nota: Preparació prèvia del plasma i líquid pleural per a l'extracció amb Chelex-100

1. Centrifugar 200µL de plasma durant 60 minuts a 4°C a 25000g ( $\pm$  1000 rpm).
2. Retirar el sobrenedant i resuspendre el pellet amb 100 µL de PBS. La mostra ja està preparada per poder seguir amb l'extracció amb Chelex-100.

#### **4.7.2.2 Sistema automatitzat NucliSENS®easyMag®**

##### **Objectiu:**

Utilitzar el robot NucliSENS® easyMAG® seguint les instruccions del fabricant per a l'extracció d'àcids nucleics seguint el protocol següent:

- 1- Petició de mostres
- 2- Organització de les sèries
- 3- Càrrega dels reactius i les puntes d'extracció a l'instrument
- 4- Càrrega de les mostres a les cubetes
- 5- Càrrega de les cubetes a l'instrument
- 6- Escanejat de les cubetes
- 7- Inici de la lisis
- 8- Addició de la barreja de sílice magnètica
- 9- Inici de l'extracció

##### **Reactius i material:**

- NucliSENS® easyMAG® Extraction Buffer 1 4x1L
- NucliSENS® easyMAG® Extraction Buffer 2, 4 x 1L
- NucliSENS® easyMAG® Extraction Buffer 3, 4 x 1L
- NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer, 4 x 1L
- NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica
- Cabina de flux laminar
- Cubetes d'extracció NucliSENS® easyMAG®
- Instrument NucliSENS® easyMAG®

- Microplaques Greiner
- Pipeta electrònica i puntes bioHit
- Pipetes amb filtre de 2-20 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL i puntes
- Tubs Eppendorff 1.7mL

### **Procediment:**

Nota: A la taula 14 es mostren les icones del sistema NucliSENS®easyMAG®

Amb el sistema automatitzat NucliSENS®easyMag® es processa un volum de 200µl de mostra i s'elueix en un volum final de 110µl.

#### *1. Petició de mostres*

- a) En el menú principal fer clic a la icona 1 i seguidament a la icona 2.
- b) Introduir la identificació de les mostres, el tipus de mostra, el volum de la mostra i el volum d'eluit.
- c) Després d'introduir totes les peticions fer clic en la icona 4.

#### *2. Organització de les sèries*

- a) Crear una sèrie nova (fer clic a la icona 5).
- b) Introduir el número de sèrie i verificar el sistema de dispensació i incubació de la lisis. Escollir si es la lisis es realitzarà en el sistema o externa.
- c) Seleccionar les mostres que es processaran mantenint el botó esquerre del ratolí clicat i fer-lo lliscar per sobre la llista de les ID de les mostres (es marquen ressaltades de color groc). Fer clic a la icona 6.
- d) Verificar les posicions assignades.

#### *3. Càrrega dels reactius i les puntes d'extracció a l'instrument*

- a) Fer clic a la icona 7 per canviar de pantalla.
- b) Fer clic a la icona 8 per gestionar els reactius.
- c) Llegir amb el lector de codis de barres les diferents posicions i successivament el codi de barres de cadascun dels reactius.
- d) Carregar les puntes d'extracció comprovant que el dibuix de la pantalla s'enfosqueix i el botó passa de color vermell a verd.

	Icona 1		Icona 6
	Icona 2		Icona 7
	Icona 3		Icona 8
	Icona 4		Icona 9
	Icona 5		Icona 10

Taula 14. Icones del sistema NucliSENS®easyMAG®.

#### 4. Càrrega de les mostres a les cubetes

- a) Col·locar les cubetes d'extracció en el suport metàl·lic i carregar-hi les mostres verificant les posicions assignades.

#### 5. Càrrega de les cubetes a l'instrument

- a) Col·locar les cubetes a l'instrument comprovant que el dibuix de la pantalla s'enfosqueix.

#### 6. Escanejat de les cubetes

- a) Escanejar el codi de barres de cada posició (A, B, C) i després el codi de barres de cada cubeta.
- b) A la pantalla apareix el codi de barres de la cubeta i el botó canvia de color vermell a color verd.

#### 7. Inici de la lisis

- a) Tancar la porta de l'instrument NucliSENS® easyMAG® Instrument.
- b) Per iniciar la lisis, fer clic a la icona 9.
- c) El temps aproximat són 10 minuts. Durant el temps de lisis, preparar la barreja de la sílice magnètica.

#### 8. Addició de la barreja de sílice magnètica

- a) Afegir 550µl de NucliSENS®easyMAG® Extraction Buffer 3 a un tub de NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica i agitar-ho mitjançant el vòrtex.
- b) Utilitzar la pipeta bioHit per a transferir un volum de 125µl a cadascun del 8 pouets d'una microplaca Greiner.
- c) Transferir 100µl a cadascun dels pous de les cubetes d'extracció.

#### 9. Inici de l'extracció

- a) Fer clic a la icona 10 per iniciar l'extracció.
- b) A la pantalla de l'ordinador es mostra l'estat de l'extracció i el temps restant.

Al finalitzar l'extracció, retirar les cubetes i les puntes. Transferir el volum eluït en tubs estèrils.



### 4.7.3 Procediment 3: Identificació del aïllats de *Streptococcus pneumoniae* per cultiu

#### Objectiu:

Identificació de les soques sospitoses de *S. pneumoniae* mitjançant la tinció de Gram, sensibilitat a optoquina i aglutinació en làtex.

#### Reactius i material:

- Colorants tinció de Gram: Color Gram 2, R1, R2, R3, R4
- Placa agar Columbia + 5% sang amb creixement de *Streptococcus pneumoniae*
- Placa agar Columbia + 5% sang
- Nansa de sembra calibrada
- Test optoquina
- Pinces
- Portaobjectes

#### Procediment:

- 1) Tinció de gram. Estendre la mostra (posar una gota d'aigua en un portaobjectes, agafar una colònia amb la nansa de sembra i emulsionar-ho) i fixar amb calor. Afegir el colorant cristall violeta. Esperar 1 minut i 30 segons. Esbandir amb aigua. Afegir el colorant lugol. Esperar 1 minut. Esbandir amb aigua. Afegir alcohol d'acetona. Esbandir amb aigua. Afegir el colorant safranina. Esperar 1 minut. Esbandir amb aigua.
- 2) Sensibilitat a la optoquina. Realitzar una sembra del pneumococ a la placa agar sang. Amb l'ajuda d'unes pinces prèviament flamejades i fredes agafar un disc d'optoquina i col·locar-lo sobre la superfície de la placa d'agar sang on s'ha realitzat la sembra del pneumococ. Incubar de 20 a 24 hores a 37°C, i observar l'halo d'inhibició.
- 3) Aglutinació en làtex. Posar una gota de la solució de làtex en el paper. Agafar una colònia amb la nansa de sembra i emulsionar-ho. El resultat és visual, si la reacció és positiva es produeix aglutinació.

#### 4.7.4 Procediment 4: Reacció de PCR

##### 4.7.4.1 Preparació de la mix d'amplificació (master mix)

###### Objectiu:

Preparar la mix d'amplificació per a la reacció de PCR.

###### Reactius i material:

- Aigua de PCR
- TaqMan Universal PCR Master Mix (5mL)
- Vial de primers liofilitzats forward i reverse 10nM
- Vial de sonda TaqMan – TAMRA 6nM (*gen ply*)
- Vial de sonda TaqMan MGB 6nM (*gen wzg*)
- Pipetes amb filtre 2-20  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L, 200-1000 i puntes
- Tubs Eppendorff 1.7mL
- Tapes òptiques
- Tubs òptics
- Cabina de flux laminar

###### Procediment:

###### *Reconstitució dels primers*

Reconstituir el vial de primers (*forward i reverse*) a 10  $\mu$ M amb 1 mL d'aigua de PCR. Homogeneïtzar i deixar 30 minuts en nevera. Aliquotar 92  $\mu$ l en tubs estèrils. Congelar els reactius.

###### *Reconstitució de la sonda*

Reconstituir el vial de la sonda a 10  $\mu$ M amb 0,6 mL d'aigua de PCR. Homogeneïtzar i deixar 30 minuts en nevera. Aliquotar 32  $\mu$ l en tubs estèrils. Congelar els reactius.

###### *Preparació de la master mix*

- a) Preparació de la master-mix tal i com s'indica en les taules 15 i 16.
- b) Preparar tant tubs de 0.2mL (MicroAmp Optical tubes) com mostres s'han de processar més els controls. Pipetejar 20  $\mu$ L de la mix d'amplificació a cada tub.
- c) Afegir 5  $\mu$ L de l'ADN prèviament extret o dels controls a la mix d'amplificació preparada.
- d) Tapar els tubs, sense tocar la tapa.

Component	Volum per mostra	Concentració final
TaqMan Universal PCR Master mix	12.5 µL	
Primer forward 10 µM	2.25 µL	0.9 µM (900 nM)
Primer reverse 10 µM	2.25 µL	0.9 µM (900 nM)
Sonda 10 µM	0.75 µL	0.3 µM (300 nM)
Control intern	1 µL	
Agua de PCR	1.25 µL	
<b>Total</b>	<b>20 µL</b>	

Taula 15. *Master mix* per la PCR del gen de la pneumolisina.

Component	Volum per mostra	Concentració final
TaqMan Universal PCR Master mix	12.5 µL	
Primer forward 10 µM	2.25 µL	0.9 µM (900 nM)
Primer reverse 10 µM	2.25 µL	0.9 µM (900 nM)
Sonda 10 µM	0.5 µL	0.3 µM (300 nM)
Control intern	1 µL	
Agua de PCR	1.5 µL	
<b>Total</b>	<b>20 µL</b>	

Taula 16. *Master mix* per la PCR del gen capsular *wzg*.

#### 4.7.4.2 Amplificació de les mostres

##### Objectiu:

Reacció de PCR per als gens de la pneumolisina (*ply*) i el gen capsular *wzg* a partir de la *master mix* preparada en el punt 4.7.4.1 en el termociclador AbiPRISM 7300 d'acord amb les instruccions del fabricant.

##### Reactius i material:

- *Master mix* preparades en el punt 4.7.4.1.
- Centrífuga de tires
- Instrument AbiPrism 7300

##### Procediment:

- 1) Engegar l'ordinador i el termociclador AbiPrism 7300. Fer clic a la icona AbiPrism 7300
- 2) Menú *File* > *New* > *Ok*. Fer clic a la icona *Tools* > *Detector Manager*> Seleccionar l'aplicació que correspon a: *Neumococ (FAM)*, *Neumococ wzg (FAM)* i *control intern (VIC)*. Fer clic a *Add to Plate*.

3) *View > Well-inspector*. Per crear el full de treball, a la pestanya *SETUP*: *Name* (identificació de la mostra), *Use* (aplicació que utilitzarem), *Task* (tipus de mostra, pot ser un control negatiu, mostra o un estàndard quantificat).

4) A la pestanya *INSTRUMENT* comprovar el perfil d'amplificació:

	2 minuts	50°C
	10 minuts	95°C
45 cicles	15 segons	95°C
	1 minut	60°C

5) Guardar el full de treball a la carpeta de resultats, identificar-ho amb la data i l'aplicació.

6) Fer un spin als tubs de la *master mix* i col·locar-los en el termociclador segons la posició que els hi hem adjudicat en crear el full de treball. Fer clic al botó *START* (Durada: 1hora 59 minuts)

7) Per veure els resultats, a la pestanya *RESULTS* seleccionar la pestanya *Amplification Plot*. Seleccionar l'aplicació que es vol analitzar en el detector. El *threshold* ha de tenir un valor de 0.20000. Per fer l'anàlisi ha d'estar activada l'opció *Manual Ct* i *Auto Baseline*. Fer clic en *Analyse*.

8) A la pestanya *Report*, podem visualitzar els Ct calculats de forma automàtica.

#### 4.7.5 Procediment 5: Serotipat per PCR

##### 4.7.5.1 Preparació de la mix d'amplificació (master mix)

###### Objectiu:

Preparar de la mix d'amplificació per a la reacció de PCR.

###### Reactius i material:

- Aigua de PCR
- TaqMan Universal PCR Master Mix (5mL)
- Vial de primers liofilitzats forward i reverse 10nM
- Vial de sonda TaqMan MGB 6nM
- Pipetes amb filtre 2-20  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$ , 200-1000 i puntes
- Tubs Eppendorff 1.7mL
- Tapes òptiques
- Tubs òptics
- Cabina de flux laminar

###### Procediment:

###### *Reconstitució dels primers*

Reconstituir el vial de primers (*forward i reverse*) a 10  $\mu\text{M}$  amb 1 mL d'aigua de PCR. Homogeneïtzar i deixar 30 minuts en nevera. Aliquotar 92  $\mu\text{l}$  en tubs estèrils. Congelar els reactius.

###### *Reconstitució de la sonda*

Reconstituir els vials de la sonda a 10  $\mu\text{M}$  amb 0,6 mL d'aigua de PCR. Homogeneïtzar i deixar 30 minuts en nevera. Aliquotar 22  $\mu\text{l}$  en tubs estèrils. Congelar els reactius.

###### *Preparació de la master mix*

- a) Preparació de la *master mix* tal i com s'indica en les taules 17 i 18, en funció de si la reacció conté un o dos fluoròfors, respectivament.
- b) Preparar tant tubs de 0.2mL (MicroAmp Optical tubes) com mostres s'han de processar més els controls. Pipetejar 20  $\mu\text{L}$  de la mix d'amplificació a cada tub.

Component	Volum per mostra	Concentració final
TaqMan Universal PCR Master mix	12.5 µL	
Primer forward 10 µM	2.25 µL	0.9 µM (900 nM)
Primer reverse 10 µM	2.25 µL	0.9 µM (900 nM)
Sonda 10 µM	0.5 µL	0.3 µM (300 nM)
Agua de PCR	2.5 µL	
Total	20 µL	

Taula 17. *Master mix* per a les reaccions de PCR que contenen un fluoròfor (1 sonda).

Component	Volum per mostra	Concentració final
TaqMan Universal PCR Master mix	12.5 µL	
Primer forward 10 µM	2.25 µL	0.9 µM (900 nM)
Primer reverse 10 µM	2.25 µL	0.9 µM (900 nM)
Sonda-1 10 µM	0.5 µL	0.3 µM (300 nM)
Sonda-2 10 µM	0.5 µL	0.3 µM (300 nM)
Agua de PCR	2 µL	
Total	20 µL	

Taula 18. *Master mix* per a les reaccions de PCR que contenen dos fluoròfors (2 sondes).

- c) Afegir 5 µL de l'ADN prèviament extret o dels controls a la mix d'amplificació preparada.
- d) Tapar els tubs, sense tocar la tapa.

#### 4.7.5.2 Amplificació de les mostres

##### Objectiu

Reacció de PCR per al serotipat de *Streptococcus pneumoniae* a partir de la *master mix* preparada en el punt 4.7.5.1. en el termociclador AbiPRISM 7300 d'acord amb les instruccions del fabricant.

##### Reactius i material:

- *Master mix* preparades en el punt 4.7.5.1.
- Centrífuga de tires
- Instrument AbiPrism 7300

##### Procediment:

- 1) Engegar l'ordinador i el termociclador AbiPrism 7300. Fer clic a la icona AbiPrism 7300

- 2) Menú *File* > *New* > *Ok*. Fer clic a la icona *Tools* > *Detector Manager*> Seleccionar l'aplicació que correspon a: *s1 (FAM)*, *s5 (VIC)*, *S19A (FAM)*, *s19FBC (VIC)*, *s14 (FAM)*, *s15 (VIC)*, *s3 (FAM)*, *s7FA (FAM)*, *s4 (FAM)*, *s6A (FAM)*, *s6B (VIC)*, *s8 (FAM)*, *s9VANL (VIC)*, *s18CB (FAM)*, *s23A (VIC)*, *s23F (FAM)*. Fer clic a *Add to Plate*.
- 3) *View* > *Well-inspector*. Per crear el full de treball, a la pestanya *SETUP: Name* (identificació de la mostra), *Use* (aplicació que utilitzarem), *Task* (tipus de mostra, pot ser un control negatiu, mostra o un estàndard quantificat).
- 4) A la pestanya *INSTRUMENT* comprovar el perfil d'amplificació:

	2 minuts	50°C
	10 minuts	95°C
45 cicles	15 segons	95°C
	1 minut	60°C

- 5) Guardar el full de treball a la carpeta de resultats, identificar-ho amb la data i l'aplicació.
- 6) Fer un spin als tubs de la *master mix* i col·locar-los en el termociclador segons la posició que els hi hem adjudicat en crear el full de treball. Fer clic al botó *START* (Durada: 1 hora 59 minuts).
- 7) Per veure els resultats, a la pestanya *RESULTS* seleccionar la pestanya *Amplification Plot*. Seleccionar l'aplicació que es vol analitzar en el detector. El *threshold* ha de tenir un valor de 0.20000. Per fer l'anàlisi ha d'estar activada l'opció *Manual Ct* i *Auto Baseline*. Fer clic en *Analyse*.
- 8) A la pestanya *Report*, podem visualitzar els *Ct* calculats de forma automàtica.

#### 4.7.6 Procediment 6: PCR en temps real per a la detecció del gen *psrP*

##### 4.7.6.1 Preparació de la mix d'amplificació (master mix)

###### Objectiu:

Preparar la mix d'amplificació per a la reacció de PCR.

###### Reactius i material:

- Aigua de PCR
- Custom TaqMan® Gene Expression Assay
- TaqMan Universal PCR Master Mix (5mL)
- Cabina de flux laminar
- Pipetes amb filtre 2-20 µL, 20-200 µL, 200-1000 i puntes
- Tubs Eppendorff 1.7mL
- Tapes òptiques
- Tubs òptics

###### Procediment:

###### Preparació de la master mix

- 1) Preparació de la master-mix tal i com s'indica a la taula 19.
- 2) Preparar tant tubs de 0.2mL (MicroAmp Optical tubes) com mostres s'han de processar més els controls. Pipetejar 20 µL de la mix d'amplificació a cada tub.
- 3) Afegir 5 µL de l'ADN prèviament extret o dels controls a la mix d'amplificació preparada.
- 4) Tapar els tubs, sense tocar la tapa.

Component	Volum per mostra	Concentració final
TaqMan Universal PCR Master mix	12.5 µL	
Primer forward 10 µM	1.25 µL	0.3 µM (300 nM)
Primer reverse 10 µM		0.3 µM (300 nM)
Sonda 10 µM		0.15 µM (150 nM)
Agua de PCR	6.25 µL	
<b>Total</b>	<b>20 µL</b>	

Taula 19. Master mix per la PCR del gen *psrP*.



#### 4.7.6.2 Amplificació de les mostres

##### Objectiu:

Reacció de PCR per al gen *psrP* a partir de la *master mix* preparada en el punt 4.7.6.1 en el termociclador AbiPRISM 7300 d'acord amb les instruccions del fabricant.

##### Reactius i material:

- Master mix preparades en el punt 4.7.6.1
- Instrument AbiPrism 7300
- Centrífuga de tires

##### Procediment:

- 1) Engegar l'ordinador i el termociclador AbiPrism 7300. Fer clic a la icona AbiPrism 7300
- 2) Menú *File > New > Ok*. Fer clic a la icona *Tools > Detector Manager*> Seleccionar l'aplicació que correspon a: *PsrP (FAM)*. Fer clic a *Add to Plate. View > Well-inspector*.
- 3) Per crear el full de treball, a la pestanya *SETUP: Name* (identificació de la mostra), *Use* (aplicació que utilitzarem), *Task* (tipus de mostra, pot ser un control negatiu, mostra o un estàndard quantificat).
- 4) A la pestanya *INSTRUMENT* comprovar el perfil d'amplificació:

	2 minuts	50°C
	10 minuts	95°C
45 cicles	15 segons	95°C
	1 minut	60°C

- 5) Guardar el full de treball a la carpeta de resultats, identificar-ho amb la data i l'aplicació.
- 6) Fer un spin als tubs de la *master mix* i col·locar-los en el termociclador segons la posició que els hi hem adjudicat en crear el full de treball. Fer clic al botó *START* (Durada: 1hora 59 minuts)
- 7) Per veure els resultats, a la pestanya *RESULTS* seleccionar la pestanya *Amplification Plot*. Seleccionar l'aplicació que es vol analitzar en el detector. El *threshold* ha de tenir un valor de 0.20000. Per fer l'anàlisi ha d'estar activada l'opció *Manual Ct* i *Auto Baseline*. Fer clic en *Analyse*.
- 8) A la pestanya *Report*, podem visualitzar els Ct calculats de forma automàtica.

#### 4.7.7 Procediment 7: Genotipat per Multilocus Sequence Typing (MLST)

##### Objectiu:

Mètode analític aplicable per a estudis epidemiològics de *S. pneumoniae* mitjançant la tècnica de MLST.

