



TESIS DOCTORAL

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

FACULTAD DE MEDICINA

**Infección invasiva por *Streptococcus pneumoniae*
tras la introducción de la
vacuna heptavalente antineumocócica**

**M^a Teresa Pérez Rodríguez
Diciembre 2012**



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**Infección invasiva por *Streptococcus pneumoniae*
tras la introducción de la vacuna heptavalente antineumocócica**

Memoria que, para optar al grado de Doctor
por la Universidad de Santiago de Compostela, presenta

M^a Teresa Pérez Rodríguez

Santiago de Compostela, diciembre 2012



Dr. Don Maximiliano Álvarez Fernández, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor externo del Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Vigo, Médico adjunto del Servicio de Microbiología del Complejo Hospitalario Universitario de Vigo y director de la presente Tesis Doctoral,

Dr. Don César Martínez Vázquez, Doctor en Medicina y Cirugía, Jefe de Servicio de Medicina Interna del Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, Profesor asociado del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela y director de la presente Tesis Doctoral,

Dr. Don Bernardo Sopeña Pérez-Argüelles, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor asociado del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela y director de la presente Tesis Doctoral,

Dr. Don Arturo González Quintela, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, Jefe de Sección de Medicina Interna del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela y director de la presente Tesis Doctoral,

CERTIFICAN:

Que Dña. M^a Teresa Pérez Rodríguez, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección la presente Tesis Doctoral, titulada **Infeción invasiva por *Streptococcus pneumoniae* tras la introducción de la vacuna heptavalente antineumocócica**, siguiendo la metodología científica, exponiendo los resultados de forma rigurosa y precisa, y que las conclusiones son concordantes con los resultados obtenidos.

Por todo ello, consideramos que el mencionado trabajo reúne las condiciones de metodología formal y originalidad para ser defendido ante un Tribunal para la obtención del grado de Doctor. Y para que así conste, a todos los efectos oportunos, expedimos y firmamos la presente certificación en Santiago de Compostela a 3 de diciembre de 2012.

Maximiliano Álvarez Fernández

César Martínez Vázquez

Arturo González Quintela

Bernardo Sopeña Pérez-Argüelles



AGRADECIMIENTOS

Han sido muchos meses de intenso trabajo en los que he contado con la ayuda y el apoyo de muchísimas personas.

A mis padres, por su valor al haberme concedido la vida y por haberme enseñado el valor del trabajo bien hecho, hasta en los últimos detalles.

A mi familia, compañeros del Hospital y amigos por su paciencia, sus sabios consejos y por sus ánimos en los momentos difíciles de esta aventura.

A mis directores de tesis. Maxi, sin el que no me imagino este trabajo y que ha sido más que un director. César padre de la idea de esta tesis, origen de la escuela de excelencia clínica en el Servicio de Medicina Interna. Bernardo, que me inició de manera fabulosa en el trabajo de investigación y que es y seguirá siendo un referente profesional. Arturo, que me metió el “gusanillo” por la Medicina Interna y por la docencia.

A Lucía Constenla, por ser tan buena profesional, mejor persona y excelente amiga.

A Yoli sin ella la revisión bibliográfica habría sido casi imposible.

A Enrique Fluiters y, sobretudo, a M^a Ángeles Casado que han sido fundamentales en la parte metodológica y en el estudio estadístico.

A Susana Méndez, por su colaboración desinteresada en el serotipado de algunos neumococos.

Finalmente, agradecer a la Fundación VIGO-SIDA su respaldo financiero, ya que sin su ayuda este trabajo no habría salido adelante.



DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS

CONGRESOS

- MT Pérez Rodríguez, C Martínez Vázquez, L González, M Soneira, M Álvarez, JL Lamas, R Longueira, B Sopeña. *Infección invasiva por S. pneumoniae: resistencia antimicrobiana en el sur de Galicia*. Comunicación oral. XXIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Interna. A Coruña, Noviembre de 2008.
- MT Pérez-Rodríguez, C Martínez-Vázquez, M Álvarez-Fernández, L Constenla Caramés, R Longueira Suárez, JL Lamas Ferreiro. *Infección invasiva por Streptococcus pneumoniae: evolución de CMI a levofloxacino entre 1992-2008 y estudio de mutación en parC*. Póster. XIV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Barcelona, mayo de 2010.
- M Pérez Rodríguez, C Martínez-Vázquez, M Álvarez Fernández, L Constenla, N Pazos, A Argibay, B Maure. *Infección invasiva por Streptococcus pneumoniae: influencia de la vacuna conjugada heptavalente en la tasa de resistencia a macrólidos*. Póster. XXXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Interna. Oviedo, noviembre de 2010.
- Pérez-Rodríguez MT, Martínez-Vázquez C, Constenla L, Argibay A, Nodar A, Portela D, Sopeña B, Álvarez-Fernández M. *Epidemiological and microbiological characteristics of invasive S. pneumoniae infection in the south of Galician, Spain, before and after the introduction of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine*. Póster. 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. London, 31 March-3 April 2012.



ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	15
INTRODUCCIÓN	17
1.1. RESEÑA HISTÓRICA Y PERSONAJES DESTACADOS.....	21
1.2. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE.....	29
1.2.1. Estructura y fisiología.....	29
1.2.2. Virulencia	32
1.2.3. Métodos de identificación	33
1.3. EPIDEMIOLOGÍA	33
1.3.1. Incidencia: Magnitud del problema.....	34
1.3.2. Prevención: Vacunación.....	35
1.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	41
1.4.1. Enfermedad invasiva por <i>S. pneumoniae</i>	41
1.4.2. Relación entre el serotipo y la enfermedad invasiva.....	45
1.4.3. Factores de riesgo de la enfermedad invasiva.....	45
1.5. RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS	46
1.5.1. Penicilina	46
1.5.2. Macrólidos	49
1.5.3. Fluoroquinolonas	50
OBJETIVOS	57
2.1 PRIMARIOS.....	59
2.2 SECUNDARIOS.....	59

MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
3.1. DEFINICIONES	63
3.2. POBLACIÓN A ESTUDIO	64
3.3. AISLAMIENTOS BACTERIANOS	64
3.4. IDENTIFICACIÓN Y SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS	66
3.5. EXTRACCIÓN DEL ADN	67
3.6. METODOLOGÍA COMÚN DE LAS PCR	67
3.7. DETECCIÓN DE MUTACIONES EN parC Y gyrA.....	68
3.8. DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE ermB Y mefA.....	69
3.9. BOMBA DE EXPULSIÓN DE FLUOROQUINOLONAS	69
3.10. SEROTIPADO	70
3.10.1. Clasificación de los serotipos	72
3.11. ANÁLISIS CLONAL EMPLEANDO GENOTIPADO BOX-A.....	72
3.12. TIPADO MOLECULAR MEDIANTE MLST.....	72
3.13. ESTUDIO ESTADÍSTICO	73
RESULTADOS.....	75
4.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES.....	77
4.2. FORMAS DE PRESENTACIÓN CLÍNICA	81
4.2.1. Neumonía.....	82
4.2.2. Bacteriemia primaria.....	85
4.2.3. Meningitis	88
4.2.4. Empiema	90
4.3. EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES CON EISP	92
4.3.1. Ingreso en UCI	92
4.3.2. Mortalidad	93
4.3.3. EISP recurrente	93

4.4.	SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS	94
4.4.1.	Betalactámicos	94
4.4.2.	Macrólidos	96
4.4.3.	Fluoroquinolonas	96
4.4.4.	Multirresistentes	98
4.5.	TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO	99
4.6.	VARIACIÓN DE LOS SEROTIPOS	100
4.6.1.	Serotipos vacunales	103
4.6.2.	Serotipos invasivos y no invasivos	104
4.6.3.	Serotipos pediátricos	107
4.6.4.	Serotipo 19A	107
4.7.	VACUNACIÓN	113
DISCUSIÓN		115
5.1.	CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES	117
5.2.	FORMAS DE PRESENTACIÓN CLÍNICA	120
5.2.1.	Neumonía	121
5.2.2.	Bacteriemia primaria	123
5.2.3.	Meningitis	124
5.2.4.	Empiema	126
5.3.	EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES CON EISP	127
5.3.1.	Ingreso en UCI	128
5.3.2.	Mortalidad	129
5.3.3.	EISP recurrente	130
5.4.	SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS Y TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO	132
5.5.	VARIACIÓN DE LOS SEROTIPOS	138
5.6.	SEROTIPO 19A	142

5.7. LIMITACIONES	145
CONCLUSIONES	147
BIBLIOGRAFÍA	151



Lista de abreviaturas

ACV: accidente cerebro vascular

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADVP: adicto a drogas por vía parenteral

ARNr: ácido ribonucleico ribosómico

AUC: área bajo la curva

CCs: complejos clonales

CDC: Centres of Disease Control

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CM: clindamicina

CMI: concentración mínima inhibitoria

CP: ciprofloxacino

CT: cefotaxima

DDF: dosis distribuidas en farmacia

DT: desviación típica

EISP: enfermedad invasiva por *S. pneumoniae*

EM: eritromicina

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

IC: intervalo de confianza

ICC: insuficiencia cardíaca congestiva

IOT: intubación orotraqueal

LCR: líquido cefalorraquídeo

LE: levofloxacino

MLST: Multi Locus Sequence Typing

OR: odds ratio

PBP: Penicillin Binding Protein

PCR: Polymerase chain reaction

PE: penicilina

QRDR: Quinolone Resistance Determining Region

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

SERGAS: Servicio Galego de Saúde

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SNV: serotipo no vacunal

SV: serotipo vacunal

TARGA: tratamiento antirretroviral de gran actividad

UCI: unidad de cuidados intensivos

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VPC: vacuna polivalente conjugada

VPP: vacuna polivalente de polisacárido





INTRODUCCIÓN



Streptococcus pneumoniae es una de las más de 30 especies del género *Streptococcus*, constituido por un grupo heterogéneo de bacterias Gram-positivas, de morfología microscópica esférica u ovoide, no formadoras de esporas, que crecen en parejas o cadenas de diferente longitud y que presentan requisitos nutricionales complejos. La mayoría de estas bacterias son anaerobias facultativas, si bien, algunas son anaerobias estrictas.

Para la clasificación de los microorganismos que conforman este género se tienen en cuenta una combinación de diferentes cualidades: patrones de hemólisis observados en placas de agar-sangre, la composición antigénica de la pared celular, las características de crecimiento, el perfil bioquímico y el análisis genético.

Las colonias de estreptococos pueden presentar tres tipos de hemólisis en agar-sangre. Las betahemolíticas se encuentran rodeadas por una zona incolora, reflejo de la lisis de hematíes; siendo representativo del mismo *S. pyogenes*. Las colonias alfa hemolíticas o con hemólisis parcial, están rodeadas por un halo verdoso, este color refleja la degradación de la hemoglobina formando un pigmento verde, comportándose de este modo el *S. pneumoniae*. La enzima responsable de esta degradación es la neumolisina (previamente denominada hemolisina). En sentido estricto no se trata de un tipo de hemólisis, ya que no se produce la lisis de los glóbulos rojos. Este hecho se pone de manifiesto cuando *S. pneumoniae* se cultiva en agar-chocolate, que contiene glóbulos rojos lisados durante la preparación del agar, en el que las colonias de neumococo presentan un halo amarillo-verdoso. Por último, el término γ -hemólisis sirve para designar a las cepas no hemolíticas, preferiblemente denominadas *Streptococci no hemolíticos*.

El descubrimiento de las diferencias antigénicas en los carbohidratos de la pared celular de los estreptococos betahemolíticos sirvió a Rebecca Lancefield (Imagen 1), a principios de la década de 1930-40, para clasificar estos microorganismos en serogrupos (1). Los antígenos específicos de grupo se extraen fácilmente de las paredes celulares y se identifican mediante reacciones de precipitina con antisueros específicos. Hasta ahora se han identificado diferentes serogrupos denominándose de la A hasta H y de la K hasta V. Los grupos A, B, C, D y G son los que con más frecuencia se aíslan en muestras biológicas humanas. Aunque este sistema se utilizó originariamente para la identificación de los estreptococos betahemolíticos, también se han utilizado para la clasificación de ciertas cepas alfa hemolíticas y de los estreptococos no hemolíticos, que también contienen antígenos específicos de grupo.



Imagen 1: Rebecca C. Lancefield (1895-1981)

1.1. RESEÑA HISTÓRICA Y PERSONAJES DESTACADOS



Imagen 2: Edwin Klebs (1834-1913)

Aunque fue el físico y patólogo alemán Theodor Albrecht Edwin Klebs (Imagen 2) quien describió en 1875 por primera vez unos diplococos alargados en muestras de tejido pulmonar procedentes de pacientes fallecidos por neumonía (2), el potencial patogénico de este microorganismo no se demostró hasta 6 años después. Esto se realizó de forma independiente y simultánea por el médico militar George M. Sternberg (Imagen 3) en los Estados Unidos y por el químico Louis Pasteur (Imagen 3)

en Francia. Tras aislar este microorganismo en saliva humana e inyectarla en conejos lograron provocar un cuadro séptico fatal, aislando posteriormente este microorganismo en la sangre de estos animales. Este descubrimiento motivó su primera denominación, *Microbe septicemique du salive* (3) y *Micrococcus pasteurii* (4).