##### Reactius i material:

- Vial de primers liofilitzats forward i reverse 0.1µM
- Amplitaq Gold PCR Master Mix
- Aigua de PCR
- Agarosa
- GelRed™
- Marcador de pes molecular
- Tampó de càrrega
- Buffer TBE 1x
- ExoSAP-IT
- Agentcourt CleanSEQ
- Etanol 85%
- Big Dye Term v3.1.CycleSeq.Kit.100Rx
- POP-7™ Polymer for 3130/3130xl Genetic Analyzers
- Buffer (10x) with EDTA
- Tubs Eppendorff 1.7mL
- Plaques òptiques
- Tubs amb tapa
- Pipetes amb filtre 2-20 µL, 20-200 µL, 200-1000 i puntes
- Termociclador Gene Amp PCR System 9700®.
- Cubetes d'electroforesi en gel d'agarosa. Font d'electroforesi.
- Transiluminador de llum ultraviolada i càmera fotogràfica.
- Centrífuga de tires
- Seqüenciador Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer

##### Procediment:

###### *Reconstitució dels primers*

Reconstituir el vial de primers a 0.01µmol amb el volum d'aigua de PCR indicat per el fabricant. Homogeneïtzar i deixar 30 minuts en nevera. Aliquotar 50 µl en tubs estèrils. Congelar els reactius.

#### 4.7.7.1 Reacció d'amplificació dels gens metabòlics

- 1) Preparació de la master-mix tal i com s'indica en les taula 20.
- 2) Preparar tant tubs de 0.2mL (tubs amb tapa) com mostres s'han de processar més els controls. Pipetejar 47  $\mu$ L de la mix d'amplificació a cada tub.
- 3) Afegir 3  $\mu$ L de l'ADN prèviament extret o dels controls a la mix d'amplificació preparada.
- 4) Tapar els tubs, sense tocar la tapa.

Component	Volum per mostra
Amplitaq Gold PCR Master Mix	25 $\mu$ L
Primer forward	1 $\mu$ L
Primer reverse	1 $\mu$ L
Aigua de PCR	20 $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>47 <math>\mu</math>L</b>

Taula 20. Master mix per la PCR gel gen *aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, *ddl*.

Col·locar els tubs en el termociclador Gene Amp® PCR System 9700, aplicant el següent perfil d'amplificació:

	3 minuts	95°C
40 cicles	30 segons	95°C
	30 segons	50°C
	1 minut	72°C
	10 minuts	72°C

#### 4.7.7.2 Electroforesi – gel d'agarosa

Per comprovar que l'amplificació dels gens s'ha realitzat correctament, es realitza una electroforesi en gel d'agarosa.

##### Gel d'agarosa

Pesar un gram d'agarosa i barrejar-lo amb 70 ml de tampó TBE 1x en un vas de precipitats. Escalfar la barreja per tal de dissoldre l'agarosa. Afegir 1 $\mu$ l de GelRed™. Homogeneïtzar. Repartir al barreja en el porta-gel i deixar refredar. Carregar les mostres al gel (6 $\mu$ l aigua + 2  $\mu$ l tampó de càrrega + 3 $\mu$ l producte amplificat). Electroforesi a una potència de 130-140A durant 30 minuts. Visualització dels resultats en el transiluminador de llum ultraviolada.

#### 4.7.7.3 Purificació dels productes amplificats

Procediment per purificar els productes amplificats per eliminar totes aquelles impureses (sals, restes de nucleòtids...) que poden disminuir la qualitat de la seqüència. Per purificar s'utilitza el sistema ExoSAP-IT. Afegir 5 µl del producte amplificat a 2 µl de ExoSAP-IT en un tubs de 0.2ml amb tapa. Col·locar els tubs en el termociclador Gene Amp® PCR System 9700, aplicant el següent perfil d'amplificació:

15 minuts	37°C
15 minuts	80°C

#### 4.7.7.4 Reacció de seqüenciació

- 1) Preparació de la reacció de seqüenciació tal i com s'indica en les taula 21.
- 2) En una placa de 96 pouets, pipetejar 7.5µL de la reacció de seqüenciació a cada pouet.
- 3) Afegir 2.5 µL de l'ADN prèviament extret o dels controls a la mix d'amplificació preparada.
- 4) Tapar la placa.

Component	Volum per mostra
Big dye 3.1	1 µL
Buffer	1.5 µL
Primer forward / reverse	1 µL
Aigua de PCR	4 µL
<b>Total</b>	<b>7.5 µL</b>

Taula 21. Reacció de seqüenciació.

Col·locar la placa en el termociclador Gene Amp® PCR System 9700, aplicant el següent perfil d'amplificació:

25cicles	10 segons	96°C
	5 seongs	50°C
	2 minut	60°C

#### 4.7.7.5 Purificació de la reacció de seqüència

La purificació de la reacció de seqüència es realitza amb el sistema de boles magnètiques Agencourt CleanSEQ - Dye Terminator Removal d'acord amb les instruccions del fabricant (Beckman Coulter).

**4.7.7.6 Seqüenciació**

La seqüenciació de l'ADN es realitza en el seqüenciador 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) d'acord amb el procediment de treball normalitzat del departament de Microbiologia Molecular.

**4.7.7.7 Lectura de seqüències**

Analitzar les seqüències amb el software SeqScape Manger v2.6 (Applied Biosystems).

Assignar el perfil o ST a la base de dades MLST disponible a [www.mlst.net](http://www.mlst.net).

Reactiu	Comercialitza	Referència
Agarosa	Ecogen	AGO200
Agentcourt CleanSEQ	Beckman Coulter	A29151
Aigua de PCR (Water PCR, Grade) (1 x 25mL)	Roche Applied Science	03 315 959 001
Amplitaq Gold PCR Master Mix	Applied Biosystems	C14318739G
Big Dye Term v3.1.CycleSeq.Kit.100Rx	Applied Biosystems	4337455
Buffer (10x) with EDTA	Applied Biosystems	402824
Buffer EDTA, 0.5M	Sigma-Aldrich	E-7889
Buffer TBE 10X	AppliChem	A0972, 5000PE
Color Gram 2, R1 (cristal violeta oxalatado)	bioMérieux	55545
Color Gram 2, R2 (lugol-PVP)	bioMérieux	55546
Color Gram 2, R3 (decolorante)	bioMérieux	55547
Color Gram 2, R4 (safranina)	bioMérieux	55548
Custom TaqMan® Gene Expression Assay (small scale, 20X)	Applied Biosystems	433148
ExoSAP-IT	Isogen	78200
GelRed <sup>IM</sup>	Biotium	41003
Marcador de pes molecular	Ecogen	M1
NucliSENS® easyMAG <sup>IM</sup> Extraction Buffer 1 (4x1L)	bioMérieux	280130
NucliSENS® easyMAG <sup>IM</sup> Extraction Buffer 2 (4 x 1L)	bioMérieux	280131
NucliSENS® easyMAG <sup>IM</sup> Extraction Buffer 3 (4 x 1L)	bioMérieux	280132
NucliSENS® easyMAG <sup>IM</sup> Lysis Buffer (4x1L)	bioMérieux	280134
NucliSENS® easyMAG <sup>IM</sup> Magnetic Silica	bioMérieux	280133
Placa agar Columbia + 5% sangre de cordero (20 plaques)	bioMérieux	43041
POP-7™ Polymer for 3130/3130xl Genetic Analyzers	Applied Biosystems	4352759
Primer 0,01µM (HPLC Purified Oligo 0,01µmol)	Izasa	
Primer 10nM (Sequence Detection Primer, small scale 10nmol)	Applied Biosystems	4304970
Resina Chelex®100	Biorad® Laboratories	143-2832
Sonda 6nM (TaqMan Probe, small scale, TAMRA quencher 6nmol)	Applied Biosystems	450025
Tampó de càrrega	Ecogen	BIO-37070
Tampó PBS (pols) (4x1L)	bioMérieux	75511
TaqMan® Universal PCR Master Mix (200Rxn)	Applied Biosystems	4304437
Test Optoquina (2 x 30 discs)	bioMérieux	55912

Taula 22. Llistat de reactius utilitzats en els procediments.

Material	Comercialitza	Referència
Cabina de flux laminar vertical de seguretat biològica, Biohazard Classe II A (BIO-II-A)	Telstar	
Centrífuga de tires	bioMérieux	285056
Centrífuga tubs eppendorff	Eppendorff	5417C
Centrífuga universal Hermle Z300	Hermle Labortechnik	28300V01
Cubetes d'electroforesi en gel d'agarosa. Font d'electroforesi.	Ecogen	
Cubetes d'extracció NucliSENS@easyMAG™ (384 unitats)	bioMérieux	280135
Instrument ABI Prism® 7300 Sequence Detection System	Applied Biosystems	4330087
Instrument NucliSENS@easyMAG™	bioMérieux	200111
Microcentrífuga Centrífuga, model 5417C	Eppendorff	EP-CE-022621807
Microplaques Greiner	bioMérieux	278303
Nansa de sembra calibrada 1µl polipropilè estèril color blanc	Nirco	668801
Pipeta automàtica Nichipet EX 100-1000µl	Nirco	NPX-1000
Pipeta automàtica Nichipet EX 10-100µl	Nirco	NPX-100
Pipeta automàtica Nichipet EX 1-10µl	Nirco	NPX-10
Pipeta automàtica Nichipet EX 20-200µl	Nirco	NPX-200
Pipeta automàtica Nichipet EX 2-20µl	Nirco	NPX-20
Pipeta electrònica BioHit	bioMérieux	280141
Portaobjectes	LineaLab	CH-CP0201
Plaques òptiques (Optical 96w Plates Barcoded, 20 plates)	Applied Biosystems	4306737
Puntes 0.1-10µl	Ecogen	S1120-3010
Puntes 100-1000µl	Ecogen	S1126-7810
Puntes 1-100µl	Ecogen	S1120-1840
Puntes 1-200µl	Ecogen	S1120-8810
Puntes 1-20µl	Ecogen	S1120-1810
Puntes pipeta BioHit	bioMérieux	280146
Seqüenciador Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems	
Tapes òptiques (MicroAmp® Optical 8-Cap Strip)	Applied Biosystems	4323032
Taps tubs eppendorff (Twiststop™ vial cap, white)	Sorenson	15480
Termostato de bloque metàl·lic para tubos "Multiplaces"	J.P. Selecta	7471200
Termociclador Gene Amp® PCR System 9700	Applied Biosystems	
Transiluminador de llum ultraviolada i càmera fotogràfica.		Ecogen
Tubs amb tapa (MultiPLY®-µStripPro 8-strip)	Sarsted	72991002
Tubs eppendorff 1.7ml (Twiststop™ 1.7ml conical vial without cap, Natural)	Sorenson	15590
Tubs òptics (MicroAmp® Optical Tube without Cap, 0.2 ml)	Applied Biosystems	4316567
Vòrtex	Nirco	Genie 2T

Taula 23. Llistat de materials i equips utilitzats en els procediments.

# RESULTATS

## Objectiu 1 – Article 1:

*Serotype 3 is a common serotype causing invasive pneumococcal disease in children < 5 years old, as identified by Real-Time PCR.* L.Selva, P.Ciruela, C. Esteva, MF de Sevilla, G.Codina, S.Hernandez, F.Moraga, JJ.Garcia-Garcia, A.Planes, F.Coll, I.Jordan, N.Cardeñosa, J.Batalla, L.Salleras, A.Dominguez, C.Muñoz-Almagro. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease. Publicat on-line: 4 de novembre de 2011*

Factor d'impacte (2010): 2.631

- Veure article a l'annex 1

## Objectiu 2 – Article 2:

*Easy diagnosis of invasive pneumococcal disease.* L. Selva, R. Pallares, C. Muñoz-Almagro. *Emerging Infectious Disease.* Vol. 17, nº 6, Juny 2011. Pàgines 1125 a 1127

Factor d'impacte (2010): 6.859

- Veure article a l'annex 2

## Objectiu 3 – Article 3:

*Psrp, a protective pneumococcal antigen, is highly prevalent in children withn pneumonia and is strongly associated with clonal type.* C. Muñoz-Almagro, L. Selva, C.J. Sanchez, C. Esteva, M. Fernandez de Sevilla, R. Pallares, C.J. Orihuela. *Clinical and vaccine immunology.* Vol. 17, nº 11, Novembre 2010. Pàgines 1672-678

Factor d'impacte (2010): 2.471

- Veure article a l'annex 3

## Resultats addicionals:

*Prevalence and clonal distribution of PcpA, Psrp and Pilus-1 among pediatric isolates of Streptococcus pneumoniae.* L. Selva, P. Ciruela, K. Blanchette, C.J. Orihuela, C. Muñoz-Almagro i Grup d'estudi de la malaltia pneumocòccica invasiva a Catalunya.

*Dades acceptades per a la seva publicació. PloS ONE. 2012*

- Veure article a l'annex 4





## 5.1 Estudi 1

### 5.1.1 Pacients inclosos a l'estudi

Durant el període d'estudi es van recollir un total de 319 episodis de malaltia pneumocòccia invasiva, que corresponien a 170 (53.35%) nens i 149 (46.7%) nenes amb una mitjana d'edat de  $29.6 \pm 15.7$  mesos. Dels 319 pacients, 91 (28.5%) pacients havien rebut tractament antibiòtic durant el mes previ al diagnòstic de la MPI i 168 (52.8%) pacients havien rebut com a mínim una dosi de la vacuna PCV7 tot i que només 141 (44.3%) estaven correctament vacunats d'acord amb la seva edat.

Per al present estudi, es van seleccionar els 257 pacients (80.6%) a qui se'ls havia realitzat cultiu microbiològic i la PCR, i tenien disponible informació del serotip (es van excloure 35 pacients estudiats només per cultiu, 9 estudiats només per PCR i 18 que no tenien realitzat l'estudi del serotip). Dels pacients inclosos a l'estudi, 140 (54.4%) eren nens i 117 (45.5%) nenes, amb una mitjana d'edat de  $30.95 \pm 15$  mesos (amb un rang d'edat des de 20 dies fins a 59 mesos). La distribució dels pacients per grups d'edat era: 10 (3.8%) pacients menors de 6 mesos, 19 (7.4%) pacients entre 6 i 11 mesos, 64 (25%) pacients entre 12 i 23 mesos i 164 (63.8%) entre 24 i 59 mesos. Dels 257 pacients estudiats, 83 (32%) havien rebut tractament antibiòtic durant el mes previ al diagnòstic de la MPI. En relació amb l'estat vacunal dels pacients amb la vacuna conjugada heptavalent (PCV7), 140 (54.5%) del total de pacients estudiats havien rebut una o més dosis de PCV7 i 112 (47.5%) estaven correctament vacunats d'acord amb l'edat.

En relació amb la tècnica diagnòstica, 71 (27.6%) pacients tenien un resultat positiu en el cultiu microbiològic i en la PCR en temps real, 15 (5.8%) pacients tenien un resultat positiu en el cultiu microbiològic i un resultat negatiu en la PCR en temps real i 171 (66.5%) pacients tenien un resultat positiu en la PCR en temps real i el cultiu negatiu. La proporció de casos diagnosticats només per PCR en temps real era del 66.5% (60.9-72.5 IC 95%) en comparació amb un 33.4% (27.9-39.4 IC 95%) diagnosticats per cultiu microbiològic. Els 257 episodis van ser detectats en 64 (24.9%) mostres de sang, 163 (63.4%) mostres de líquid pleural, 28 (10.9%) mostres de LCR i 2 (0.8%) mostres de líquid articular. La taula 24 mostra la distribució de les mostres positives detectades per cultiu i només per PCR en temps real.

		Mostres positives per cultiu n (% <sup>a</sup> , IC95%)	Mostres positives només per PCR en temps real n (% <sup>a</sup> , IC95%)	p <sup>b</sup>
Tipus de mostra	Sang	21 (32.8, 22.1-44.9)	43 (67.2; 55-77.8)	<.001
	Líquid pleural	42 (25.8, 19.5-32.9)	121 (74.2; 67.1-80.5)	<.001
	LCR	21 (75, 56.7-88.3)	7 (25; 11.6-43.3)	<.001
	Líquid articular	2 (100; 22.4-100)	0 (0; 0-77.6)	0.3

a Percentatge respecte totes les mostres positives en funció del tipus de mostra.

b Test de Fisher o Chi quadrat de Pearson comparant el percentatge en funció del tipus de mostra

**Taula 24.** Distribució del tipus de mostres detectades per cultiu i només per PCR en temps real.

El diagnòstic clínic dels pacients inclosos en l'estudi va ser: 219 pneumònies (85.2%), 27 meningitis (10.5%), 6 bacterièmies (2.3%), 2 artritis (0.8%), 2 septicèmies (0.8%) i 1 cel·lulitis (0.4%). Del total de pacients amb pneumònia, un 85.8% (n=188) van presentar pneumònia complicada amb empiema. Un total de quatre (1.5%) pacients van resultar èxits (3 pacients amb meningitis i 1 pacient amb sèpsia).

El major increment del diagnòstic microbiològic mitjançant l'ús de la PCR en temps real va ser en els pacients amb pneumònia, en els quals un 74% (68.0-80.0 IC 95%) es van diagnosticar només per PCR en temps real mentre que un 26% (20.4-32.0 IC 95%) es van diagnosticar per cultiu. Es van observar diferències estadísticament significatives en la pneumònia i en la bacterièmia (taula 25).

El serotipat del pneumococ es va realitzar en les 86 (33.5%) soques aïllades per cultiu i la resta, 171 (66.5%) dels casos es van estudiar per PCR en temps real directament de la mostra biològica.

L'estudi de sensibilitat antibiòtica es va realitzar en les 86 soques aïllades per cultiu, de les quals, només 2 (2.3%) van mostrar una sensibilitat intermitja a penicil·lina (CMI 4µg/ml) i cap (0%) soca va mostrar resistència a penicil·lina d'acord amb els punts de tall no meningis (CLSI-M100-S20, 2010). Considerant els punts de tall meningis, un 33.7% de les soques van mostrar no ser sensibles a penicil·lina (CMI ≥ 0,12) i un 16.3% a cefotaxima, els serotips amb sensibilitat disminuïda a penicil·lina d'acord amb els punts de tall meningis corresponien als serotips 19A (n=15; 51.7% de les soques no sensibles), el serotip 23B (n=3;10.3%) i el serotip 24B/F (n=3;10.3%).

Clínica	Pacients diagnosticats per cultiu	Pacients diagnosticats només per PCR en temps real	p <sup>a</sup>
	n (% <sup>b</sup> ; IC 95%)	n (% <sup>b</sup> ; IC 95%)	
Pneumònia	57 (26.0; 20.4-32.0)	162 (74.0; 68.4-80.0)	<.001
Meningitis	20 (74.1; 53.7-88,9)	7 (25.9; 11.1-46.3)	0.09
Bacterièmia	6 (100)	0	0.001
Septicèmias	0	2 (100)	0.55
Artritis	2 (100)	0	0.11
Cel·lulitis	1	0	0.33
Total	86 (33.4, 27.9-39.4)	171 (66.5, 60.9-72.5)	<.001

a Percentatge respecte tots els diagnòstics microbiològic en funció de la presentació clínica

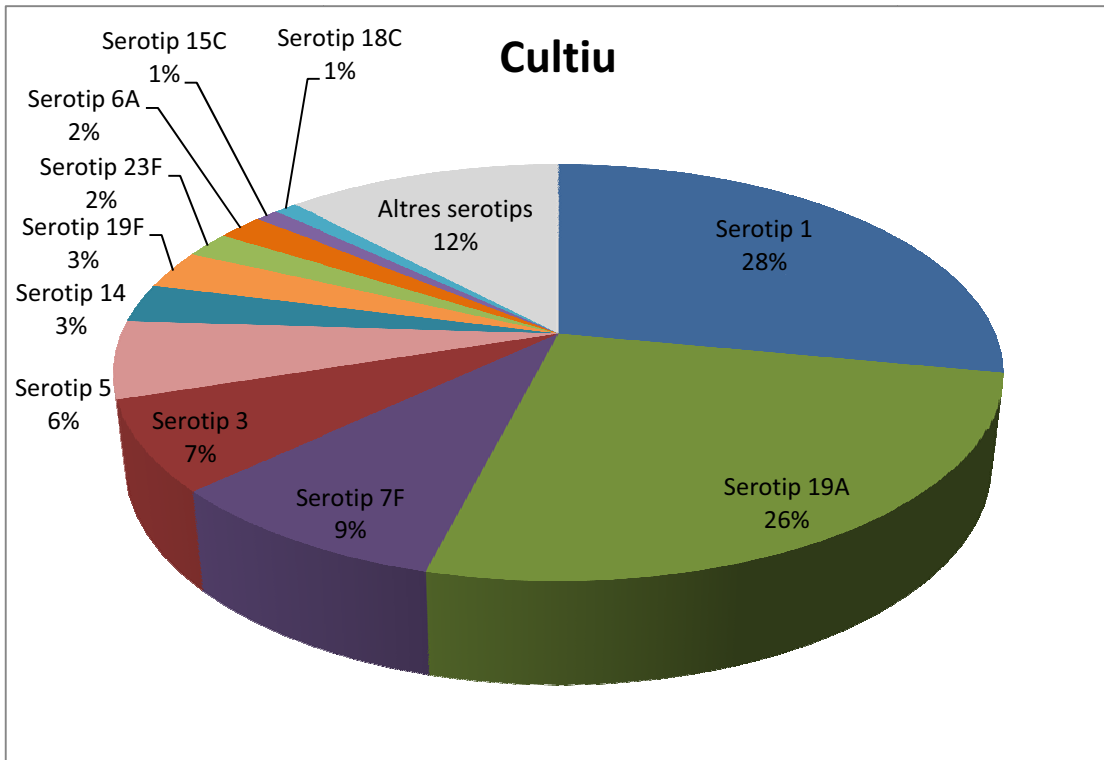
b Test de Fisher o Chi quadrat de Pearson comparant la distribució del diagnòstic microbiològic en cada presentació clínica respecte totes les presentacions clíniques.

**Taula 25.** Presentació clínica de la malaltia en els nens diagnosticats per cultiu microbiològic respecte aquells diagnosticats només per PCR en temps real.

### 5.1.2 Diferències de la distribució de serotips en pacients amb cultiu positiu respecte els pacients amb cultiu negatiu

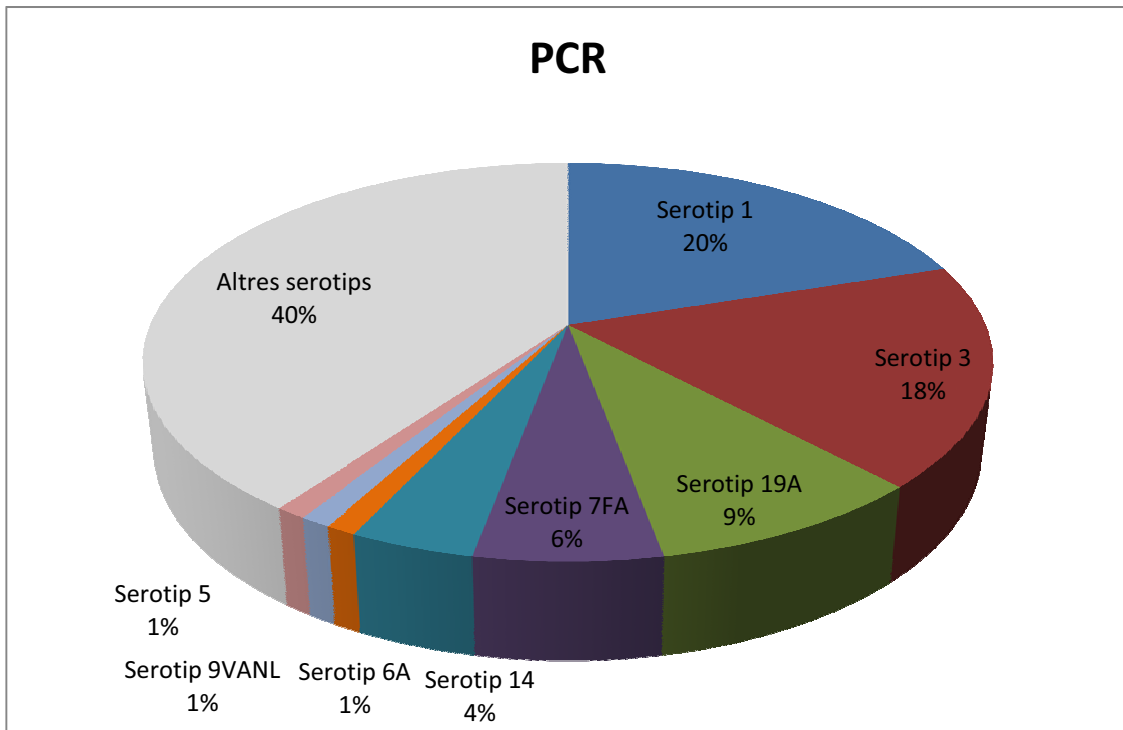
El 50% dels pacients identificats per cultiu i el 48% dels pacients identificats només per PCR en temps real havien estat ben vacunats amb la vacuna PCV7. Cap pacient havia rebut alguna dosi de les vacunes PCV10 o PCV13. Es van observar diferències significatives ( $p < 0.002$ ) en el rànquing dels principals serotips causants dels episodis de MPI identificats per cultiu respecte aquells identificats només per PCR en temps real.

Els cinc serotips més freqüents en el grup dels 86 episodis identificats per cultiu eren el serotip 1 (26.7%,  $n=23$ ), el serotip 19A (25.6%,  $n=22$ ), el serotip 7F (9.3%,  $n=8$ ), el serotip 3 (6.9%,  $n=6$ ) i el serotip 5 (5.8%,  $n=5$ ) mentre que en el grup dels 171 pacients diagnosticats només per PCR en temps real eren els serotips 1 (19.9%,  $n=34$ ), el serotip 3 (18.1%,  $n=31$ ), el serotip 19A (9.4%,  $n=16$ ), el serotip 7F (5.8%,  $n=10$ ) i el serotip 14 (4.1%,  $n=7$ ). Cal destacar que la taxa de serotip 3 detectat per PCR en temps real era significativament superior que la taxa d'aquest serotip per cultiu ( $p=0.01$ ). En les figures 20 i 21 es mostra la diferent distribució de serotips d'acord amb el diagnòstic per cultiu i per PCR en temps real, respectivament.



*Altres serotips: Correspon a la resta de serotips no detectats per PCR en temps real (1, 5, 19A, 19F/B/C, 14, 15B/C, 3, 7F/A, 4, 6A, 6B, 8, 9V/A/N/L, 18C/B, 23A, 23F).*

**Figura 20.** Distribució de serotips d'acord amb el diagnòstic microbiològic realitzat per cultiu.



*Altres serotips: Correspon a la resta de serotips no detectats per PCR en temps real (1, 5, 19A, 19F/B/C, 14, 15B/C, 3, 7F/A, 4, 6A, 6B, 8, 9V/A/N/L, 18C/B, 23A, 23F).*

**Figura 21.** Distribució de serotips d'acord amb el diagnòstic microbiològic realitzat per PCR en temps real.

Es van observar diferències en la proporció de serotips inclosos en les vacunes PCV7, PCV10 i PCV13 en els pacients identificats per cultiu respecte aquells identificats per PCR en temps real.

Els episodis de MPI causats per serotips inclosos en la PCV7 es van identificar només en un 10.5% dels pacients identificats per cultiu *versus* 5.3% dels pacients identificats per PCR en temps real ( $p=0.12$ ). Entre els casos identificats per cultiu i causats per serotips inclosos en la PCV7 ( $n=9$ ; 10.5%) només un nen (11%) havia rebut tres dosis de la vacuna PCV7 i entre els casos identificats per PCR i causats per serotips inclosos en la PCV7 ( $n=9$ ; 5.3%) tres nens (33%) havien rebut 1, 2 o 3 dosis de PCV7. La proporció dels serotips inclosos a la PCV10 va arribar fins al 52.3% en els pacients identificats per cultiu *versus* 31.6% dels pacients detectats només per PCR en temps real ( $p<0.002$ ). Els serotips inclosos a la PCV13 es van detectar en el 87.2% dels pacients diagnosticats per PCR en temps real ( $p<0.000$ ). En la figura 22 es mostra la potencial cobertura de les tres vacunes conjugades d'acord amb el diagnòstic per cultiu o només per PCR en temps real.

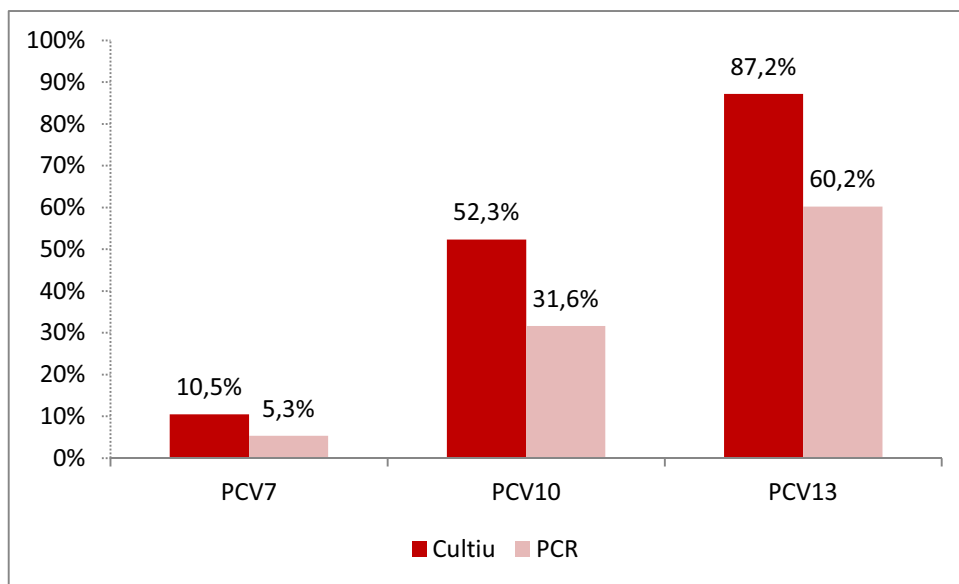


Figura 22. Cobertura de les diferents vacunes conjugades.

### 5.1.3 Diferències en la distribució de serotips d'acord amb l'edat i la tècnica microbiològica utilitzada per al diagnòstic

En general, els pacients identificats per cultiu eren significativament més petits que els identificats només per PCR en temps real (mitjana d'edat  $25.9 \pm 15$  *versus*  $33.4 \pm 14.1$  mesos).

Del total de pacients estudiats, 93 (36.2%) eren menors de 2 anys, dels quals 46 (49.5%; 38.7-60.2 IC 95%) es van identificar per cultiu i 47 (50.5%, 39.8-61.2 IC 95%) només per PCR en temps real. En el grup de pacients identificats per cultiu, el principal serotip detectat era el serotip 19A (16 pacients, 34.8%) mentre que en aquells pacients diagnosticats per PCR en temps real, era el serotip 3 (14 pacients, 29.8%).

Entre els pacients majors de 2 anys ( $n=164$ ) i menors de 5 anys, 40 es van identificar per cultiu (24.4%, 15.5-31.3 IC 95%) i 124 (75.6%, 68.7-82.5 IC 95%) només per PCR en temps real. El serotip 1 era el principal serotip en els pacients detectats per cultiu (20 pacients, 50%) i per PCR en temps real (32 pacients, 25.8%). El segon serotip més prevalent era el serotip 19A entre els pacients identificats per cultiu (6 pacients, 15%) i el serotip 3 entre els pacients identificats per PCR en temps real (17 pacients, 13.7%).

### 5.1.4 Diferències en la distribució dels serotips en pacients amb pneumònia d'acord amb la tècnica microbiològica utilitzada pel diagnòstic

Respecte als episodis de pneumònia, es van observar diferències estadísticament significatives ( $p<0.001$ ) en la distribució de serotips de les mostres. Vint-i-tres de 57 episodis (68.4%) identificats per cultiu, estaven causats pels serotips 1 (40.3%) i 19A (28%). En aquest grup, el serotip 3 es va detectar només en 5 pacients (8.7%). No obstant, en els 162 episodis identificats només per PCR, el segon serotip més prevalent causant de MPI era el serotip 3 (19.1%, 31 pacients). El serotip 1 i el serotip 19A es van detectar en 34 (20.9%) i 14 (9.2%) episodis, respectivament. A destacar, 63 (38.9%) pacients estaven infectats amb altres serotips diferents dels 24 serotips testats amb la PCR en temps real (1, 5, 19A, 19F/B/C, 14, 15B/C, 3, 7F/A, 4, 6A, 6B, 8, 9V/A/N/L, 18C/B, 23A, 23F).

### 5.1.5 Diferències en la distribució de serotips d'acord amb la teràpia antibiòtica prèvia i la tècnica microbiològica utilitzada pel diagnòstic

Del total de pacients estudiats, 83 (32.3%) havien rebut tractament antibiòtic previ. En aquest grup de pacients, només 13 (15.3%) van mostrar resultats positius en el cultiu microbiològic mentre que en 172 (66.9%) pacients sense teràpia antibiòtica prèvia el cultiu va ser positiu en 72 (41.9%) d'ells. Aquesta diferència és estadísticament significativa ( $p < 0.000$ ). En dos pacients, la informació sobre la teràpia antibiòtica prèvia no estava disponible.

Es van detectar diferències significatives ( $p = 0.02$ ) en la distribució de serotips en els pacients exposats a teràpia antibiòtica prèvia d'acord amb la tècnica microbiològica utilitzada per al diagnòstic (Taula 26). Del total de pacients que havien rebut teràpia antibiòtica prèvia i diagnosticats per cultiu ( $n = 13$ ), el principal serotip detectat era el serotip 19A (6 mostres, 46.2%) seguit dels serotips 1 i 5 (2 mostres, 15.4% per cada serotip). No obstant, entre el total de pacients exposats a teràpia antibiòtica prèvia i diagnosticats per PCR en temps real ( $n = 70$ ), el rànquing de serotips detectats era el serotip 1 (14 mostres, 20.0%), el serotip 3 (12 mostres, 17.1%) i el serotip 19A (7 mostres, 10%) ( $p = 0.02$ ).

En el grup de pacients no exposats a teràpia antibiòtica prèvia amb cultiu positiu ( $n = 72$  pacients), el serotip 1 era el més freqüent (21 mostres, 29.2%) seguit del serotip 19A (16 mostres, 22.2%) i el serotip 7F (7 mostres, 9.7%). Pel contrari, en els 100 episodis dels pacients sense exposició prèvia a antibiòtics i diagnosticats només per PCR en temps real, els principals serotips detectats eren el serotip 1 (20 mostres, 20%), seguit del serotip 3 (19 mostres, 19%) i el serotip 19A (9 mostres, 9%) ( $p = 0.02$ ).



Serotips	Pacients exposats a teràpia antibiòtica prèvia		Pacients no exposats a teràpia antibiòtica prèvia	
	n (%)		n (%)	
	Pacients diagnosticats per cultiu	Pacients diagnosticats per PCR	Pacients diagnosticats per cultiu	Pacients diagnosticats per PCR
1	2 (15.4)	14 (20)	21 (29.2)	20 (20)
19A	6 (46.2)	7 (10)	16 (22.2)	9 (9)
5	2 (15.4)	1 (1.4)	3 (4.2)	0 (0.0)
3	0 (0.0)	12 (17.1)	6 (8.3)	19 (19)
7F	1 (7.6)	5 (7.1)	7 (9.7)	5 (5)
14	0 (0.0)	2 (2.9)	3 (4.2)	5 (5)
6A	0 (0.0)	1 (1.4)	2 (2.8)	1 (1)
19F	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (4.2)	0 (0.0)
23F	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (2.8)	0 (0.0)
9V	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (2)
15C	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.4)	0 (0.0)
18C	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.4)	0 (0.0)
Altres serotips <sup>a</sup>	2 (15.4)	28 (40)	7 (9.45)	39 (39)
Total	13 (100)	70 (100)	72 (100)	100 (100)

*a Altres serotips: Correspon a la resta de serotips no detectats per PCR en temps real (1, 5, 19A, 19F/B/C, 14, 15B/C, 3, 7F/A, 4, 6A, 6B, 8, 9V/A/N/L, 18C/B, 23A, 23F).*

**Taula 26.** Distribució de serotips d'acord a l'exposició prèvia a teràpia antibiòtica i la tècnica microbiològica utilitzada per al diagnòstic dels pacients estudiats.

## 5.2 Estudi 2:

### 5.2.1 Soques control

D'acord amb el procediment explicat en l'apartat 4.2.4.1 sobre la preparació de les soques control a partir de les dilucions decimals de les suspensions de cadascuna de les soques inoculades en sang humana procedent d'individus voluntaris, a la taula 27 es mostra el resultat de la PCR en temps real dels gens específics per a detectar el serotip de les mostres de sang inoculades en paper de filtre (DBS) i de la sang en fresc de les diferents dilucions 1:10.

#### (A) Dried-blood spot (DBS)

Dilució	Concentració en sang	Serotip								
	UFC/ml	1	5	19A	19F	14	3	7F	4	6A
A	100000	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
B	10000	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
C	1000	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	Ct>40
Dilució	Concentració en sang	Serotip								
	UFC/ml	6B	8	9N	18C	23A	23F			
A	100000	POS	POS	POS	POS	POS	POS			
B	10000	POS	POS	POS	POS	POS	POS			
C	1000	POS	Ct>40	POS	POS	POS	POS			

#### (B) Sang en fresc

Dilució	Concentració en sang	Serotip								
	UFC/ml	1	5	19A	19F	14	3	7F	4	6A
A	100000	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
B	10000	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
C	1000	POS	POS	POS	POS	POS	Ct>40	POS	POS	POS
Dilució	Concentració en sang	Serotip								
	UFC/ml	6B	8	9N	18C	23A	23F			
A	100000	POS	POS	POS	POS	POS	POS			
B	10000	POS	POS	POS	POS	POS	POS			
C	1000	POS	POS	POS	POS	POS	POS			

Taula 27. Resultat de la PCR en temps real dels gens específics per a detectar el serotip de les mostres (A) de sang inoculades en paper de filtre (DBS) i de la sang (B) en fresc de les dilucions 1:10. Nota: POS, Positiu; Ct>40; Detecció en un Ct superior a 40.

A la taula 28 es mostra la sensibilitat de la PCR en temps real dels gens de la pneumolisina (*ply*), el gen capsular *wzg* i els gens específics per a detectar el serotip de les mostres de sang inoculades en paper de filtre (DBS) i de la sang en fresc de les dilucions seriades de les 15 soques control.

	Dilucions seriades detectades (CFU equivalents / reacció PCR)	
	Sang en fresc	Dried Blood Spot
Gen <i>ply</i>	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>
Gen <i>wzg</i>	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>
Serotip 1	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>
Serotip 5	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>
Serotip 19A	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>
Serotip 19F/B/C	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>
Serotip 14	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>
Serotip 3	1.10 <sup>2</sup> -1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>
Serotip 7F/A	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>
Serotip 4	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>
Serotip 6A	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>2</sup> -1.10 <sup>3</sup>
Serotip 6B	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>
Serotip 8	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>2</sup> -1.10 <sup>3</sup>
Serotip 9N	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>
Serotip 18C	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>
Serotip 23A	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>
Serotip 23F	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>1</sup> -1.10 <sup>3</sup>

10 UFC equivalent / reacció PCR = 1000 UFC equivalent / ml de sang

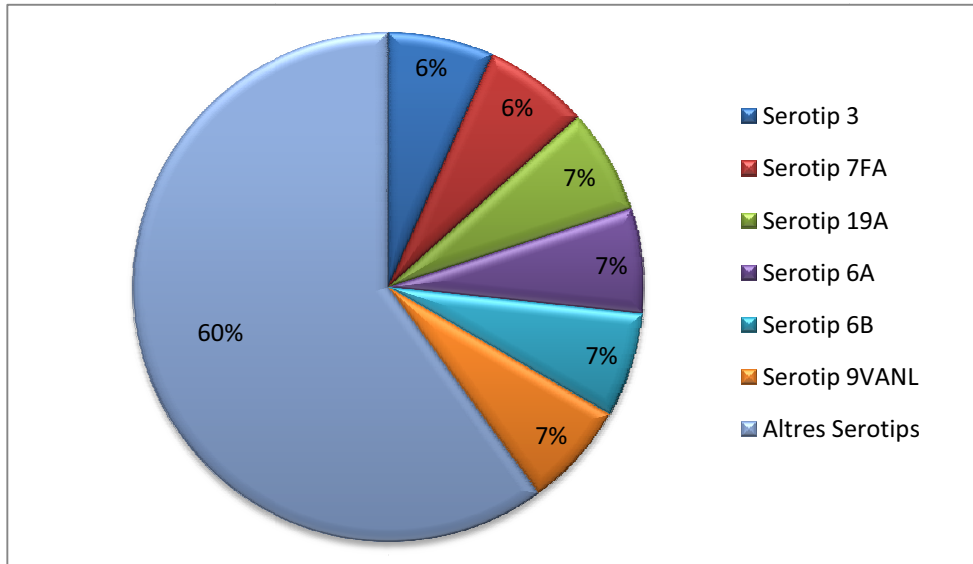
**Taula 28.** Sensibilitat de la PCR en temps real dels gens de la pneumolisina (*ply*), el gen capsular *wzg* i els gens específics per a detectar el serotip de les mostres de sang inoculades en paper de filtre (DBS) i de la sang en fresc de les dilucions seriades de les 15 soques control.

### 5.2.2 Distribució de serotips en una població de pacients pediàtrics atesos en un hospital de Sierra Leone.

En referència als 25 pacients (11 nenes, 14 nens) pediàtrics de Sierra Leone amb sospita de MPI atesos a l'hospital St. John of God, la mitjana d'edat era de 25.7 mesos (rang de 15 dies a 96 mesos) i tots ells tenien un sospita de MPI (febre sense focus o pneumònia). Setze dels 25 pacients estaven infectats amb malària.

Del total de mostres estudiades, un 60% van mostrar un resultat positiu en la PCR en temps real dels gens de la pneumolisina (*ply*) i *wzg*, per tant, es van considerar casos confirmats de MPI.

Les mostres amb un resultat positiu pels gens de la *ply* i el *wzg* es van serotipar mitjançant la PCR múltiplex a temps real. En 6 de les 15 mostres positives es va detectar un serotip inclòs a la vacuna PCV13: 3, 7FA, 19A, 6A, 6B, 9VANL. Les 9 mostres restants amb un resultat positiu pels gens de la *ply* i el *wzg* no es van poder serotipar mitjançant la PCR en temps real (Figura 23).



**Figura 23.** Resultat del serotipat de les 15 mostres de sang seca positives per *S. pneumoniae*. Altres serotips: Correspon a la resta de serotips no detectats per PCR en temps real (1, 5, 19A, 19F/B/C, 14, 15B/C, 3, 7F/A, 4, 6A, 6B, 8, 9V/A/N/L, 18C/B, 23A, 23F).