Entre 1883-1885 se estableció su papel etiológico en la neumonía lobar lo que llevó al bacteriólogo alemán, Albert Fraenkel (Imagen 4) a otorgarle en 1886 el nombre de *Pneumococcus* (5). En 1920 un comité de "The Society of American



Imagen 3: George M. Sternberg (1838-1915) y Louis Pasteur (1822-95)

Bacteriologists” lo denominó *Diplococcus pneumoniae*, por su disposición en parejas (6). Finalmente, en 1974 RH Deibel y HW Jr Seeley le asignaron el nombre actual, *Streptococcus pneumoniae*, por su característico crecimiento en medios líquidos (7).

En la década de 1880-90 además del papel etiológico de este microorganismo en la neumonía lobar (8-11), se demostró que *S. pneumoniae* también era responsable de algunos casos de meningitis (12) y de otitis media (13).

Uno de los hechos más destacados en el conocimiento de este microorganismo es su estrecha relación con la historia de la microbiología, la inmunología, e incluso con la biología molecular (14).

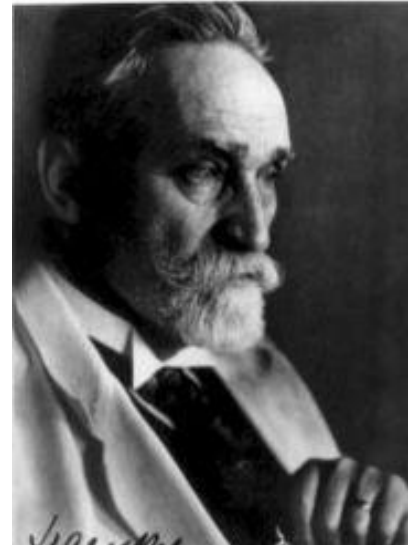


Imagen 4: Albert Faenkel (1864-1938)



Imagen 5: Hans C. Gram (1853-1938)

Tinción de Gram. En 1884 el danés Hans Christian Gram (Imagen 5) publicó los resultados de sus estudios en técnicas de visualización de bacterias en muestras histológicas. Estas técnicas, que en la actualidad llevan su nombre, son la base de la microbiología, ya que dividen a la mayoría de los microorganismos en Gram-positivos o Gram-negativos.

Estudiando el tejido pulmonar de pacientes fallecidos por neumonía encontró múltiples cocos alargados en parejas que se teñían con violeta de genciana. Se refirió a estos microorganismos como “the cocci of

croupous pneumonia” (15). De esta forma, el neumococo fue la primera bacteria patógena observada mediante los estudios con tinción de Gram.

Inmunidad humoral, cápsula bacteriana y fagocitosis. En la década de 1890-1900, Félix y Georg Klemperer demostraron que el suero procedente de conejos, a los que previamente les habían inyectado neumococos muertos por calor o un filtrado de factores procedentes del caldo de cultivo, confería inmunidad a estos animales frente a la reexposición de ese mismo tipo de neumococo, pero no necesariamente frente a otros (16, 17). Otro descubrimiento realizado también por estos investigadores, fue demostrar que la infusión de suero de conejos previamente inmunizados confería protección primaria frente a la infección por neumococo (16, 17).

Poco después, Issaëff demostró que el efecto protector del suero no se producía por una acción bactericida, sino que éste hacía que las células fagocíticas del sistema inmune captaran con mayor facilidad a los neumococos (18). Sin embargo, el primero en describir el fenómeno de la fagocitosis fue el ruso Elie Metchnikoff (Imagen 6), tras la observación de la aglutinación de los neumococos con antisuero (19).