### 5.3 Estudi 3

#### 5.3.1 Prevalença de *psrP* en es aïllats clínics de pacients amb MPI i de portadors sans

D'un total de 358 soques invasives disponibles a la nostra col·lecció durant el període d'estudi, 6 soques no van ser viables i es van excloure de l'estudi. Per tant, es van estudiar un total de 352 soques invasives i 89 soques aïllades de portadors sans (total de 441 soques).

A la taula 29 es mostra la prevalença de *psrP* en les soques de pneumococ d'acord amb el diagnòstic clínic, el serotip i el tipus clonal estudiat.

Es va detectar el *psrP* en 231 (52.4%) de les soques de pneumococ estudiades. No es van observar diferències significatives en comparar la prevalença de *psrP* en les soques de portadors (43 de 89 soques; 48.3%) amb les soques invasives (188 de 352 soques; 53.4%) ( $p=0.4$ ). No obstant, es va observar una forta tendència quan es va comparar la prevalença de *psrP* en les soques aïllades de pacients amb pneumònia (125 de 209 soques; 59.8%) amb els portadors sans ( $p=0.067$ ). La prevalença més baixa de *psrP* es va trobar en les soques aïllades de nens amb bacterièmia (29 de 76 soques; 38.2%).

Del total de pacients amb pneumònia, es va detectar *psrP* en 62 de 104 (59.6%) soques causants de pneumònia no complicada (*versus* soques colonitzants;  $p=0.1$ ) i en 63 de 105 (60%) de les soques aïllades de pacients amb empiema parapneumònic (*versus* soques colonitzants;  $P=0.19$ ). Aquest fet, d'acord amb el paper del *psrP* com a adhesina de les cèl·lules pulmonars, *psrP* és més freqüent en les soques aïllades de pacients amb pneumònia que en soques aïllades de portadors sans, tot i que no de manera estadísticament significativa, s'observa una major prevalença en les soques aïllades de pacients amb pneumònia que en aquelles causants de bacterièmia ( $p=0.001$ ). Es va observar una distribució de *psrP* depenent de l'edat en les mostres clíniques de pacients amb MPI. Es va detectar *psrP* en 76 de 175 (46.1%) de les soques aïllades en nens amb MPI menors de 24 mesos, mentre que en nens més grans, aquesta ràtio era significativament superior: 112 de 187 (59.9%) ( $p=0.001$ ).

Grup estudi i diagnòstic clínic	N soques positives psrP/N total soques (%)	Serotip		Tipus clonal	
		Principal serotip	N soques positives psrP/N total soques (%)	Principal ST	N soques positives psrP/N total soques (%)
Pacients MPI	188/352 (53.4)	1	84/104 (80.8)	CC306 ST304	82/82 (100) 1/18 (5.5)
Pneumònia	125/209 (59.8)	19A	15/36(41.7)	CC320	2/9 (22.2)
				ST2013	2/7 (28.5)
		5	15/20 (75)	ST1201	5/5 (100)
		7F	2/13 (15.3)	CC289	15/20 (75)
		Altres <sup>a</sup>	9/36 (25)	ST191	2/12 (16.6)
Bacterièmia	29/76 (3.2)	19A	12/20 (60)	ST1201	7/7 (100)
				ST320	0/4 (0)
		7F	0/9 (0)	ST191	0/9 (0)
		14	0/5 (0)	CC156	0/2 (0)
		19F	3/5 (60)	CC177	2/2 (100)
		Altres <sup>b</sup>	14/37 (37.8)		
Meningitis	25/49 (51)	19A	5/8 (62.5)	CC199	2/2 (100)
				CC230	0/2 (100)
		19F	4/5 (80)	CC177	2/2 (100)
		6A	2/4 (50)	ST1692	1/2 (50)
		7F	1/3 (33.3)	ST191	1/3 (33.3)
		Altres <sup>c</sup>	13/29 (44.8)		
Altres síndromes clínics <sup>d</sup>	9/18 (50)	19A	2/4 (50)	CC230	0/1 (0)
				ST320	0/1 (0)
		1	2/2 (100)	CC306	2/2 (100)
		19F	1/2 (50)	ST2948	1/1 (100)
		23F	0/2 (0)	ST109	0/1 (0)
		Altres <sup>e</sup>	4/8 (50)		
Portadors sans	43/89 (48.3)	19A	6/9 (66.6)	CC199	2/2 (100)
				CC202	1/2 (50)
		6A	6/9 (66.6)	CC97	1/1 (100)
				ST1143	1/1 (100)
		19F	5/7 (71.4)	CC177	2/2 (100)
		15B	4/6 (66.7)	ST101	1/2 (50)
		23B	1/6 (16.7)	ST2372	0/1 (0)
		6B	2/5 (40)	ST386	1/1 (100)
		9V	1/5 (20)	CC156	0/1 (0)
		Altres <sup>f</sup>	18/42 (42.8)		

a Altres serotips en pneumònia: S14 (n=9); S3 (n=6); S24F/B (n=6); S6A (n=3); S6B (n=3); S9V (n=3); i S10A, S15B, S18C, S2, S38, i S4 (n=1 de cada).

b Altres serotips en bacterièmia: S1 (n=4); S3 (n=4); S5 (n=4); 23B (n=3); S38 (n=3); S6A (n=3); S10A (n=2); S15B (n=2); S23F (n=2); S34 (n=2); i S12F, S18C, S21, S22F, S24F, S27, S35B, i S4 (n=1 de cada).

c Altres serotips en meningitis: S15C, S18C, S22, S23B, S23F, S3, S5, S6BS, i 24F (n=2 de cada) i S1, S10A, S12F, S13, S14, S15A, S16, S16F, S27, S31, i S9N (n=1 de cada).

d Altres síndromes clínics: artritis (n=11), apendicitis (n=5), pericarditis (n=1), i peritonitis (n=1).

e Altres serotips en altres síndromes clínics: S14, S28, S35B, S38, S4, S5, S6A, i S7F (n=1 de cada).

f Altres serotips en portadors sans: S21 (n=4); S23F (n=4); S10A (n=3); S15A (n=3); S23A (n=3); S3 (n=3); S1 (n=2); S15C (n=2); S24 (n=2); S29 (n=2); S35B (n=2); S37 (n=2); i S10, S11, S16, S17, S28, S31, S38, S37, 7F, i 9N (n=1 de cada).

**Taula 29.** Prevalença de psrP en soques de pneumococ aïllades en pacients amb MPI i en portadors sans.

Específicament, la prevalença de *psrP* en els aïllats de pneumònia de nens menors de 24 mesos era del 49.3% (36 de 73 soques) i en soques de nens més gran serà del 65.4% (89 de 136 soques) ( $p=0.02$ ). A més a més, en soques aïllades de pacients més grans, aquesta prevalença de *psrP* del 65.4% era significativament superior que en les soques aïllades de pacients amb MPI però amb una altra manifestació clínica diferent de la pneumònia (56 de 116; 48.3%;  $p=0.006$ ) i que en les soques de portadors (33 de 65; 56.8%;  $p=0.04$ ).

### 5.3.2 Prevalença de *psrP* d'acord amb el serotip.

Un total de 37 serotips diferents es van detectar entre les soques aïllades de pacients amb MPI i 29 entre els portadors sans. Es van observar diferències significatives en la prevalença de *psrP* d'acord amb el serotip de les soques ( $p<0.0001$ ). La figura 24 mostra la distribució de *psrP* d'acord amb el serotip (es mostren els serotips detectats en més de 5 soques). En alguns serotips epidèmics, es va detectar *psrP* en un percentatge molt elevat, com el serotip 1 (91 de 113 soques; 80.5%) i el serotip 5 (22 de 27 soques; 81.5%). Pel contrari, en altres serotips es va detectar *psrP* en un percentatge molt baix, com el serotip 3 (2 de 15 soques; 13.3%), el serotip 7F (4 de 27 soques; 14.8%) i el serotip 14 (1 de 16 soques; 6.3%). La prevalença de *psrP* en el serotip 19A, un serotip emergent en l'àrea geogràfica on es van recollir les mostres incloses en l'estudi, era del 51.9% (40 de 77 soques).

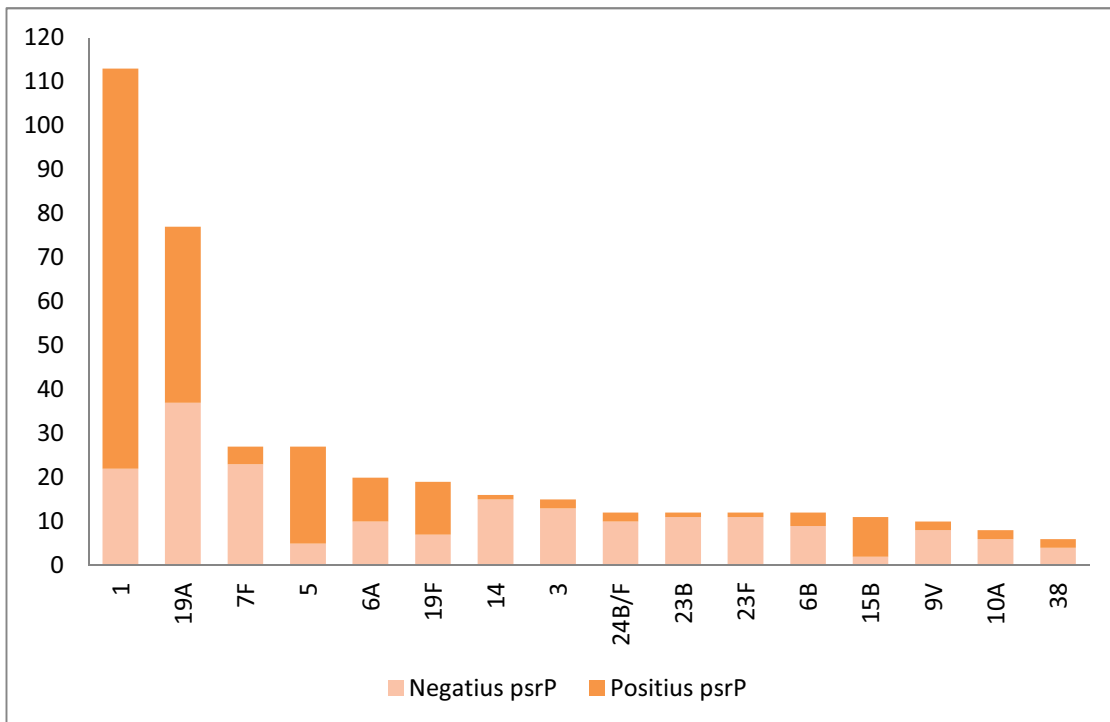


Figura 24. Prevalença de *psrP* d'acord amb el serotip en grups de més de cinc aïllats.

Cal destacar, que la prevalença de *psrP* en els serotips inclosos a la vacuna PCV7 (26 de 70 soques; 37.1%) era significativament menor que en els serotips no vacunals (205 de 371 soques; 55.3%) ( $p=0.006$ ). Pel contrari, en el context de les noves vacunes conjugades PCV10 i PCV13, la diferència entre els serotips vacunals i no vacunals va canviar. Per exemple, en la vacuna PCV10, un percentatge elevat de *psrP* es va detectar en els tipus vacunals 143 de 237 (60.3%) respecte els serotips no inclosos a la vacuna, 88 de 204 (43.1%) ( $P<0.0001$ ). En el cas de la vacuna PCV13, es va detectar *psrP* en 195 de 349 (55.9%) de les soques dels serotips inclosos a la PCV13 i en 36 de 92 (39.1%) del serotips no inclosos ( $p=0.004$ ).

### 5.3.3 Prevalença de *psrP* d'acord amb la sensibilitat antibiòtica de les soques

Es va estudiar la sensibilitat antibiòtica de 432 soques del total de 441 soques estudiades (98%). En general, es va observar una correlació positiva en la prevalença de *psrP* i la sensibilitat antibiòtica. La prevalença de *psrP* en les soques sensibles a penicil·lina en nens amb MPI era del 64.5% (171 de 265 soques) mentre que era només del 15.2 % (12 de 79 soques) en les soques no sensibles ( $p<0.0001$ ). El mateix patró s'observa per la cefotaxima, tetraciclina i eritromicina (Taula 30). *psrP* era absent en gairebé totes les soques amb elevada resistència a penicil·lina o cefotaxima, es va detectar *psrP* només en 2 (10%) de 20 soques amb una CMI de penicil·lina superior o igual a 2µg/ml i en cap de les 6 soques amb una CMI de cefotaxima superior o igual a 2µg/ml. No es van observar diferències significatives en la prevalença de *psrP* d'acord amb les sensibilitats antibiòtiques de les soques aïllades de portadors nasofaringis.

### 5.3.4 Prevalença de *psrP* d'acord amb el tipus clonal

Es va realitzar l'estudi clonal del 84% de les soques incloses a l'estudi (372 de 441 soques). Es va detectar un total de 94 ST diferents que es van agrupar en 17 complexes clonals i 52 SLVs. La prevalença general de *psrP* a la col·lecció era del 54.8% (204 de 372).

Es va observar una diferència significativa en la prevalença de *psrP* d'acord amb el tipus clonal ( $p<0.0001$ ). La presència o absència de *psrP* estava estretament relacionada amb un genotip en concret i no amb el serotip. La figura 25 mostra la freqüència relativa de *psrP* entre els genotips detectats en més de 5 soques. En general, es va detectar *psrP* en les 89 soques (100%) corresponents al CC306 (totes les soques expressaven un serotip 1) i pel contrari, era absent en el 18 de 19 soques



(5.3%) del serotip 1 pertanyents al ST304. De forma similar, totes les 15 soques pertanyents al ST1201 i totes les soques del CC199 (totes expressant el serotip 19A) eren positives per *psrP*. Pel contrari, el 100% de les 9 soques serotip 19A pertanyents al clon multiresistent ST320 i el 87% de les 23 soques pertanyents al complex clonal multiresistent CC320 (16 soques de serotip 19A i 7 del serogrup 24) eren negatives per *psrP*. Altres clons amb una elevada prevalença de *psrP* eren el CC177 (7 de 7 soques) i el CC289 (21 de 26 soques).

Grup d'estudi, antibiòtic i CMI	n soques positives <i>psrP</i> /n total soques (%)	p
MPI		
Penicil·lina CMI≤0.06 µg/ml CMI≥0.12 µg/ml	171/265 (64.5) 12/79 (15.2)	<0.000
Cefotaxima CMI≤0.5 µg/ml CMI=1 µg/ml CMI≥2 µg/ml	180/307 (58.6) 3/31 (9.7) 0/6 (0)	<0.000
Eritromicina CMI≤0.25 µg/ml CMI=0.5 µg/ml CMI≥1 µg/ml	162/267 (60.7) 0/0 21/77 (27.3)	<0.000
Tetraciclina CMI≤2 µg/ml CMI=4 µg/ml CMI≥8 µg/ml	160/262 (61.1) 1/1 21/78 (26.9)	<0.000
Portadors sans		
Penicil·lina CMI≤0.06 µg/ml CMI≥0.12 µg/ml	33/61 (54.1) 9/27 (33.3)	0.10
Cefotaxima CMI≤0.5 µg/ml CMI=1 µg/ml CMI≥2 µg/ml	38/76 (50) 3/10 (30) 1/2 (50)	0.49
Eritromicina CMI≤0.25 µg/ml CMI=0.5 µg/ml CMI≥1 µg/ml	30/62 (48.4) 0/0 12/26 (46.2)	1
Tetraciclina CMI≤2 µg/ml CMI=4 µg/ml CMI≥8 µg/ml	34/65 (52.3) 0/0 8/23 (34.8)	0.22

**Taula 30.** Prevalença de *psrP* d'acord amb la resistència antibiòtica (punts de tall meningis) en les soques aïllades amb pacients amb MPI i en portadors sans.

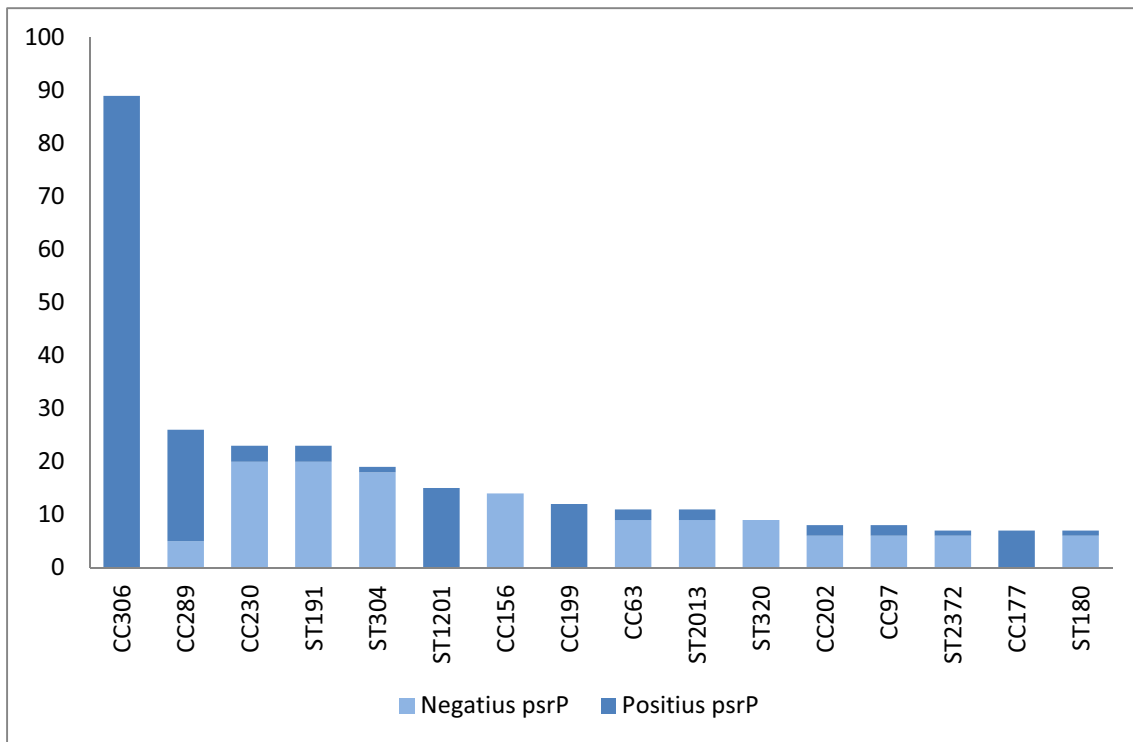


Figura 25. Prevalença de *psrP* d'acord amb el tipus clonal en grups de més de cinc aïllats.

## 5.4 Resultats addicionals

Del total de 461 soques de pneumococ aïllades en pacients amb MPI disponibles a la nostra col·lecció durant el període d'estudi, tres no es van poder recuperar i es van excloure de l'estudi. Per tant, es van incloure un total de 458 soques invasives i 89 soques aïllades de portadors nasofaringis sans (total de 547 soques).

Les síndromes clíniques van ser: 257 pneumònies (111 d'ells amb empiema), 114 bacterièmies, 68 meningitis, 13 artritis, 4 apendicitis, 1 peritonitis i 1 pericarditis. Els serotips més freqüents detectats entre les soques aïllades de pacients amb MPI eren els serotips 1 (n=134), 19A (n=84), 7F (n=35), 5 (n=34) i 14 (n=19). Entre els portadors, els serotips més freqüents detectats van ser el serotip 19A (n=9), 6A (n=9), 19F (n=7), 15B (n=6) i 23B (n=6).

Entre les soques aïllades de pacients amb MPI, la prevalença del serotips inclosos a les vacunes comercialitzades PCV7, PCV10 i PCV13 era del 14.2% (65 soques), 58.3% (267 soques) i 83.6% (383 soques), respectivament. La prevalença dels serotips inclosos en aquestes tres vacunes entre les soques aïllades de portadors sans era del 23.6% (21 soques), 27% (24 soques) i 50.6% (45 soques).

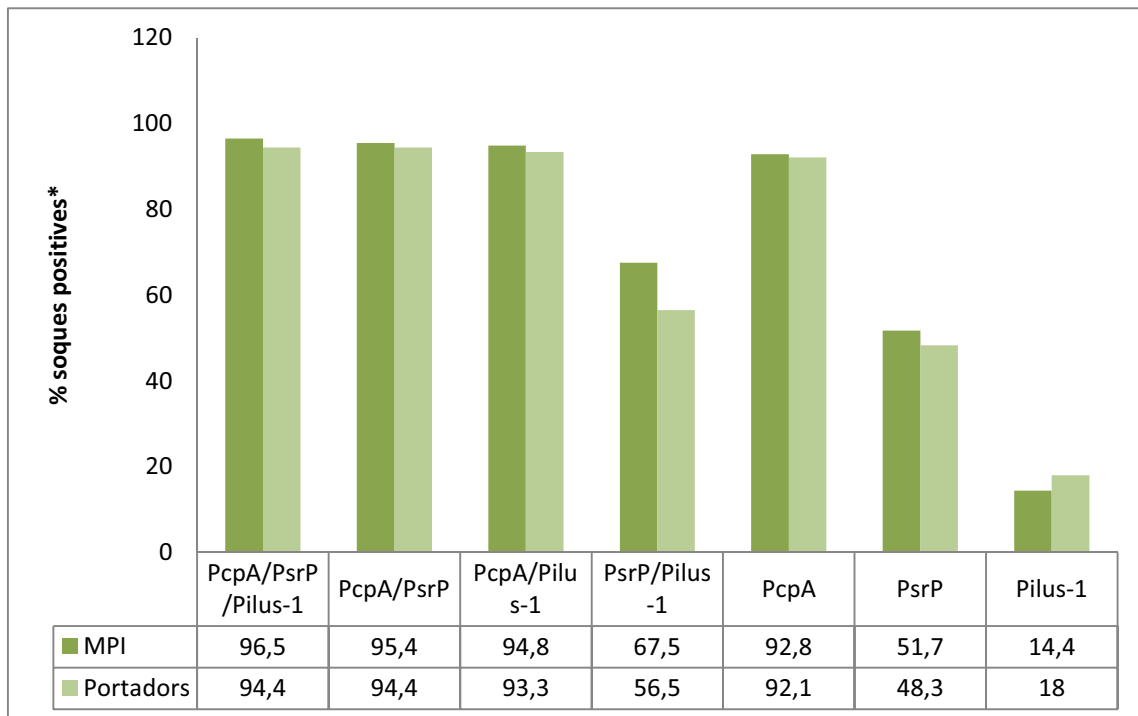
Respecte a les propietats clonals els clons més freqüents detectat entre les soques invasives eren ST306 (n=107), ST191 (n=31), ST1223 (n=25), ST304 (n=22), ST276 (n=17). En els portadors es va detectar una gran varietat de clons (56 clons diferents en 89 soques), el més freqüent el ST2372 (n=5), ST97 (n=4), ST42 (n=3), ST180 (n=3), ST838 (n=3) i ST2690 (n=3).