Imagen 6: Elie Metchnikoff (1845-1916)



Imagen 7: Fred Neufeld (1869-1945)

Otro personaje clave en el estudio de *S. pneumoniae* y en el desarrollo de la inmunología fue Fred Neufeld (Imagen 7), que inicialmente trabajó como asistente de Robert Kohk. Neufled describió la solubilidad en bilis de este microorganismo, que constituye en la actualidad una de las técnicas de identificación de este microorganismo. En 1902 publicó un trabajo en el que demostraba, que tras la adición de un antisuero específico a una suspensión de neumococos se producía una aglutinación macroscópica y una edematización (*quellung* en alemán) específica de la cápsula externa, visible microscópicamente (20). Esto proporcionó una técnica simple para el serotipado que continúa utilizándose en la actualidad y que se denomina reacción de Quellung.

La aparente discrepancia entre la inmunidad celular y humoral fue resuelta dos años más tarde, cuando F. Neufeld y Wolff Rimpau demostraron que la fagocitosis de los neumococos se veía facilitada por la exposición de la bacteria, no de los leucocitos, al suero de un animal previamente inmunizado (21). En este fenómeno, denominado actualmente opsonización (del griego “preparar la comida”), las bacterias son recubiertas por componentes del complemento y por inmunoglobulinas facilitando así la captación mediada por el receptor Fc por las células fagocíticas. Todas estas observaciones proporcionaron las bases de lo que en la actualidad denominamos inmunidad humoral y han hecho de este microorganismo el prototipo de patógeno bacteriano extracelular.

La prueba definitiva de la importancia de la cápsula de *S. pneumoniae* en la virulencia fue establecida por dos investigadores del Hospital of the Rockefeller Institute for Medical Research, René Dubos y Oswald Avery (Figura 8) en 1931. Describieron la técnica para eliminar, mediante un enzima específico (denominado enzima SIII), el polisacárido capsular del serotipo 3, demostrando así

la relación entre dicho polisacárido y el serotipo. Posteriormente, utilizaron esta enzima en ratones infectados por neumococos serotipo 3, evitando así una evolución fatal (22, 23).

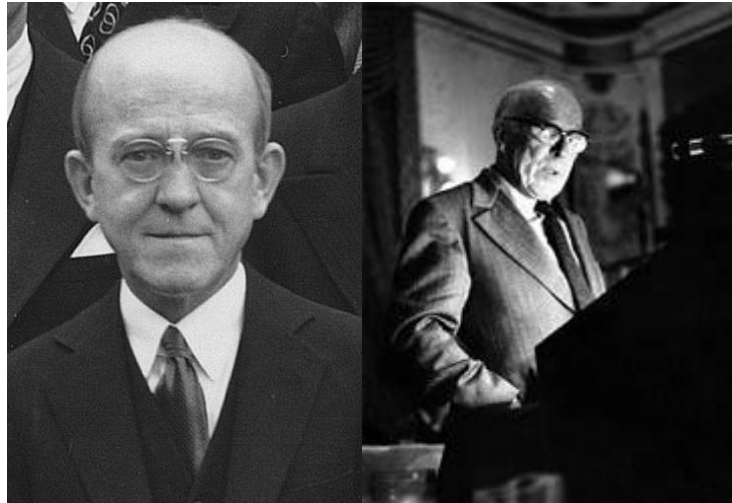


Figura 8: Oswald Avery (1877-1955) y René Dubos (1901-82)

Serotipado. El descubrimiento de que la inyección de neumococos en los conejos presentaba un efecto inmunizante facilitó el desarrollo de un sistema elemental de tipado para estas bacterias. Nuevamente, F. Neufeld et al clasificaron los aislamientos procedentes de pacientes con neumonía neumocócica confirmada en dos grupos, que denominaron tipo I o tipo II, basándose en si los aislados eran capaces de matar o no a los ratones previamente inmunizados (24). Además estos autores correlacionaron estos resultados con los obtenidos mediante las reacciones de aglutinación. Posteriormente, Alphonse R. Dochez (Figura 9) y Gillespie ampliaron estos grupos añadiendo un tercer y un cuarto serotipo (25). Los aislados de los tres

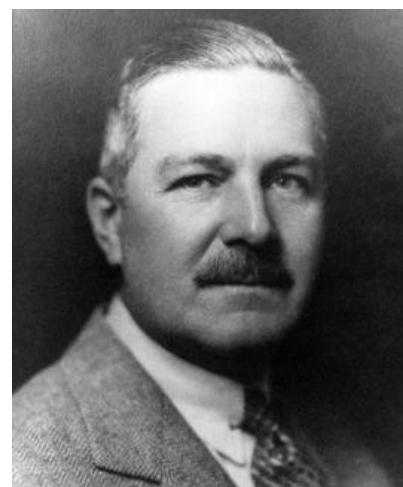


Figura 9: Alphonse R. Dochez (1882-1965)

primeros serotipos reaccionaban con el antisuero de otros microorganismos del mismo serotipo. Sin embargo, esto no ocurría en los del cuarto grupo, en los que la reacción sólo era posible al exponer cada aislamiento con un antisuero producido por un conejo inmunizado con ese aislamiento específico.