L'estudi de sensibilitat antibiòtica es va realitzar en 543 de 547 soques amb 134 (24.5%) soques que presentaven sensibilitat disminuïda a penicil·lina (CMI $\geq$ 012). El percentatge de soques amb sensibilitat disminuïda a penicil·lina era del 23.4% (107 de 454 soques) entre les soques invasives i del 30.3% (27 de 89 soques) entre els portadors sans.

### 5.4.1 Prevalença general de *pcpA*, *psrP* i *pilus-1*.

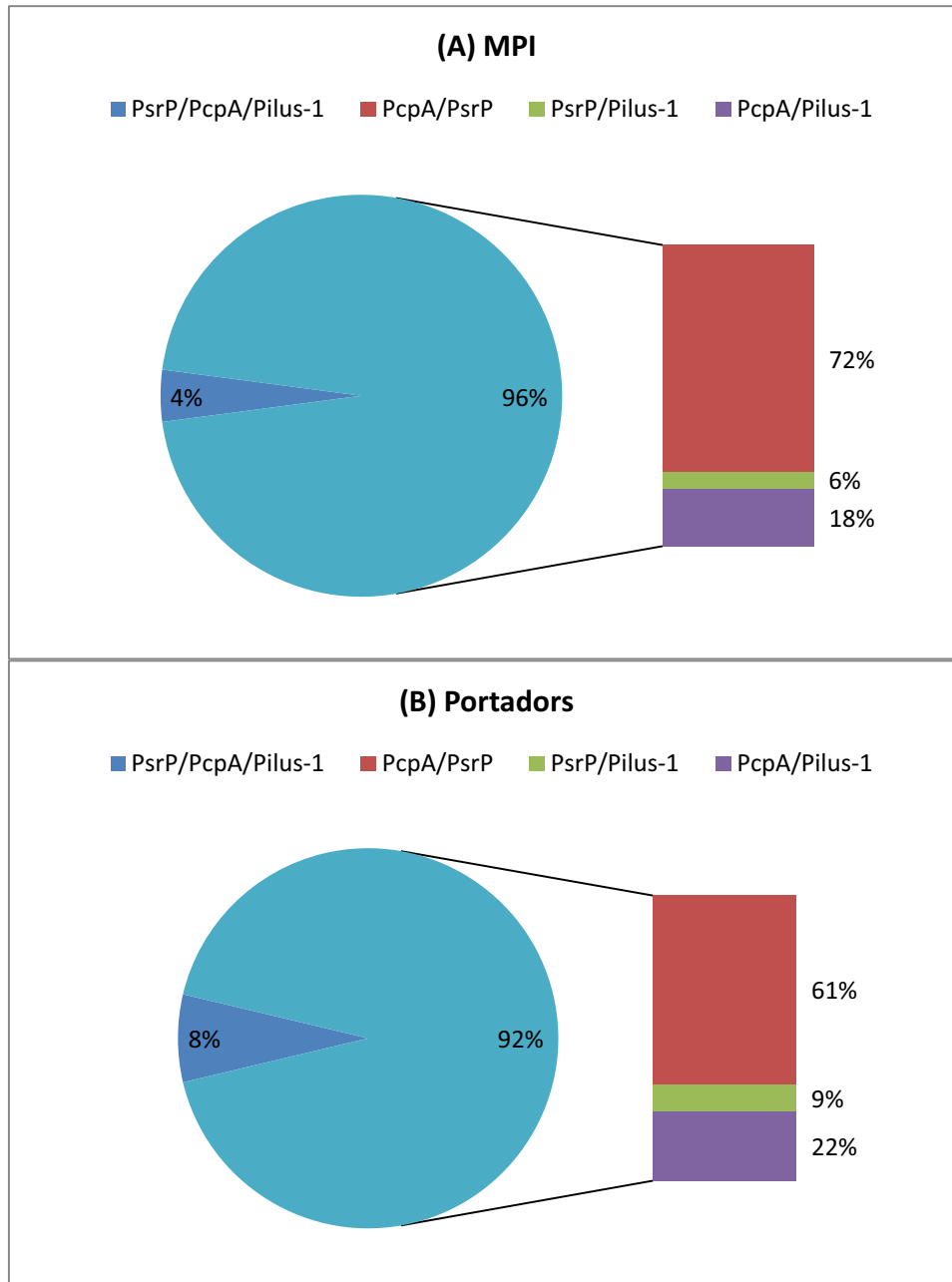
La prevalença de *pcpA*, *psrP* i *pilus-1* en les 547 soques de la col·lecció estudiada era del 92.7%, 51.2% i 15%, respectivament, sense diferències significatives entre les soques invasives i les soques dels portadors sans: per *pcpA* 92.8% *versus* 92.1%;  $p=0.8$ , per *psrP* 51.7% *versus* 48.3%;  $p=0.5$  i pel *pilus-1* 14.4% *versus* 18%;  $p=0.3$ , respectivament. Donada l'elevada prevalença de *pcpA*, la cobertura potencial de com

a mínim una proteïna en una vacuna proteica multivalent incloent aquests tres candidats seria: 96.5% entre les soques invasives (442 de 458 soques) i 94.4% entre els portadors (84 de 89 soques). La figura 26 mostra la prevalença de cada proteïna per separat i en combinació en almenys una de les combinacions específiques (PcpA/Psrp/Pilus-1, PcpA/PsrP, PcpA/Pilus-1 i PsrP/Pilus-1). En particular, a la figura 27 es mostra que el 96% de les soques aïllades de pacients amb MPI contien dues de les tres proteïnes, i en el cas de les soques aïllades de portadors, el 92%. De la mateixa manera, el 6% de totes les soques contien les tres proteïnes (el 4% i 8% de les soques invasives i de portadors, respectivament). Així, la majoria del pacients vacunats amb una vacuna composta d'aquets tres antígens tindria anticossos per almenys dues de les tres proteïnes.



\*Entre les combinacions, els aïllament amb almenys una de les tres proteïnes

Figura 26. Prevalença de pcpA, psrP i pilus-1.



**Figura 27.** Prevalença de *pcpA*, *psrP* i pilus-1 de les soques que contenen les tres proteïnes i dues de les possibles combinacions de proteïnes incloent PcpA/PsrP, PsrP/Pilus-1, PcpA/Pilus-1 entre les soques aïllades de pacients amb MPI (A) i en els portadors sans (B).

#### 5.4.2 Prevalença de *pcpA*, *psrP* i pilus-1 d'acord amb la síndrome clínica i la sensibilitat antibiòtica.

La prevalença de PcpA entre totes les soques era massa elevada per poder establir qualsevol tipus de correlació amb alguna condició clínica. Pel contrari, la prevalença de *psrP* era significativament superior en pacients amb pneumònia no complicada (58.2%;  $p < 0.001$ ) o empiema (59.5%;  $p < 0.001$ ) que en nens amb bacterièmia (40.4%).

Mentre que la prevalença del pilus-1 era superior en pacients amb bacterièmia que en pacients amb pneumònia complicada (22.8% versus 11.7%; p=0.03) (Figura 28).

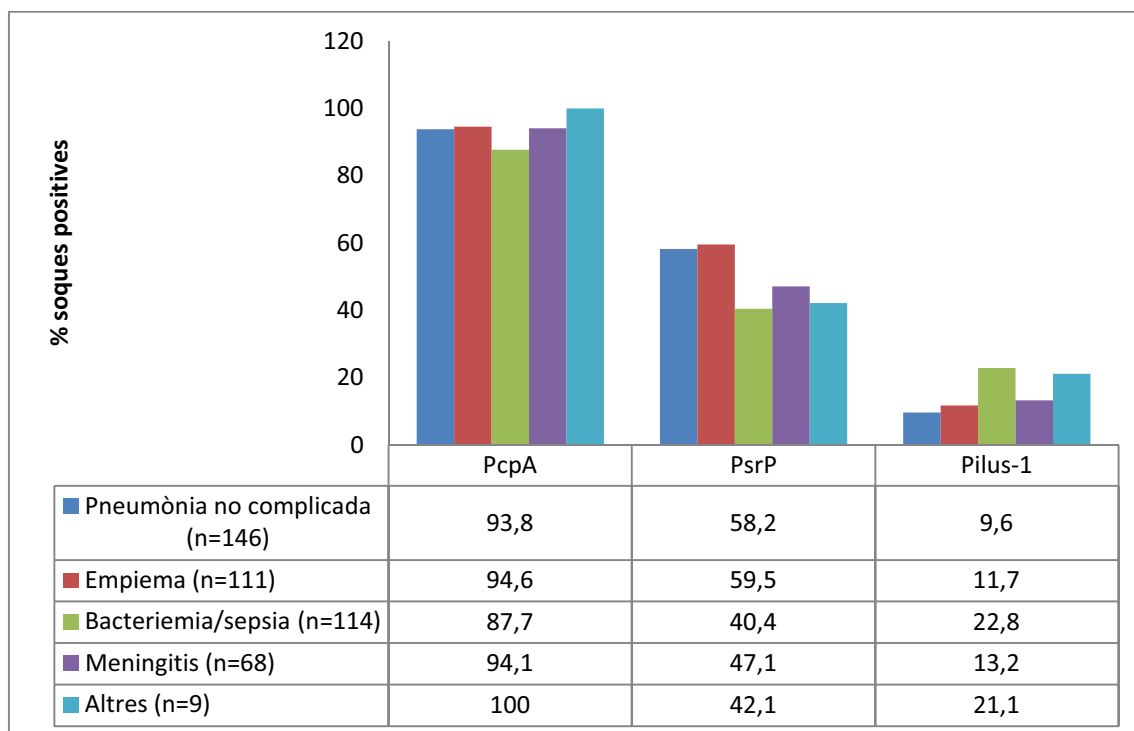


Figura 28. Prevalença de *pcpA*, *psrP* i pilus-1 d'acord amb el síndrome clínic entre les soques aïllades de pacients amb MPI.

Agent antimicrobià			PcpA		PsrP		Pilus-1	
CMI	n soques	%	% de positius	p	% de positius	p	% de positius	p
<b>Penicil·lina</b>								
≤ 0.06	409	75.3	90.2	<.000	62.6	<.000	8.8	<.000
≥ 0.12	134	24.7	100		17.9		34.3	
<b>Cefotaxima</b>								
≤ 0.5	482	88.8	91.7	0.01	56.4	<.000	9.3	<.000
≥ 1	61	11.2	100		13.1		60.7	
<b>Eritromicina</b>								
≤ 0.25	415	76.4	90.6	0.001	58.3	<.000	10.8	<.000
≥ 0.5	128	23.6	99.2		29.7		28.9	
<b>Tetraciclina*</b>								
≤ 2	409	75.9	91.4	0.07	58.9	<.000	11.2	0.001
≥ 4	130	24.1	96.2		28.5		27.7	
<b>Cloramfenicol**</b>								
≤ 4	515	95.2	92.8	0.4	50.7	0.02	15.7	0.09
≥ 8	26	4.8	88.5		73.1		3.8	

L'estudi no va ser viable en quatre\* i sis\*\* soques

Taula 31. Prevalença de *pcpA*, *psrP* i pilus-1 d'acord amb la sensibilitat antibiòtica.

També es van observar diferències estadísticament significatives en la prevalença de *psrP* i pilus-1 en funció de l'agent antimicrobià testat (Taula 31). En general, *psrP* era significativament més freqüent soques sensibles a penicil·lina, cefotaxima, eritromicina i tetraciclina mentre que el pilus-1, i en certa manera *pcpA*, es va detectar amb més freqüència a les soques no-sensibles als agents antimicrobians testats.

#### 5.4.3 Prevalença de *pcpA*, *psrP* i pilus-1 d'acord amb el serotip i el clon.

La prevalença d'aquestes tres proteïnes estava fortament associades a específics serotips i clons. La taula 32 mostra les diferències significatives en la prevalença de *pcpA*, *psrP* i pilus-1 d'acord amb el serotip. *pcpA* era molt prevalent en gairebé totes els serotips, en excepció del serotip 3. *pcpA* només es va detectar en 7 de 21 soques (33.3%) *versus* en 500 de 526 (95.1%) soques corresponents a un serotip diferent del 3 ( $P < 0.001$ ). Per a determinats serotips la prevalença de *psrP* era superior però es va produir en absència de pilus-1 i viceversa. Per exemple, la prevalença de *psrP* entre les 136 soques testades del serotip 1 era del 80.1% (109 soques) però no es va detectar pilus-1 en cap soca del serotip 1. Aquesta observació també es va detectar en el serotip 5 on es va detectar *psrP* en el 88.2% de les 34 soques però no es va detectar pilus-1. Pel contrari, la prevalença de *psrP* en els serotips 14 i 6B era significativament menor que el pilus-1, 5.3% *versus* 84.2%, entre les soques del serotip 14 ( $n=19$ ) i 35.7% *versus* 57.1% entre les soques del serotip 6B ( $n=14$ ). Altres serotips on no es va detectar pilus-1 eren el serotip 7F (cap de les 36 soques) i el serotip 3 (cap de les 21 soques). La prevalença de *psrP* era molt baixa en aquests serotips (11.1% pel serotip 7F i 9.5% pel serotip 3).

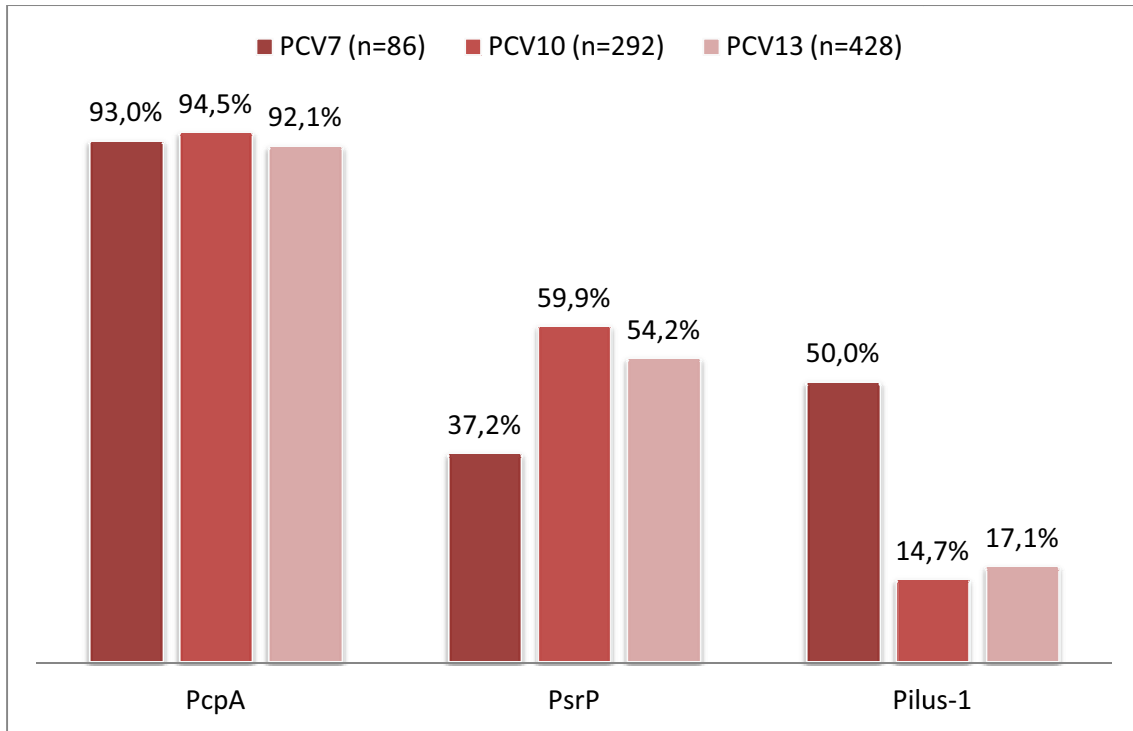
Una altra observació és que *psrP* era significativament més freqüent en aquells serotips amb elevat potencial invasiu que en aquells amb un baix potencial invasiu; 58.7% *versus* 39.1%;  $p < 0.001$ . La prevalença de *pcpA* era també més elevada en aquells serotips amb elevat potencial invasiu 95.6% *versus* 87.5%;  $p = 0.01$ . La distribució de pilus-1 era similar en els serotips amb elevat i baix potencial invasiu, 16.1% *versus* 13.6%;  $p = 0.4$ ). Considerant només les soques sensibles a penicil·lina, la prevalença de *psrP* entre el serotips amb elevat i baix potencial invasiu era diferent, 72.3% *versus* 44.9%;  $p < 0.001$ . La distribució de *pcpA* entre les soques sensibles era també superior en les serotips invasius respecte els no invasius (94.3% *versus* 81.9%;  $p = 0.01$ ). La prevalença de pilus-1 era superior en les soques sensibles a penicil·lina expressant serotips amb baix potencial invasiu (13.4% *versus* 6.4%;  $p = 0.02$ ).

Serotip	n soques	PcpA positius	% positius PcpA	PsrP positius	% positius PsrP	Pilus positius	% positius Pilus
Global	547	507	92,7	280	51,2	82	15,0
1	136	132	97,1	109	80,1	0	0,0
19A	93	90	96,8	44	47,3	26	28,0
7F	36	36	100,0	4	11,1	0	0,0
5	34	28	82,4	30	88,2	0	0,0
6A	22	21	95,5	11	50,0	4	18,2
3	21	7	33,3	2	9,5	0	0,0
19F	20	16	80,0	13	65,0	6	30,0
14	19	19	100,0	1	5,3	16	84,2
6B	14	14	100,0	5	35,7	8	57,1
15B	13	13	100,0	10	76,9	2	15,4
9V	12	12	100,0	3	25,0	9	75,0
23B	12	12	100,0	1	8,3	0	0,0
24F	10	10	100,0	1	10,0	0	0,0
23F	10	10	100,0	1	10,0	0	0,0
10A	9	9	100,0	2	22,2	1	11,1
23A	6	6	100,0	4	66,7	0	0,0
18C	6	6	100,0	5	83,3	0	0,0
15C	6	6	100,0	5	83,3	1	16,7
38	6	3	50,0	2	33,3	2	33,3
21	5	5	100,0	3	60,0	0	0,0
4	5	3	60,0	4	80,0	4	80,0
15A	4	4	100,0	1	25,0	0	0,0
24	4	4	100,0	2	50,0	0	0,0
35B	3	3	100,0	1	33,3	1	33,3
22F	3	3	100,0	3	100,0	0	0,0
16F	3	3	100,0	3	100,0	0	0,0
12F	3	3	100,0	0	0,0	0	0,0
9N	2	2	100,0	1	50,0	0	0,0
37	2	2	100,0	0	0,0	0	0,0
34	2	1	50,0	0	0,0	1	50,0
31	2	2	100,0	0	0,0	0	0,0
29	2	2	100,0	1	50,0	0	0,0
28	2	1	50,0	0	0,0	0	0,0
27	2	1	50,0	0	0,0	0	0,0
22	2	2	100,0	1	50,0	0	0,0
16	2	2	100,0	2	100,0	0	0,0
6C	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0
35F	1	1	100,0	1	100,0	0	0,0
33F	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0
24B	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0
17F	1	1	100,0	1	100,0	0	0,0
11A	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0
47	1	1	100,0	0	0,0	1	100,0
39	1	1	100,0	1	100,0	0	0,0
17	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0
13	1	1	100,0	1	100,0	0	0,0
11	1	1	100,0	1	100,0	0	0,0
10	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0
8	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0
2	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0

Taula 32. Prevalença de *pcpA*, *psrp* i pilus1 d'acord amb la distribució de serotips.



La figura 29 mostra la prevalença de *pcpA*, *psrP* i pilus-1 d'acord amb els serotips inclosos a les vacunes comercialitzades PCV7, PCV10 i PCV13. Es va detectar amb més freqüència *psrP* entre els serotips inclosos a PCV7 respecte als serotips no inclosos (50% versus 8.5%;  $p < 0.01$ ). Pel contrari, es va detectar *PsrP* en el 53.8% de les soques amb serotips no inclosos a PCV7 i en el 37.2% de les soques amb serotips inclosos ( $p = 0.005$ ).