El polisacárido como material de la cápsula. Mientras trabajaban en el Rockefeller Institute de Nueva York, Dochez y Avery describieron en 1917 una sustancia soluble específica que encontraron en el suero y la orina de pacientes con neumonía lobar. Esta sustancia también fue identificada en la sangre de animales experimentalmente infectados por *S. pneumoniae*. Además, dicha sustancia formaba un precipitado con un antisuero específico (26). Al identificar esta sustancia, que formaba parte de la cápsula del neumococo, como un complejo de carbohidratos o polisacárido, Heidelberger y Avery establecieron que este polisacárido capsular era el factor responsable de la reactividad serológica (27) y de su potencial antigénico (28).

Vacuna. Incluso antes de que se demostrara la inmunogenicidad del polisacárido capsular, los estudios comenzados en 1911 por el bacteriólogo e inmunólogo británico Sir Almroth E. Wright (Imagen 10) sugirieron que la inoculación de neumococos muertos podría proteger frente a la infección neumocócica (29). Este trabajo siguió los principios de estudio que previamente habían mostrado eficacia en la vacunación de sujetos contra la fiebre tifoidea. Sin embargo, los resultados obtenidos con esta vacuna no



Imagen 10: Sr. Almroth E. Wright (1861-1941)

convencieron a la comunidad científica por su baja eficacia. El problema recaía fundamentalmente en la dificultad para incluir al mismo tiempo los serotipos conocidos y en la dosis adecuada (30), ya que un inóculo elevado se asociaba con molestias en el punto de la inyección.

En 1926 L Felton y GH Baily lograron separar el polisacárido capsular y mostraron que el material resultante, denominado sustancia soluble específica, que era la fracción intracelular, confería inmunidad (31). Estos hallazgos abrieron las puertas a que otros autores pudieran realizar múltiples trabajos entre 1930 y 1940 sobre la eficacia de la vacuna (32-36). En 1937 el material capsular de Felton se utilizó con éxito en el programa de vacunación masiva que frenó un brote de neumonía neumocócica en Boston (37). Posteriormente se llevaron a cabo diferentes trabajos que demostraron la eficacia de la vacuna en voluntarios adultos sanos (38-40), así como en ancianos (41). De esta forma la vacuna polisacárida hexavalente comenzó a utilizarse después de la 2ª Guerra Mundial, aunque muchos médicos no emplearon esta vacuna al pensar que los nuevos antibióticos constituían un medio más eficaz para tratar la enfermedad neumocócica (30).



Imagen 11: Rober Autrian (1916-2007)

El interés por la vacuna de polisacárido fue retomado a mediados de 1960 por Robert Austrian (Imagen 11), que desarrolló una vacuna polivalente que contenía el polisacárido de los 14 serotipos de neumococo más prevalentes, responsables del 80% de los casos de enfermedad neumocócica. Esto se siguió de otros estudios que mostraron su eficacia en algunas poblaciones con alta tasa de neumonía neumocócica (42, 43). Así se llegó a la comercialización en 1983 de la

vacuna polivalente de polisacárido 23-valente (VPP-23) (Pneumovax23® y Pnu-Imune23®) (44). Esta vacuna mostraba, sin embargo, una menor eficacia en niños menores de 2 años (45), así como en ancianos (46) y en pacientes con alteraciones inmunológicas (47, 48).

La baja eficacia de la VPP-23 en los grupos de población con mayor riesgo de enfermedad neumocócica dio lugar al desarrollo de otro tipo de vacunas. Estos estudios se basaron en los hallazgos de Goebel y Avery en 1929 (49) que mostraron que la unión covalente de los haptenos a una proteína transportadora aumentaba la inmunogenicidad de los mismos al estimular la inmunidad celular, dando lugar a memoria inmunológica. Así se desarrollaron diferentes proteínas transportadoras entre las que podemos destacar la CRM 197, proteína derivada del toxoide de la difteria inactivada, elaborada mediante ingeniería genética. La vacuna así formulada era bien tolerada y eficaz (50). De esta forma en 2001 se comercializó una vacuna polivalente conjugada (VPC) que incluía los 7 serotipos de *S. pneumoniae* responsables de la mayoría de los casos de enfermedad neumocócica invasiva y que al mismo tiempo eran serotipos no sensibles a penicilina y multirresistentes (véase apartado 1.3.2.2.).