**Figura 29.** Prevalença de *pcpA*, *psrP* i pilus-1 d'acord amb els serotips inclosos a les actuals vacunes conjugades PCV7, PCV10 i PCV13.

També es van observar diferències significatives en la prevalença d'aquestes tres proteïnes d'acord amb el tipus clonal expressant el mateix serotip (Taula 33). Es va detectar *psrP* en gairebé totes les soques ST306 (106 de 109 soques; 97.2%) mentre que gairebé en cap de les soques ST304 (1 de 22 soques; 4.5%). No es va detectar pilus-1 en cap d'aquests tipus clonals. El mateix fenomen es va observar amb el clon sensible a penicil·lina ST1201: totes les soques amb aquest ST (n=19) presentaven *psrP* però cap pilus-1. I, tot el contrari, en el ST320, totes les soques (n=16) presentaven pilus-1 però cap *psrP*. Incloent *pcpA*, amb la seva elevada prevalença en tota la col·lecció estudiada, es van observar diferències significatives d'acord amb el tipus clonal en soques expressant el mateix serotip. Per exemple, entre les soques de serotip 3, es va detectar *pcpA* en el 100% de les soques amb ST260, ST1220, ST1377 o ST2590 (6 soques) mentre que només en el 6.6% de les soques amb ST180 (1 de 15 soques).

ST	n soques	PcpA positius	% positius PcpA	PsrP positius	% positius PsrP	Pilus positius	% positius Pilus
306	109	107	98,2	106	97,2	0	0,0
191	32	32	100,0	3	9,4	0	0,0
1223	25	23	92,0	21	84,0	0	0,0
304	22	22	100,0	1	4,5	0	0,0
1201	19	18	94,7	19	100,0	0	0,0
276	18	18	100,0	3	16,7	0	0,0
320	16	16	100,0	0	0,0	16	100,0
180	15	1	6,7	1	6,7	0	0,0
156	13	13	100,0	0	0,0	13	100,0
2013	13	13	100,0	2	15,4	0	0,0
2372	12	12	100,0	2	16,7	1	8,3
97	11	11	100,0	2	18,2	1	9,1
289	8	4	50,0	8	100,0	0	0,0
63	7	7	100,0	2	28,6	0	0,0
4677	6	6	100,0	0	0,0	0	0,0
2100	6	6	100,0	1	16,7	0	0,0
1167	6	1	16,7	6	100,0	5	83,3
838	6	6	100,0	0	0,0	6	100,0
230	6	6	100,0	0	0,0	0	0,0
202	6	5	83,3	2	33,3	5	83,3
199	5	5	100,0	5	100,0	0	0,0
113	5	5	100,0	5	100,0	0	0,0
42	5	5	100,0	4	80,0	0	0,0
1262	4	4	100,0	4	100,0	0	0,0
433	4	4	100,0	1	25,0	0	0,0
416	4	4	100,0	4	100,0	1	25,0
386	4	4	100,0	1	25,0	2	50,0
90	4	3	75,0	0	0,0	4	100,0
81	4	4	100,0	4	100,0	0	0,0
30	4	4	100,0	4	100,0	0	0,0
2690	3	3	100,0	1	33,3	0	0,0
1684	3	3	100,0	0	0,0	0	0,0
1143	3	3	100,0	3	100,0	1	33,3
310	3	0	0,0	0	0,0	3	100,0
280	3	3	100,0	3	100,0	0	0,0
224	3	3	100,0	0	0,0	0	0,0
193	3	3	100,0	3	100,0	0	0,0
101	3	3	100,0	2	66,7	0	0,0
72	3	3	100,0	3	100,0	0	0,0

Altres ST detectats en dues soques: ST62, ST109, ST162, ST177, ST338, ST393, ST439, ST447, ST558, ST989, ST1011, ST1220, ST1377, ST1624, ST1692, ST2611, ST2948, ST4310, ST4828, ST5223, ST5740

En una soca: ST9, ST66, ST88, ST94, ST110, ST124, ST143, ST176, ST179, ST205, ST217, ST228, ST245, ST260, ST274, ST311, ST315, ST327, ST343, ST392, ST404, ST425, ST446, ST450, ST460, ST494, ST557, ST614, ST876, ST994, ST1012, ST1064, ST1264, ST1475, ST1504, ST1577, ST1589, ST1611, ST1664, ST1844, ST1848, ST2319, ST2333, ST2376, ST2377, ST2467, ST2557, ST2590, ST2592, ST2594, ST2595, ST2618, ST2946, ST2947, ST2949, ST3254, ST3259, ST3436, ST3437, ST3438, ST3490, ST3609, ST3787, ST4306, ST4676, ST4796, ST4826, ST4832, ST4834, ST5224, ST5741, ST5825, ST5829, ST6006, ST6040, ST6394, ST6518, ST6519.

Taula 33. Prevalença de pcpA, psrP i pilus-1 d'acord amb el tipus clonal.

## 5.5 ANNEX DE RESULTATS

En el transcurs d'aquesta Tesi doctoral, la doctoranda ha participat en diferents projectes d'investigació estretament relacionats amb els tres articles publicats en que es basa aquest treball i que també han donat lloc a la publicació d'articles.

De Sevilla MF, García JJ, Esteva C, Moraga F, Hernández S, **Selva L**, Coll F, Ciruela P, Planes AM, Codina G, Salleras L, Jordan I, Domínguez A, Muñoz-Almagro C. Clinical Presentation of Invasive Pneumococcal Disease in Spain in the Era of Heptavalent Conjugate Vaccine *Pediatr Infect Dis J* 2011

- Veure article a l'annex 5

Domínguez A, Ciruela P, García JJ, Moraga F, F de Sevilla M, **Selva L**, Coll F, Muñoz-Almagro C, Planes AM, Codina G, Jordán I, Esteva C, Hernández S, Soldevila N, Cardeñosa N, Batalla J, Salleras L. Effectiveness of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in the prevention of invasive pneumococcal disease in children aged 7 to 59 months. A matched case-control study. *Vaccine* 2011; 29(48): 9020-5.

- Veure article a l'annex 6

Esteva C, **Selva L**, de Sevilla MF, Garcia-Garcia JJ, *Pallarés R*, Muñoz-Almagro C. *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 causing invasive disease among children in Barcelona over a 20-year period (1989-2008). *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(9): 1441-4.

- Veure article a l'annex 7

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

- Veure article a l'annex 8

Muñoz-Almagro C, Gala S, **Selva L**, Jordan I, Tarrago D, *Pallarés R*. DNA Bacterial Load in Children with Pneumococcal Pneumonia and Empyema. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30(3):327-35.

- Veure article a l'annex 9

Muñoz-Almagro C, **Selva L**, *Pallarés R*. Influence of pneumococcal Vaccine on the Incidence of Empyema. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 2010; 16(4): 394-398.

- Veure article a l'annex 10

Muñoz-Almagro C, **Selva L**, Fernandez de Sevilla M, Esteva C, Hernandez-Bou S, Morales B. Canvis en l'epidemiologia molecular del neumococ en el nostre medi *Pediatria Catalana*. 2010

- Veure article a l'annex 11

**Selva L**, Esteva C, de Sevilla MF, Hernandez-Bou S, Muñoz-Almagro. Direct detection of *Streptococcus pneumoniae* in positive blood cultures by real-time polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2010; 66(2):204-6.

- Veure article a l'annex 12

Muñoz-Almagro C, Esteva C, de Sevilla MF, **Selva L**, Gené A, Pallarés R. Emergence of invasive pneumococcal disease caused by multidrug-resistant serotype 19A among children in Barcelona. *Journal of Infection* 2009; 59(2):75-82.

- Veure article a l'annex 13



# DISCUSSIÓ

En aquesta tesi doctoral s'ha demostrat la utilitat de les tècniques moleculars en el diagnòstic i caracterització del pneumococ, amb especial referència, als països en vies de desenvolupament mitjançant l'ús d'un sistema econòmic i senzill per al transport de mostres biològiques a temperatura ambient.

També s'ha demostrat que per considerar qualsevol antigen del pneumococ com a candidat d'una nova generació de vacunes proteiques, és necessari conèixer quina és la prevalença d'aquests determinats a la població en els diferents clons i serotips de *Streptococcus pneumoniae*; ja que s'ha relacionat la presència d'aquestes proteïnes amb el tipus clonal de les soques que expressen el mateix serotip.

Tot i que el cultiu bacterià convencional segueix sent el mètode de referència per a l'aïllament d'agents infecciosos, a partir d'una varietat de mostres, en els darrers anys, la detecció de l'ADN de *S. pneumoniae* mitjançant la PCR s'ha aplicat amb èxit en la identificació del pneumococ (Resti et al. 2009; Le Monnier et al. 2006; Azzari et al. 2010). Un valor afegit que presenta la PCR, respecte altres mètodes convencionals, és que pot amplificar l'ADN del pneumococ en una fase inicial de la malaltia o bé en aquells pacients que han estat prèviament tractats i la càrrega bacteriana és massa baixa per ser detectada per cultiu. La tècnica de PCR ha mostrat ser d'especial utilitat en els pacients pediàtrics, degut a la dificultat d'obtenir un volum adequat de mostra. En el primer estudi, de la present tesi doctoral, es mostra que la proporció de malaltia pneumocòccica invasiva diagnosticada només per PCR en temps real (cultiu negatiu) era més del doble que la diagnosticada per cultiu. Com altres autors, hem constatat l'increment en la sensibilitat era especialment elevat en el pacient que havia rebut tractament antibiòtic previ (Resti et al. 2009; Le Monnier et al. 2009).

L'increment del diagnòstic microbiològic mitjançant l'ús de la PCR és necessari, no només per a una millor atenció al pacient, sinó també per la vigilància epidemiològica

de la malaltia pneumocòccica i l'avaluació de l'impacte de les vacunes. Degut a que la vigilància de la MPI esdevé cara, requereix una infraestructura de laboratori determinada, que sovint no està disponible en els laboratoris dels països en vies de desenvolupament. Per tant, són necessaris nous mètodes més ràpids, sensibles i econòmics que permetin fer estudis a escala local. Els resultats del treball presentat com a segon estudi d'aquesta tesi doctoral, mostren com la conservació de mostres biològiques en paper de filtre (*dried-spot* o DS) és un sistema molt útil per implantar estudis de vigilància epidemiològica, de la malaltia pneumocòccica invasiva en països on és difícil l'accés als sistemes tradicionals de serotipat. El serotipat molecular del pneumococ realitzat en les mostres de DS ens permet conèixer els serotips circulants i poder realitzar estudis de vigilància epidemiològica ja que les freqüències dels serotips varien en funció de l'àrea geogràfica. Amb aquest sistema, es poden fer estudis per conèixer quins són els serotips causants de malaltia a Barcelona o bé en una altra geogràfica, en aquest cas, Sierra Leone, i poder avaluar l'impacte de les vacunes actuals.

La immunització amb la vacuna antipneumocòccica conjugada heptavalent (PCV7) ha produït canvis en les manifestacions clíniques de la malaltia i en la distribució dels principals serotips causants de MPI (Singleton et al. 2007; Muñoz-Almagro et al. 2008; Lehmann et al. 2010). L'ús de les tècniques moleculars confirmen el recanvi de serotips. Aquests canvis s'observen en els resultats del primer estudi on els nens majors de 2 anys d'edat era el grup principal amb MPI tant per cultiu com per PCR. Aquest fet també va ser detectat en estudis anteriors del nostre grup quan el cultiu bacterià va ser l'únic criteri microbiològic per a la definició de MPI (Muñoz-Almagro et al. 2008) i també es confirma en aquest estudi, en el grup de pacients diagnosticats només per PCR. Una explicació a aquest fet podria ser l'aparició de serotips no vacunals com el serotip 1, que es detecta, principalment, en nens més grans, així com els bons resultats de la PCV7 contra els serotips detectats principalment en nens menors de dos anys.

En relació a la distribució dels serotips dels pacients identificats per cultiu, els resultats presentats en aquest treball són similar a estudis realitzats per altres autors (Byington et al. 2010; Weatherholtz et al. 2010; Picazo et al. 2011a). El serotip més freqüent en els pacients identificats per cultiu és el serotip 1, aquest serotip també s'ha identificat en altres regions d'Espanya (Picazo et al. 2011) i Portugal com al serotip més freqüent. Un estudi recent publicat pel nostre grup (Esteva et al. 2011), sobre el serotip 1 mostrava com la freqüència del serotip 1 va augmentar de 1.2 episodis/100.000 nens durant el període 1999-2003 a 4.4 episodis/100.000 nens durant el període 2004-2008.

Marimon et al. (Marimon et al. 2009), en un estudi realitzat en pacients pediàtrics al País Basc, van reportar un augment en el nombre de casos de MPI causats pel serotip 1 després de la introducció de PCV7. El serotip 1 és un dels serotips més prevalents dels serotips invasius de *S. pneumoniae* i no és freqüent aïllar-lo en portadors asimptomàtics, fins i tot en les àrees geogràfiques on és un dels principals serotips causants de malaltia. No obstant això, a Portugal, Nunes et al. (Nunes et al. 2008) van reportar una aparició del serotip 1 entre els individus portadors sans portuguesos després de 2003.

Després del serotip 1, en aquest estudi es mostra que els serotips més freqüents detectats per cultiu van ser els serotips 19A i 7F. Diversos autors (Singleton et al. 2007; Kaplan et al. 2010; Muñoz-Almagro et al. 2009) han observat que el serotip 19A és un serotip comú causant d'infeccions invasives per pneumococ en nens i que moltes soques del serotip 19A, s'han associat a resistència a múltiples fàrmacs (Moore et al. 2009; Reinert et al. 2005; Picazo et al. 2011). A Estats Units, Philisvili et al. (Philisvili et al. 2010) va reportar un increment de la incidència de MPI causada pel serotip 19A, fet que també es va observar en alguns països europeus com Alemanya i també a la nostra àrea geogràfica (Muñoz-Almagro et al. 2009). En un altre estudi realitzat pel nostre grup (Muñoz-Almagro et al. 2009) sobre l'emergència de la MPI causada pel serotip 19A conclouïa que comparant el període prevacunal amb el període posterior a la introducció de la vacuna s'havia produït un augment de la taxa de MPI causada pel serotip 19A que estava relacionada amb l'emergència de clons internacionals multiresistents com el ST320 i ST276. Els mateixos resultats també es van observar a la comunitat de Madrid (Picazo et al. 2011b) en un estudi recent realitzat en pacients pediàtrics atesos en 22 hospitals durant el període 2007-2009. Els resultats de l'estudi de Picazo et al. (Picazo et al. 2011b) mostraven que el serotip 19A era el més prevalent en les formes no-respiratòries de MPI (meningitis i bacterièmia) i que el 83% de les soques aïllades corresponien als ST320 i ST276, resistents a penicil·lina oral i eritromicina. En referència al serotip 7F, un estudi de vigilància epidemiològica realitzat a Alemanya (Imöhl et al. 2010) mostrava que des de l'any 1992 el serotip 7F era estadísticament més freqüent en el grup d'edat de nens menors de 4 mesos que entre els individus d'altres grups d'edat. A Utah, el serotip 7F es va reportar (Byington et al. 2010) com un dels quatre serotips més freqüents associats a empiema pneumònic en nens. A més, el serotip 7F s'ha associat a infecció pneumocòccica greu o mortal en nens (Rückinger et al. 2009)

Els serotips prevalents en els pacients identificats per cultiu també eren freqüents en els pacients només detectats per PCR a temps real, però es van trobar serotips



addicionals identificats només per PCR en temps real que no es trobaven freqüentment en els episodis identificats per cultiu. En aquest estudi hem observat que en l'ordre de classificació dels serotips en pacients amb cultiu negatiu, el serotip 3 era el segon serotip més freqüent. Les dades sobre el serotip 3 són heterogènies a la literatura. El serotip 3 s'ha associat a malaltia invasiva en nens i adults (Hausdorff et al. 2000) i a majors taxes de mortalitat en comparació amb altres serotips (Rückinger et al. 2009). A Espanya, un estudi realitzat per Obando et al. (Obando et al. 2008) mostrava que el serotip 3 era un dels serotips més prevalents que causaven empiema parapneumònic en pacients pediàtrics i aquest serotip es va associar amb complicacions més significatives que altres casos de empiema parapneumònic causats per altres serotips. Bender et al. (Bender et al. 2010) en un estudi realitzat amb pacients pediàtrics a Utah, va reportar un increment de la incidència de la síndrome hemolític-urèmica associada a *S. pneumoniae* relacionat amb el serotip 3. Igual que en altres estudis previs (Obando et al. 2008) i en el present estudi s'ha observat que el serotip 3 es detecta principalment per mètodes moleculars i és menys freqüent en els pacients identificats per cultiu. Segons aquestes dades, la PCR múltiple a temps real té el potencial per revelar una diferent distribució dels serotips circulants a la població en comparació amb el cultiu. Un estudi recent (Ogami et al. 2010) que comparava la microbiologia convencional amb els mètodes moleculars per a la detecció de diferències en portadors sans i nens malalts va mostrar que la PCR a temps real era superior al cultiu bacterià a l'hora d'identificar un major nombre de serotips de pneumococ en ambdós grups de pacients, en el grup de pacients sans portadors del pneumococ a la nasofaringe i els nens amb malaltia respiratòria.

Els resultats d'aquest primer treball presentat poden ser diferents dels obtinguts en altres zones geogràfiques, amb un ús diferent de la vacuna PCV7 o amb una política diferent en l'ús dels antibiòtics. Aquest estudi es va realitzar en una població amb una introducció de la vacuna PCV7 intermèdia (al voltant del 50%), amb un ús intermig d'antibiòtics previs (32% dels nens van ser exposats als antibiòtics) i només es van incloure pacients hospitalitzats. A més, la presència d'un clon específic, com ara el ST306 del serotip 1 a la nostra comunitat pot estar relacionat amb l'alta prevalença de pneumònia i la malaltia observada en els nens sans grans, mentre que en altres comunitats amb altres clons predominant (per exemple, serotips vacunals multiresistents) el retrat de la malaltia pot ser diferent.

No obstant, aquest primer estudi presenta diverses limitacions. La PCR múltiple a temps real (Tarrago et al. 2008) utilitzada no distingia entre certs serotips com 6A/6C i 19F/B/C, tot i que detectava tots els serotips inclosos en les tres vacunes conjugades.

D'altra banda, una proporció dels serotip 6A s'esperaria que poguessin ser realment serotips 6C i que alguns corresponents al serotip 6B podrien ser 6D.

En segon lloc, es va trobar que el 44% dels pneumococs dels pacients diagnosticats per PCR a temps real corresponien a altres serotips diferents dels detectats per la PCR múltiple utilitzada. Això podria explicar-se pel fet que el nombre de serotips que es detecten amb aquest assaig utilitzant la PCR a temps real en aquesta tesi doctoral, queda limitat a 24 de 93 serotips existents. Una altra explicació a aquest fet seria que aquests suposats pneumococs podrien ser altres espècies estretament relacionades amb *S. pneumoniae* però que no es tractessin de *S. pneumoniae* pròpiament. Des de fa uns anys, s'ha descrit a la literatura noves espècies com *Streptococcus pseudopneumoniae* (Arbique et al. 2004; Keith et al. 2006) i els estreptococs estretament relacionats (Simões et al. 2010). En el nostre laboratori i com a cribatge realitzem PCR a temps real del gen de la pneumolisina i un segon gen capsular (*wzg*) abans de fer l'estudi del serotip capsular. Per tant, la detecció d'un gen de virulència del pneumococ i la detecció addicional d'un gen capsular en una mostra estèril d'un pacient amb símptomes clínics d'infecció bacteriana, pot tenir un valor clínic significatiu. Tot i que es disposa de poques dades, s'ha pogut comprovar (Simões et al. 2010) que aquests estreptococs estretament relacionats són essencials en els estudis de la colonització pneumocòccica pel fet que habiten en el mateix nínxol i poden ser altament resistents als antibiòtics. No obstant, és necessari conèixer el paper clínic d'aquests estreptococs estretament relacionats.

En referència al resultats del segon estudi presentat en aquesta tesi doctoral, s'ha pogut demostrar que la combinació de les tècniques moleculars aplicades en les mostres de DS esdevé una innovació tecnològica molt interessant en els països en desenvolupament, ja que es tracta d'un mètode vàlid que permetria millorar significativament la vigilància de la MPI en aquests països, oferint informació precisa sobre l'evolució de la MPI davant les diferents estratègies de vacunació. Cal destacar que no existeix informació disponible sobre l'epidemiologia de la MPI a Sierra Leone. Els resultats d'aquest estudi preliminar mostren que respecte als 25 pacients de Sierra Leone amb sospita de MPI, un 60% van ser confirmats com a episodis de MPI. En relació a la distribució dels serotips causants de MPI, es va observar que el 40% dels serotips detectats eren serotips inclosos a la PCV-13. Per tant, d'acord amb aquests resultats, la introducció de la vacuna PCV-13 tindria un impacte en l'epidemiologia local de la MPI. Dos estudis realitzats en dos països oposats del continent Africà van demostrar la utilitat de la vacuna conjugada 9-valent en la prevenció de la meningitis i la pneumònia bacterièmica (Cutts et al. 2005; Klugman et al. 2003). Per tant, és

probable que aquestes vacunes siguin eficaces en altres regions i si és possible introduir vacunes que incloguin més serotips (PCV13), l'impacte de les vacunes seria major. Els serotips de *S. pneumoniae* en els 15 pacients identificats com a episodis de MPI eren: 3, 6A, 6B, 7F/A, 9/V/A/N/L, 19A (1 de cada) i en nou casos no es va poder determinar el serotip. Alguns d'aquests serotips han estat implicats en malaltia invasiva en altres països. En aquest estudi, no es van detectar ni el serotip 1 ni el serotip 5, que han estat reportats com a serotips freqüents en malaltia invasiva a l'Àfrica Occidental (Holliman et al. 2007; Adegbola et al. 2006). Segurament, aquest fet es deu al reduït nombre de mostres serotipades. El nombre de mostres de sang recollides per a l'estudi, és la principal limitació, tot i així, es tracta d'un estudi preliminar amb mostres reals de pacients amb sospita de MPI que ha permès observar que l'ús de DS és un mètode útil i fàcil de recollir mostres pel diagnòstic i vigilància epidemiològica de la malaltia.

L'estudi que es presenta com a tercer objectiu d'aquesta tesi doctoral és el primer treball extensiu on s'ha analitzat la prevalença de *psrP* en soques de pneumococ aïllades de pacients amb MPI i aïllades en portadors nasofaringis sans. Els resultats d'aquest estudi s'avenen amb les dades publicades sobre la funció d'aquest nou factor de virulència i aporta informació sobre la distribució d'aquesta proteïna entre els diferents clons i serotips del pneumococ. L'augment de la freqüència de *psrP* en les mostres clíniques dels pacients amb pneumònia en comparació amb la freqüència en les soques de portadors sans o de nens amb bacterièmia s'avé amb altres dades publicades que mostren que *PsrP* és una adhesina de les cèl·lules pulmonars i que no juga un paper durant la colonització de la nasofaringe (Sanchez et al. 2010) o en la disseminació en el torrent sanguini en un model de sepsis intraperitoneal (Rose et al. 2008).

Quan es va estratificar la incidència de *psrP* en nens amb pneumònia en funció de l'edat, es va trobar que el 65.4% de les soques de pneumococ que causaven malaltia en nens majors de 2 anys portaven aquest gen de virulència. Aquesta taxa era significativament inferior en les soques que causaven malaltia en nens més petits. Una possible explicació a aquest fet podria ser la distribució de serotips que expressen *psrP*. Es va observar una predominança de *psrP* en els serotips no inclosos a la vacuna PCV7. Per tant, la diferència en l'edat s'explicaria pel fet que la nasofaringe dels nens es colonitza per primera vegada amb aquests serotips i després, quan són més grans, aquests serotips són reemplaçats per serotips no vacunals. Estudis realitzats per Melegaro et al. (Hussain et al. 2005) donen suport a aquesta explicació. No obstant, en el nostre estudi, no seria una explicació vàlida perquè els serotips

inclosos a PCV7 no es van trobar predominantment ni en nens més petits ni en nens més grans (36 de 189 [19%] en nens menors de 2 anys *versus* 34 de 252 [13.5%] en nens  $\geq 2$  anys;  $p=0.1$ ). Per tant, encara es desconeixen les raons que explicarien perquè les soques que expressen *psrP* produeixen MPI en nens més grans que els que no ho fan. És important destacar el fet que *psrP* es va detectar predominantment en els serotips no inclosos a PCV7 i suggereix que la seva inclusió seria ampliar l'actual cobertura de la vacuna. No obstant això, no seria tant per a les vacunes PCV10 i PCV13 ja que inclouen els serotips 1 i 19A, on en aquests soques *psrP* es va detectar amb una elevada freqüència.

També es va demostrar la presència de *psrP* en determinats tipus clonals mentre que en altres no es va detectar. Per exemple, totes les soques del serotip 1 corresponents al clon CC306 van ser positives per *psrP*, mentre que només 1 de 18 soques amb ST304 va ser positiva. El ST306, juntament amb el ST304, ST228 i altres, pertany al llinatge A del serotip 1, que és el principal llinatge detectat al Nord d'Amèrica i a Europa (Brueggemann et al. 2003). D'acord amb alguns estudis epidemiològics sobre el ST306, aquest clon s'ha relacionat amb diversos brots de MPI (Henriques-Normark et al. 2001) i l'emergència en l'aparició de la pleuropneumònia en l'era de la vacuna (Obando et al. 2008), mentre que no s'ha observat relació amb el ST304. L'elevada prevalença de P<sub>s</sub>rP, una adhesina del pneumococ encarregada de la seva unió a les cèl·lules de pulmó, en les soques ST306 es podria associar a aquest fet.

Aquests resultats mostren que la P<sub>s</sub>rP sola només podria oferir protecció contra el 60% de les soques causants de pneumònia. Per tant, aquestes troballes, indiquen que, en el millor dels casos, P<sub>s</sub>rP podria ser un component d'una formulació d'una vacuna multivalent. Seria necessari la inclusió d'una segona o tercera proteïna que oferís protecció contra la bacterièmia i que la seva cobertura ajudés a cobrir el 40% de les soques invasives que no expressen P<sub>s</sub>rP.

No està clar perquè *psrP* es troba en unes soques i no en unes altres, no obstant, aquest fet suggereix que hi ha altres factors de virulència que compensen aquesta absència de P<sub>s</sub>rP en algunes soques. En aquesta tesi doctoral, i com a resultats addicionals, es presenten els resultats d'un treball realitzat pel nostre grup (dades enviades per a la seva publicació) amb l'objectiu de determinar la distribució i la variabilitat del tipus clonal de tres potencials candidats a una vacuna proteica: P<sub>s</sub>rP i a més a més, Pilus-1 i la proteïna d'unió a colina PcpA. Pilus-1 és un factor reconegut en la virulència de *S. pneumoniae*. P<sub>s</sub>rP intervé en l'adhesió del pneumococ a les cèl·lules (Barocchi et al. 2006) i PcpA és una proteïna d'unió a colina que també juga

un paper en l'adhesió del pneumococ i la formació de biofilm (Sánchez-Beato et al. 1998; Glover, 2008). Tant per Pilus-1 com per *Psrp*, hi ha estudis publicats sobre la seva incidència en mostres clíniques, mentre que per *PcpA* no existeix informació sobre la seva prevalença. En el nostre estudi, *PcpA* era present en gairebé tots els serotips estudiats en excepció del serotip 3 i per tant, demostra la seva importància en la biologia del pneumococ i suporta la seva inclusió en una vacuna proteica.

Sorprenentment, *PcpA* només era present en 7 de 21 serotips 3 estudiats. El serotip 3 del pneumococ és diferent dels altres serotips, produeix una síntesi excessiva de polisacàrid capsular, fet que es pot observar, com a colònies mucoses d'aparença característica quan es cultiva en plaques d'agar sang. Així com nombrosos estudis indiquen que el polisacàrid capsular inhibeix l'adhesió bacteriana, i el serotip 3 està associat a pneumònia necrotitzant, l'absència d'aquesta adhesina i el diferent perfil clínic suggereixen que les soques de serotip 3 podrien tenir una patogènia diferent a altres soques d'altres serotips, a més que es necessitaria una formulació diferent d'una possible vacuna proteica per oferir protecció contra el serotip 3.

Es coneix que hi ha diferències en la virulència entre soques d'un mateix serotip, degut a la contribució de factors independents del serotip associats al tipus clonal (Harvey et al. 2011). La variabilitat en la prevalença de *psrP*, pilus i *pcpA* d'acord amb el tipus clonal en soques que expressen un mateix serotip confirma que la presència d'aquests factors és una propietat clonal.

L'elevat cost del procés de conjugació d'aquestes vacunes fa que només un nombre limitat de serotips es puguin incloure en aquestes formulacions. De manera que, són necessàries estratègies diferents de vacunació a partir d'antígens del pneumococ per al desenvolupament de futures vacunes proteiques. El principal avantatge d'aquestes proteïnes seria que la protecció no seria específica de serotip i que incloent pocs candidats oferirien una major cobertura amb un baix cost de fabricació. Les vacunes proteiques no necessitarien refrigeració i es podrien administrar per via oral o intranasal. Per aquestes raons, cal realitzar estudis per determinar si una nova generació de vacunes multivalents proteiques contra el pneumococ és factible i desitjable.

# CONCLUSIONS

## 6.1 Estudi 1

- 1.1. La PCR en temps real permet un increment significatiu de la MPI pediàtrica. En aquesta sèrie de casos, un 66% van ser diagnosticats només per PCR en temps real. La PCR en temps real ha demostrat ser molt útil per als estudis de vigilància epidemiològica de la MPI i és un bon complement per als mètodes de diagnòstic i caracterització del pneumococ basats en el cultiu.
- 1.2. Els tres serotips més freqüents en el grup de pacients identificats per cultiu són els serotips 1, 19A i 7F; mentre que en el grup de pacients identificats només per PCR en temps real, són els serotips 1, 3 i 19A.
- 1.3. S'observen diferències significatives en la distribució de serotips d'acord amb les manifestacions clíniques i característiques epidemiològiques en pacients amb cultiu positiu, respecte aquells diagnosticats només per PCR en temps real. El serotip 3 és un serotip infravalorat per cultiu i presenta una elevada prevalença en la MPI pediàtrica.

## 6.2 Estudi 2

- 2.1. La tècnica desenvolupada per al serotipat de mostra directa, conservada a temperatura ambient i en suport paper de filtre, és un mètode útil i alternatiu per a recollida, conservació a temperatura ambient i transport de mostres. La tècnica del dried-spot permet de forma reproducible el transport de mostres per al diagnòstic i caracterització de *Streptococcus pneumoniae* mitjançant l'ús de

la PCR en temps real. Són necessaris estudis addicionals que incloguin l'avaluació de la sensibilitat d'aquest mètode en comparació amb el cultiu.

- 2.2. Un 60% dels 25 pacients estudiats, atesos a l'Hospital St. John of God en Sierra Leone, es confirmen com a casos de MPI. Un 40% d'aquests casos corresponen a serotips inclosos a la vacuna PCV13 (serotip 3, 7FA, 19A, 6A, 6B, 9VANL).

### 6.3 Estudi 3

- 3.1. La prevalença de psrP és elevada a la col·lecció estudiada (52.4%). S'observa una prevalença significativament més elevada (65.4%) en les soques aïllades de nens grans amb pneumònia. La prevalença de PsrP en aïllats causants de bacterièmia és baixa.
- 3.2. S'observa una elevada variabilitat en la prevalença de PsrP d'acord amb la sensibilitat antibiòtica i al tipus clonal de *S. pneumoniae*. Aquestes dades recolzen l'ús potencial de *psrP* com a un antigen de protecció en el disseny d'una nova generació de vacunes proteiques. No obstant, es necessiten components addicionals per oferir major protecció contra les soques amb sensibilitat disminuïda a antimicrobians i les associades a bacterièmia oculta.

# BIBLIOGRAFIA

## A

Adegbola R, Hill PC, Secka O, Ikumapayi UN, Lahai G, Greenwood BM. Serotype and antimicrobial susceptibility patterns of isolates of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in The Gambia 1996–2003. *Trop Med Int Health* 2006; 11(7): 1128–35.

Arbique JC, Poyart C, Trieu-Cuot P, Quesne G, Carvalho Mda G, Steigerwalt AG, et al. Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. *J Clin Microbiol* 2004; 42(7): 4686-4696.

Arifeen SE, Saha SK, Rahman S, Rahman KM, Rahman SM, Bari S, et al. Invasive pneumococcal disease among children in rural Bangladesh: results from a population-based surveillance. *Clin Infect Dis* 2009; 48 Suppl 2: S103-13.

Aristegui J, Bernaola E, Pocheville I, Garcia C, Arranz L, Duran G, et al. Reduction in pediatric invasive pneumococcal disease in the Basque Country and Navarre, Spain, after introduction of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26 (5): 303–10.

Avery OT, Dubos R. The protective action of a specific enzyme against type III pneumococcus infection in mice. *J Exp Med* 1931; 54: 73–89.

Avni T, Mansur N, Leibovici L, Paul M. PCR using blood for diagnosis of invasive pneumococcal disease: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol* 2010; 48(2): 489-96.

Azzari C, Cortimiglia M, Moriondo M, Canessa C, Lippi F, Ghiori F, et al. Pneumococcal DNA is not detectable in the blood of healthy carrier children by real-time PCR targeting the *lytA* gene. *J Med Microbiol* 2011; 60(Pt 6): 710-4.

Azzari C, Moriondo M, Indolfi G, Cortimiglia M, Canessa C, Becciolini L, et al. Realtime PCR is more sensitive than multiplex PCR for diagnosis and serotyping in children with culture negative pneumococcal invasive disease. *PLoS One* 2010; 5(2): e9282.

Azzari C, Moriondo M, Indolfi G, Massai C, Becciolini L, de Martino M, et al. Molecular detection methods and serotyping performed directly on clinical samples improve diagnostic sensitivity and reveal increased incidence of invasive disease by *Streptococcus pneumoniae* in Italian children. *J Med Microbiol* 2008; 57(Pt 10): 1205-12.



## B

Barocchi MA, Censini S, Rappuoli R. Vaccines in the era of genomics: the pneumococcal challenge. *Vaccine* 2007; 25(16): 2963-73.

Barocchi MA, Ries J, Zogaj X, Hemsley C, Albiger B, Kanth A, et al. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(8): 2857-62.

Basset A, Trzcinski K, Hermos C, O'Brien KL, Reid R, Santosham M, et al. Association of the pneumococcal pilus with certain capsular serotypes but not with increased virulence. *J Clin Microbiol* 2007; 45(6): 1684-9.

Bender JM, Ampofo K, Byington CL, Grinsell M, Korgenski K, Daly JA, et al. Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*-induced hemolytic uremic syndrome in Utah children. *Pediatr Infect Dis J* 2010; 29(8): 712-716.

Birtles A, McCarthy N, Sheppard CL, Rutter H, Guiver M, Haworth E, et al. Multilocus sequence typing directly on DNA from clinical samples and a cultured isolate to investigate linked fatal pneumococcal disease in residents of a shelter for homeless men. *J Clin Microbiol* 2005; 43(4): 2004-8.

Boppana SB, Ross SA, Novak Z, Shimamura M, Tolan RW Jr, Palmer AL, et al.; National Institute on Deafness and Other Communication Disorders CMV and Hearing Multicenter Screening (CHIMES) Study. Dried blood spot real-time polymerase chain reaction assays to screen newborns for congenital cytomegalovirus infection. *JAMA* 2010; 303(14): 1375-82.

Brito DA, Ramirez M, de Lencastre H. Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41(6): 2378-84.

Brueggemann AB, Spratt G. Geographic distribution and clonal diversity of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 isolates. *J Clin Microbiol* 2003; 41(11): 4966-4970.

Bryant KA, Block SL, Baker SA, Gruber WC, Scott DA; PCV13 Infant Study Group. Safety and immunogenicity of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics* 2010; 125(5): 866-75.

Byington CL, Hulten KG, Ampofo K, Sheng X, Pavia AT, Blaschke AJ, et al. Molecular epidemiology of pediatric pneumococcal empyema from 2001 to 2007 in Utah. *J Clin Microbiol* 2010; 48(2): 520-5.

## C

Calbo E, Garau J. Factors affecting the development of systemic inflammatory response syndrome in pneumococcal infections. *Curr Opin Infect Dis* 2011; 24(3): 241-7.

Calix JJ, Nahm MH. A new pneumococcal serotype, 11E, has a variably inactivated *wcjE* gene. *J Infect Dis* 2010; 202(1): 29-38.

Canut A, Martín-Herrero JE, Labora A, Maortua H. What are the most appropriate antibiotics for the treatment of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease? A therapeutic outcomes model. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60(3): 605-12.

Cao J, Gong Y, Yin Y, Wang L, Ying B, Chen T, et al. Pneumococcal proteins PspA and PspC induce CXCL8 production in human neutrophils: implications in pneumococcal infections. *Microbes Infect* 2010; 12(12-13): 1051-60.

Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR 1997;46(No. RR-8)

Ceyhan M, Yildirim I, Sheppard CL, George RC. Pneumococcal serotypes causing pediatric meningitis in Turkey: application of a new technology in the investigation of cases negative by conventional culture. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2010; 29(3): 289-93.

Chevallier B, Vesikari T, Brzostek J, Knuf M, Bernal N, Aristegui J, et al. Safety and reactogenicity of the 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) when coadministered with routine childhood vaccines. Pediatr Infect Dis J 2009; 28(4 Suppl): S109-18.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing (2010): Twenty informational supplement. CLSI document M100-S20. Clinical and laboratory standard institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 1907 USA, 2010.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing (2011): Twenty first informational supplement. CLSI document M100-S21. Clinical and laboratory standard institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 1907 USA, 2011.

Cole R. Treatment of pneumonia by means of specific serums. JAMA 1913; 61(9): 663-666.

Conly J, Johnston B. Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Fallacy or fact?. Can J Infect Dis 2002; 13(1): 13-16.

Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. J Clin Microbiol 2001; 39(4): 1553-8.

Cutts FT, Zaman SM, Enwere G, Jaffar S, Levine OS, Okoko JB, et al. Efficacy of nine-valent pneumococcal conjugate vaccine against pneumonia and invasive pneumococcal disease in The Gambia: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet 2005; 365(9465): 1139-46.

## D

Dagan R, Frasch C. Clinical characteristics of a novel 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine candidate (PHiD-CV). Introduction. Pediatr Infect Dis J 2009; 28(4 Suppl): S63-5.

Dagan R, Givon-Lavi N, Greenberg D, Fritzell B, Siegrist CA. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* shortly before vaccination with a pneumococcal conjugate vaccine causes serotype-specific hyporesponsiveness in early infancy. J Infect Dis 2010; 201(10): 1570-9.

De Crignis E, Re MC, Cimatti L, Zecchi L, Gibellini D. HIV-1 and HCV detection in dried blood spots by SYBR Green multiplex real-time RT-PCR. J Virol Methods 2010; 165(1): 51-6.

Dias CA, Teixeira LM, Carvalho Mda G, Beall B. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. J Med Microbiol 2007; 56(Pt 9): 1185-8.

Dinleyici EC, Yargic ZA. Current Knowledge Regarding the Investigational 13-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine. Expert Review of Vaccines 2009; 8(8): 977-986.

Domínguez A, Ciruela P, García-García JJ, Moraga F, de Sevilla MF, 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(48):9020-5.

## E

Eldholm V, Johnsborg O, Haugen K, Ohnstad HS, Håvarstein LS. Fratricide in *Streptococcus pneumoniae*: contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC. *Microbiology* 2009; 155(Pt 7): 2223-34.

Elberse KE, Nunes S, Sá-Leão R, van der Heide HG, Schouls LM. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis for *Streptococcus pneumoniae*: comparison with PFGE and MLST. *PLoS One* 2011; 6(5): e19668. (a)

Elberse KE, van de Pol I, Witteveen S, van der Heide HG, Schot CS, van Dijk A, et al. Population structure of invasive *Streptococcus pneumoniae* in The Netherlands in the pre-vaccination era assessed by MLVA and capsular sequence typing. *PLoS One* 2011; 6(5): e20390. (b)

Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* 1998; 144 (Pt11): 3049-60.

Enright MC, Spratt BG. Multilocus sequence typing. *Trends in microbiology* 1999; 7(12): 482-7.

Esteva C, Selva L, de Sevilla MF, Garcia-Garcia JJ, Pallares R, Muñoz-Almagro C. *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 causing invasive disease among children in Barcelona over a 20-year period (1989-2008). *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(9): 1441-4.

## F

Falade AG, Lagunju IA, Bakare RA, Odekanmi AA, Adegbola RA. Invasive pneumococcal disease in children < 5 years admitted to 3 urban hospitals in Ibadan, Nigeria. *Clin Infect Dis* 2009; 48 (Suppl 2): S190-6.

Fenoll A, Granizo JJ, Aguilar L, et al. Temporal trends of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antimicrobial resistance patterns in Spain from 1979 to 2007. *J Clin Microbiol* 2009; 47(4): 1012–1020.

Fenoll A, Jado I, Vicioso D, Casal J. Dot blot assay for the serotyping of pneumococci. *J Clin Microbiol* 1997; 35(3): 764-6.

Flayhart D, Borek AP, Wakefield T, Dick J, Carroll KC. Comparison of BACTEC PLUS blood culture media to BacT/Alert FA blood culture media for detection of bacterial pathogens in samples containing therapeutic levels of antibiotics. *J Clin Microbiol* 2007; 45(3): 816-21.

Fraão N, Sá-Leão R, de Lencastre H. Impact of a single dose of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on colonization. *Vaccine* 2010; 28(19): 3445-52.

Frolet C, Beniazza M, Roux L, Gallet B, Noirclerc-Savoye M, Vernet T, Di Guilmi AM. New adhesin functions of surface-exposed pneumococcal proteins. *BMC Microbiol* 2010; 10:190.

## G

Garcia E, Llull D, Muñoz R, Mollerach M, López R. Current trends in capsular polysaccharide biosynthesis of *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol* 2000; 151(6): 429-35.

Gherardi G, Fallico L, Del Grosso M, Bonanni F, D'Ambrosio F, Manganelli R, et al. Antibiotic-resistant invasive pneumococcal clones in Italy. *J Clin Microbiol* 2007; 45(2): 306-12. Fe d'errades a: *J Clin Microbiol* 2007; 45(9): 3148.