Imagen 12: Frederick Griffith (1879-1941)

Biología molecular. *S. pneumoniae* también desempeñó un papel central en el descubrimiento del ADN. Los experimentos realizados por el genetista británico Frederick Griffith (Imagen 12) en la década de 1920-30 habían mostrado que la inyección en el peritoneo de ratones de neumococos vivos no capsulados (mutante), junto con neumococos capsulados muertos por calor,

daba lugar a la aparición de bacterias viables capsuladas. Griffith denominó a este proceso *transformación*. Esta observación permaneció sin explicación hasta la década de 1940-50, cuando los trabajos de Oswald Avery proporcionaron evidencias concluyentes acerca de que la capacidad de producir la cápsula era restablecida en los neumococos mutantes por la transferencia del ADN (51). Es decir, el ADN era el “principio transformante” de Griffith, responsable de la transformación y que, además, codificaba el fenotipo expresado.

1.2. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

1.2.1. Estructura y fisiología

S. pneumoniae es un coco Gram-positivo que produce cadenas en medios de cultivo líquidos. Los elementos que componen la estructura externa de *S. pneumoniae* son la cápsula externa, la pared celular y la membrana celular (Figura 1).

Casi todos los aislamientos clínicos contienen una **cápsula externa** (>100 nm); las cepas no capsuladas únicamente se han implicado en brotes de conjuntivitis (52). La cápsula está formada por secuencias de oligosacáridos sintetizadas dentro del citoplasma, polimerizadas y transportadas a la superficie bacteriana por las transferasas de la membrana celular. Estos polisacáridos están unidos de manera covalente al peptidogluano y al polisacárido (C-) de la pared celular, lo que explica la dificultad para separar el polisacárido capsular de la pared celular.

Sobre la base de las diferencias antigénicas en los polisacáridos capsulares se han identificado 91 serotipos de *S. pneumoniae*, pertenecientes a 43 serogrupos. Existen dos sistemas de numeración, el norteamericano, en el que los neumococos se numeran de forma consecutiva de acuerdo con el orden en el que fueron identificados y el sistema danés, que es el más ampliamente aceptado, que agrupa los serotipos según las similitudes antigénicas. Por ejemplo, en el sistema danés el serogrupo 19 incluye los serotipos 19F, 19A, 19B y 19C, que se corresponden con los serotipos 19, 57, 58 y 59 del norteamericano. Los serotipos que con mayor frecuencia producen enfermedad en los humanos fueron los que se identificaron antes, por lo que se corresponden con los primeros números asignados. Por este motivo, los neumococos con números más bajos son los que más probablemente afectan al ser humano.

En los neumococos estudiados hasta el presente se han identificado unas secuencias de ADN que codifican la formación de la cápsula externa, mientras que otras son exclusivas de cada serotipo particular (53-55). Como característica peculiar los neumococos poseen una capacidad, denominada *competencia*, que les permite internalizar el ADN de otros neumococos o de otras especies bacterianas. De esta forma, mediante recombinación genética, incorporan dicho material a su genoma y pueden cambiar las características antigénicas de la cápsula externa u otros determinantes, modificando así su virulencia. Éste proceso se denomina *transformación*, que se puede producir bajo condiciones experimentales, pero más importante aún es la que ocurre en la

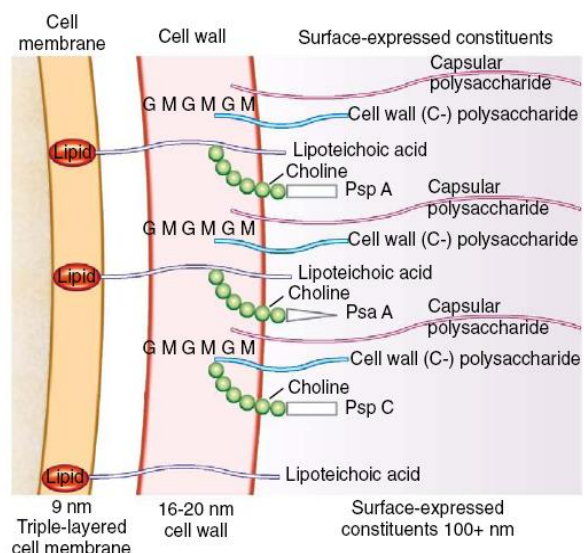


Figura 1: Esquema de la membrana celular, pared celular y cápsula de *S. pneumoniae*. (Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. Mantel, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7th ed. 2010)