Gillespie SH, Balakrishnan I. Pathogenesis of pneumococcal infection. *J Med Microbiol* 2000; 49(12): 1057-67.

Glover DT, Hollingshead SK, Briles DE. *Streptococcus pneumoniae* Surface Protein PcpA Elicits Protection against Lung Infection and Fatal Sepsis. *Infect and Immunity* 2008; 76(6): 2767–2776.

Gunnison JB, Fraher MA, Pelcher EA, Jasetz E. Penicillin-resistant variants of pneumococci. *Appl Microbiol* 1968; 16(2): 311-4.

## H

Hare KM, Smith-Vaughan H, Binks M, Park IH, Nahm MH, Leach AJ. "Dodgy 6As": differentiating pneumococcal serotype 6C from 6A by use of the Quellung reaction. *J Clin Microbiol* 2009; 47(6): 1981-2.

Harvey RM, Stroehrer UH, Ogunniyi AD, Smith-Vaughan HC, Leach AJ, Paton JC. A variable region within the genome of *Streptococcus pneumoniae* contributes to strain-strain variation in virulence. *PLoS One* 2011; 6(5):e19650.

Hausdorff WP. The roles of pneumococcal serotypes 1 and 5 in paediatric invasive disease. *Vaccine* 2007; 25(13): 2406-12.

Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000; 30(1): 100-21.

Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect Dis* 2005; 5(2): 83-93.

Hava DI, Camilli A. Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol Microbiol* 2002; 45(5): 1389–1406.

Heinemann PG. *A Laboratory Guide in Bacteriology, for the Use of Students, Teachers, and Practitioners*. Kite Press, 2008. ISBN: 1409729672, 9781409729679.

Henriques-Normark B, Kalin M, Ortqvist A, Akerlund T, Liljequist BO, Hedlund J, et al. Dynamics of penicillin-susceptible clones in invasive pneumococcal disease. *J Infect Dis* 2001; 184(7):861–9.

Hill PC, Akisanya A, Sankareh K, Cheung YB, Saaka M, Lahai G et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Gambian villagers. *Clin Infect Dis* 2006; 43(6): 673-9.

Hilleringmann M, Giusti F, Baudner BC, Massignani V, Covacci A, Rappuoli R, et al. Pneumococcal pili are composed of protofilaments exposing adhesive clusters of Rrg A. *PLoS Pathog* 2008; 4(3): e1000026.

Holliman R, Liddy H, Johnson J, Adjei O. Epidemiology of invasive pneumococcal disease in Kumasi, Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101(4): 405–13.

Hussain M, Melgaro A, Pebody RG, George R, Edmunds WJ, Talukar R. et al. A longitudinal household study of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6(4):288-301

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): 704-15.

## I

Imöhl M, Reinert RR, van der Linden M. Temporal variations among invasive pneumococcal disease serotypes in children and adults in Germany (1992-2008). *Int J Microbiol* 2010; 2010: 874189.

Isaacman DJ, Fletcher MA, Fritzell B, Ciuryla V, Schranz J. Indirect effects associated with widespread vaccination of infants with heptavalent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7; Prevnar). *Vaccine* 2007; 25(13): 2420-7.

Isaacman DJ, McIntosh ED, Reinert RR. Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *Int J Infect Dis* 2010; 14(3): e197-209.

## J

Jenkins SG, Brown SD, Farrell DJ. Trends in antibacterial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA: update from PROTEKT US Years 1-4. *Ann Clin Microbiol Antimicrobiol* 2008; 7: 1

## K

Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6(4): 288-301.

Kaplan SL, Barson WJ, Lin PL, Stovall SH, Bradley JS, Tan TQ, et al. Serotype 19A is the most common serotype causing invasive pneumococcal infections in children. *Pediatrics* 2010; 125(3): 429-436.

Keith ER, Podmore RG, Anderson TP, Murdoch DR. Characteristics of *Streptococcus pseudopneumoniae* isolated from purulent sputum samples. *J Clin Microbiol* 2006; 44(3):923-927.

Kellner JD, Vanderkooi OG, MacDonald J, Church DL, Tyrrell GJ, Scheifele DW. Changing epidemiology of invasive pneumococcal disease in Canada, 1998-2007: update from the Calgary-area *Streptococcus pneumoniae* research (CASPER) study. *Clin Infect Dis* 2009; 49(2): 205-12

Klugman KP, Madhi SA, Huebner RE, Kohberger N, Pierce N; Vaccine Trialists Group. A trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with and those without HIV infection. *N Engl J Med* 2003; 349(14): 1341-8.

## L

Lahti E, Mertsola J, Kontiokari T, Eerola E, Ruuskanen O, Jalava J. Pneumolysin polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia and empyema in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25(12): 783-9.

Lawrence ER, Griffiths DB, Martin SA, George RC, Hall LM. Evaluation of semiautomated multiplex PCR assay for determination of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and serogroups. *J Clin Microbiol* 2003; 41(2): 601-7.

Lehmann D, Willis J, Moore HC, Giele C, Murphy D, Keil AD, et al. The changing epidemiology of invasive pneumococcal disease in aboriginal and non-aboriginal western Australians from 1997 through 2007 and emergence of nonvaccine serotypes. *Clin Infect Dis* 2010; 50(11): 1477-86.

Le Monnier A, Carbonnelle E, Zahar JR, Le Bourgeois M, Abachin E, Quesne G, et al. Microbiological diagnosis of empyema in children: comparative evaluations by culture, polymerase chain reaction, and pneumococcal antigen detection in pleural fluids. *Clin Infect Dis* 2006; 42(8): 1135-40.

Llull D, López R, García E. Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a basis for rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections. *J Clin Microbiol* 2006; 44(4): 1250-6.

Lynch JP 3rd, Zhanel GD. *Streptococcus pneumoniae*: Epidemiology, Risk Factors, and Strategies for Prevention. *Semin Respir Crit Care Med* 2009; 30(2): 189-219. (a)

Lynch JP 3rd, Zhanel GG. *Streptococcus pneumoniae*: Does antimicrobial resistance matter?. *Semin Respir Crit Care Med* 2009; 30(2): 210-238. (b)

## M

Marimon JM, Ercibengoa M, Alonso M, Zubizarreta M, Pérez-Trallero E. Clonal structure and 21-year evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 isolates in northern Spain. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(9): 875-7.

Marimon JM, Monasterio A, Ercibengoa M, Pascual J, Prieto I, Simón L, Perez-Trallero E. Antibody microarray typing, a novel technique for *Streptococcus pneumoniae* serotyping. *J Microbiol Methods* 2010; 80(3):274-80.

Matos Jde A, Madureira DJ, Rebelo MC, Hofer CB, Barroso DE. Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* meningitis by polymerase chain reaction amplification of the gene for pneumolysin. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(5): 559-63.

McAvin JC, Reilly PA, Roudabush RM, Barnes WJ, Salmen A, Jackson GW, et al. Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39(10):3446-51.

McGee L, McDougal L, Zhou J, Spratt BG, Tenover FC, George R, et al. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. *J Clin Microbiol* 2001; 39(7): 2565-71.

Mehiri-Zghal E, Decousser JW, Mahjoubi W, Essalah L, El Marzouk N, Ghariani A, et al. Molecular epidemiology of a *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 outbreak in a Tunisian jail. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 66(2): 225-7.

Melin M, Trzciński K, Meri S, Käyhty H, Väkeväinen M. The capsular serotype of *Streptococcus pneumoniae* is more important than the genetic background for resistance to complement. *Infect Immun* 2010; 78(12): 5262-70.

Millar EV, Watt JP, Bronsdon MA, Dallas J, Reid R, Santosham M, O'Brien KL. Indirect effect of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal colonization among unvaccinated household members. *Clin Infect Dis* 2008; 47(8): 989-96.

Mithcell AM, Mithcell TJ. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(5): 411-418.

Moore MR, Gertz RE Jr, Woodbury RL, Barkocy-Gallagher GA, Schaffner W, Lexau C et al. Population Snapshot of emergent *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in the United States. J Infect Dis 2008; 197(7): 1016-1027.

Morais L, Carvalho Mda G, Roca A, Flannery B, Mandomando I, Soriano-Gabarró M, et al. Sequential multiplex PCR for identifying pneumococcal capsular serotypes from South-Saharan African clinical isolates. J Med Microbiol 2007; 56(Pt 9): 1181-4.

Moschioni M, Donati C, Muzzi A, Masignani V, Censini S, Hanage WP, et al. *Streptococcus pneumoniae* contains 3 rlrA pilus variants that are clonally related. J Infect Dis 2008; 197(6): 888-96.

Moschioni M, Emolo C, Biagini M, Maccari S, Pansegrau W, Donati C, et al. The two variants of *Streptococcus pneumoniae* pilus-1 RrgA adhesin retain the same function and elicit cross-protection in vivo. Infect Immun 2010; 78(12): 5033-42.

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(2):174-82.

Muñoz-Almagro C, Esteva C, de Sevilla MF, Selva L, Gene A, Pallares R. Emergence of invasive pneumococcal disease caused by multidrug-resistant serotype 19A among children in Barcelona. J Infect 2009; 59(2):75-82.

Muñoz-Almagro C, Gala S, Selva L, Jordan I, Tarrago D, Pallares R. DNA bacterial load in children and adolescents with pneumococcal pneumonia and empyema. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011; 30(3): 327-35.

Musher DM, Phan HM, Baughn RE. Protection against bacteremic pneumococcal infection by antibody to pneumolysin. J Infect Dis 2001; 183(5): 827-30.

## N

Nunes S, Sa-Leao R, Carrico J. Trends in drug resistance, serotypes, and molecular types of *Streptococcus pneumoniae* colonizing preschool-age children attending day care centers in Lisbon, Portugal: a summary of 4 years of annual surveillance. J Clin Microbiol 2005; 43(3): 1285-1293.

Nunes S, Sá-Leão R, Pereira LC, Lencastre H. Emergence of a serotype 1 *Streptococcus pneumoniae* lineage colonising healthy children in Portugal in the seven-valent conjugate vaccination era. Clin Microbiol Infect 2008; 14(1): 82-4.

## O

O'Brien KL, Dagan R. The potential indirect effect of conjugate pneumococcal vaccines. Vaccine 2003; 21(17-18): 1815-25.

O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. Lancet 2009; 374(9693): 893-902.

Obando I, Muñoz-Almagro C, Arroyo LA, Tarrago D, Sanchez-Tatay D, Moreno-Perez D, et al. Pediatric parapneumonic empyema, Spain. Emerg Infect Dis 2008; 14(9): 1390-1397.

Obert C, Sublett J, Kaushal D, Hinojosa E, Barton T, Tuomanen EI, et al. Identification of a Candidate *Streptococcus pneumoniae* core genome and regions of diversity correlated with invasive pneumococcal disease. Infect Immun 2006; 74(8): 4766-77.

Ogami M, Hotomi M, Togawa A, Yamanaka N. A comparison of conventional and molecular microbiology in detecting differences in pneumococcal colonization in healthy children and children with upper respiratory illness. *Eur J Pediatr* 2010; 169(10): 1221-1225

Orihuela CJ, Radin JN, Sublett JE, Gao G, Kaushal D, Tuomanen EI. Microarray analysis of pneumococcal gene expression during invasive disease. *Infect Immun* 2004; 72(10): 5582-96.

## P

Pai R, Gertz RE, Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol* 2006; 44(1): 124-31.

Park SY, Van Beneden CA, Pilishvili T, Martin M, Facklam RR, Whitney CG; Active Bacterial Core surveillance team. Invasive pneumococcal infections among vaccinated children in the United States. *Pediatr* 2010; 156(3): 478-483.

Pérez-Trallero E, Marimón JM, Gonzalez A, Iglesias L. Spain14-5 international multiresistant *Streptococcus pneumoniae* clone resistant to fluoroquinolones and other families of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51(3): 715-9.

Pérez-Trallero E, Martín-Herrero JE, Mazón A, García-Delafuente C, Robles P, Iriarte V, et al.; Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Antimicrobial resistance among respiratory pathogens in Spain: latest data and changes over 11 years (1996-1997 to 2006-2007). *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(7): 2953-9.

Picazo J, Ruiz-Contreras J, Casado-Flores J, Giangaspro E, Del Castillo F, Hernández-Sampelayo T, et al.; Heracles Study Group. Relationship between serotypes, age, and clinical presentation of invasive pneumococcal disease in Madrid, Spain, after introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine into the vaccination calendar. *Clin Vaccine Immunol* 2011; 18(1): 89-94. (a)

Picazo J, Ruiz-Contreras J, Hernandez B, Sanz F, Gutierrez A, Cercenado E, et al. Clonal and clinical profile of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A causing pediatric invasive infections: A 2-year (2007-2009) laboratory-based surveillance in Madrid. *Vaccine* 2011; 29(9): 1770-6. (b)

Pilishvili T, Lexau C, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, et al.; Active Bacterial Core Surveillance/Emerging Infections Program Network. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *J Infect Dis* 2010; 201(1): 32-41.

Price KE, Camilli A. Pneumolysin localizes to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 2009; 191(7): 2163-8.

## R

Rajalakshmi B, Kanungo R. Cost-effective method of serotyping *Streptococcus pneumoniae* using staphylococcal co-agglutination. *Indian J Med Microbiol* 2001; 19(4): 197-200.

Regev-Yochay G, Raz M, Dagan R. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by adults and children in community and family settings. *Clin Infect Dis* 2004; 38(5): 632-639.

Reinert R, Jacobs MR, Kaplan SL. Pneumococcal disease caused by serotype 19A: review of the literature and implications for future vaccine development. *Vaccine* 2010; 28(26): 4249-59.

Resti M, Micheli A, Moriondo M, Beccioli L, Cortimiglia M, Canessa C, et al. Comparison of the effect of antibiotic treatment on the possibility of diagnosing invasive pneumococcal disease by culture or molecular methods: a prospective, observational study of children and adolescents with proven pneumococcal infection. *Clin Ther* 2009; 31(6): 1266-73.



Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Beekman SE, Doern GV. Changing epidemiology of antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 2004–2005. *Clin Infect Dis* 2009; 48(3): e23–e33.

Roca A, Sigaúque B, Quintó L, Mandomando I, Vallès X, Espasa M, et al. Invasive pneumococcal disease in children <5 years of age in rural Mozambique. *Trop Med Int Health* 2006; 11(9): 1422-31.

Rodrigues F, Nunes S, Sá-Leão R, Gonçalves G, Lemos L, de Lencastre H. *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in children attending day-care centers in the central region of Portugal, in the era of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Microb Drug Resist* 2009; 15(4): 269-77.

Rose L, Shivshankar P, Hinojosa E, Rodriguez A, Sanchez CJ, Orihuela CJ. Antibodies against PsrP, a novel *Streptococcus pneumoniae* adhesin, block adhesion and protect mice against pneumococcal challenge. *J Infect Dis* 2008; 198(3): 375-383.

Rückinger S, von Kries R, Siedler A, van der Linden M. Association of serotype of *Streptococcus pneumoniae* with risk of severe and fatal outcome. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28(2): 118-22.

## S

Saha SK, Darmstadt GL, Baqui AH, Hossain B, Islam M, Foster D, et al. Identification of serotype in culture negative pneumococcal meningitis using sequential multiplex PCR: implication for surveillance and vaccine design. *PLoS One* 2008; 3(10): e3576.

Saha S, Darmstadt G, Naheed A, Arifeen S, Islam M, Fatima K, et al. Improving the Sensitivity of Blood Culture for *Streptococcus pneumoniae*. *J Trop Pediatr* 2011; 57(3): 192-6.

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(11): 997-1001.

Sanchez CJ, Shivshankar P, Stol K, Trakhtenbroit S, Sullam PM, Sauer K, et al. The pneumococcal serine-rich repeat protein is an intra-species bacterial adhesin that promotes bacterial aggregation in vivo and in biofilms. *PLoS Pathog* 2010; 6(8): e1001044.

Sánchez-Beato AR, López R, García JL. Molecular characterization of PcpA: a novel choline-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 164(1): 207-14.

Sanz JC, Culebras E, Ríos E, Rodríguez-Avial I, Wilhelmi I, Ramos B, et al. Direct serogrouping of *Streptococcus pneumoniae* strains in clinical samples by use of a latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 2010; 48(2):593-5.

Selva L, Esteva C, Gené A, de Sevilla MF, Hernandez-Bou S, Muñoz-Almagro C. Direct detection of *Streptococcus pneumoniae* in positive blood cultures by real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 66(2): 204-6.

Sessegolo JF, Levin AS, Levy CE, Asensi M, Facklam RR, Teixeira LM. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Brazil from 1988 to 1992. *J Clin Microbiol* 1994; 32(4): 906-11.

Shivshankar P, Sanchez C, Rose LF, Orihuela CJ. The *Streptococcus pneumoniae* adhesin PsrP binds to keratin 10 on lung cells. *Mol Microbiol* 2009; 73(4): 663-79.

Siberry G, Brahmadathan KN, Pandian R, Lalitha MK, Steinhoff MC, John TJ. Comparison of different culture media and storage temperatures for the long-term preservation of *Streptococcus pneumoniae* in the tropics. *Bull World Health Organ* 2001; 79(1):43-7.

Singleton RJ, Hennessy TW, Bulkow LR, Hammitt LL, Zulz T, Hurlburt DA, et al. Invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes among Alaska native children with high levels of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine coverage. *JAMA* 2007; 297(16): 1784-92.

Simões AS, Sá-Leão R, Eleveld MJ, Tavares DA, Carriço JA, Bootsma HJ, et al. Highly penicillin-resistant multidrug-resistant pneumococcus-like strains colonizing children in Oeiras, Portugal: genomic characteristics and implications for surveillance. *J Clin Microbiol* 2010; 48(1): 238-246.

## T

Tarrago D, Fenoll A, Sánchez-Tatay D, Arroyo LA, Muñoz-Almagro C, Esteva Ce tal. Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(9): 828-34.

Tomasz, A. *Streptococcus pneumoniae: Molecular Biology and Mechanisms of Disease*. Larchmont, NY : Mary Ann Liebert, Inc., 2000. ISBN: 0585225621

Tomita Y, Okamoto A, Yamada K, Yagi T, Hasegawa Y, Ohta M. A new microarray system to detect *Streptococcus pneumoniae* serotypes. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 352736.

Trotter CL, Waight P, Andrews NJ, Slack M, Efstratiou A, George Ret al. Epidemiology of invasive pneumococcal disease in the pre-conjugate vaccine era: England and Wales, 1996-2006. *J Infect* 2010; 60(3): 200-8.

Tsigrelis C, Theyjeh IM, Huskins WC, Lahr BD, Nyre LM, Virk A, et al. Incidence of invasive pneumococcal disease among children after introduction of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Mayo Clinic Proc* 2009; 84(10): 871-5.

Tuomanen EI, Austrian R, Masure HR. Pathogenesis of pneumococcal infection. *N Engl J Med* 1995; 332(19): 1280-1284.

## V

Vainio A, Lyytikäinen O, Sihvonen R, Kaijalainen T, Teirilä L, Rantala M, et al. An outbreak of pneumonia associated with *S. pneumoniae* at a military training facility in Finland in 2006. *APMIS* 2009; 117(7): 488-91.

Van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* 2009; 374(9700): 1543-1546.

Vestrheim DF, Løvoll O, Aaberge IS, Caugant DA, Høiby EA, Bakke H, et al. Effectiveness of a 2+1 dose schedule pneumococcal conjugate vaccination programme on invasive pneumococcal disease among children in Norway. *Vaccine* 2008; 26(26): 3277-81.

Vila-Corcoles A, Ochoa-Gondar O, Guzmán JA, Rodríguez-Blanco T, Salsench E, Fuentes CM; EPIVAC Study Group. Effectiveness of the 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine against invasive pneumococcal disease in people 60 years or older. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 73.

Vila-Corcoles A, Ochoa-Gondar O, Hospital I, Ansa X, Vilanova A, Rodríguez T, Llor C; EVAN Study Group. Protective effects of the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in the elderly population: the EVAN-65 study. *Clin Infect Dis* 2006; 43(7):860-8.

## W

Wang Q, Wang M, Kong F, Gilbert GL, Cao B, Wang L, et al. Development of a DNA microarray to identify the *Streptococcus pneumoniae* serotypes contained in the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine and closely related serotypes. J Microbiol Methods 2007; 68(1):128-36.

Weatherholtz R, Millar EV, Moulton LH, Reid R, Rudolph K, Santosham M et al. Invasive pneumococcal disease a decade after pneumococcal conjugate vaccine use in an American Indian population at high risk for disease. Clin Infect Dis 2010; 50(9): 1238-46.

Wenger JD, Zulz T, Bruden D, Singleton R, Bruce MG, Bulkow L, et al. Invasive pneumococcal disease in Alaskan children: impact of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine and the role of water supply. Pediatr Infect Dis J 2010; 29(3): 251-6.

Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Lynfield R, et al.; Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. N Engl J Med 2003; 348(18): 1737-46.

Williams EJ, Thorson S, Maskey M, Mahat S, Hamaluba M, Dongol S, et al. Hospital-based surveillance of invasive pneumococcal disease among young children in urban Nepal. Clin Infect Dis 2009; 48(Suppl 2): S114-22.

## Z

Zhang Y, Isaacman DJ, Wadowsky RM, Rydquist-White J, Post JC, Ehrlich GD. Detection of *Streptococcus pneumoniae* in whole blood by PCR. J Clin Microbiol 1995; 33(3): 596-601.