naturaleza (56). Esta característica es responsable de la gran variedad clonal existente no sólo dentro de los microorganismos de la misma especie, sino incluso dentro del mismo serotipo. Así, mediante MLST se han identificado hasta el momento 19.454 variantes de *S. pneumoniae* (57).

Como ocurre con otros estreptococos, el peptidoglucano y el ácido teicoico son los constituyentes principales de la **pared celular** (16-20 nm) de los neumococos (58). El peptidoglucano está formado por cadenas alternadas largas de N-acetil-D-glucosamina y ácido N-acetilmurámico, a partir de las cuales se extienden cadenas de cuatro a seis aminoácidos denominados péptidos madre. Estos están unidos de manera cruzada por puentes de pentaglicina, lo que proporciona una rigidez sustancial a la pared celular. El ácido teicoico, un polímero de hidratos de carbono que contiene fosforilcolina, está unido de manera covalente con el peptidoglucano en la superficie externa de la pared bacteriana y protruye al interior de la cápsula. Este ácido teicoico, junto con los fragmentos adheridos con firmeza del peptidoglucano conforma el polisacárido-C, una sustancia presente en todos los neumococos y en algunas especies de *Streptococcus* del grupo viridans. Esta región es responsable de la reacción entre los neumococos y las proteínas que aparecen en el torrente sanguíneo, denominados reactantes de fase aguda o proteínas C-reativas. Otros elementos de la superficie celular son las proteínas que intervienen en la patogenia, como la proteína A, las adhesinas A neumocócicas, las proteínas unidas a la colina y las proteínas involucradas en la competencia.

Por último, la **membrana celular** constituida por tres capas (9 nm) está formada por lípidos y ácido teicoico. Una porción de la fracción lípido/ácido teicoico que se extiende de la membrana celular hacia la pared celular, se denomina antígeno F, por su reactividad cruzada con los antígenos de Forssman.

1.2.2. Virulencia

S. pneumoniae dispone de diferentes elementos estructurales que le confieren capacidad patogénica en el ser humano. En primer lugar coloniza la nasofaringe y posteriormente la invade, una vez en el interior del huésped tiene la posibilidad de evitar la captación y la destrucción por las células fagocíticas del huésped. A diferencia de otras bacterias produce pocas toxinas, por lo que en gran medida causa enfermedad por su capacidad para reproducirse en los tejidos y generar una respuesta inflamatoria intensa (59).

El polisacárido capsular supone el principal determinante de virulencia (60), ya que desempeña un papel central para evitar la fagocitosis. Se piensa que esto lo realiza por diferentes mecanismos. Por un lado, las células fagocíticas carecen de receptores específicos para reconocer los polisacáridos capsulares, y éstos presentan diferentes fuerzas electroquímicas que rechazan las células fagocíticas. Por otro, los anticuerpos frente a constituyentes de la pared celular y el C3b, que pueden haberse fijado a la pared celular, están debajo de la cápsula, por lo que se produce un enmascaramiento de dichos elementos que facilitarían la fagocitosis. Finalmente, el polisacárido capsular es capaz de inhibir la activación del complemento (59). Además, los neumococos son capaces de realizar un intercambio capsular (capsular switching) con otros neumococos, lo que da lugar a modificaciones de la virulencia (61), así como modificando la susceptibilidad a determinados antimicrobianos (62, 63).

Entre los componentes no capsulares que confieren virulencia a *S. pneumoniae* podemos destacar varios factores. La neumolisina, presente en la bicapa lipídica de la membrana celular tiene una acción citotóxica para las células fagocíticas y el epitelio respiratorio, y también produce inflamación activando el complemento e induciendo la producción del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1) (64, 65). Entre las proteínas de la superficie celular se encuentran la

proteína A que bloqueando la fijación del complemento dificulta la fagocitosis (66, 67), la adhesina A relacionada con la colonización de la nasofaringe (68), la autolisina que contribuye al remodelamiento de la pared celular, mediante la liberación de componentes del peptidoglucano activa intensamente la cascada del complemento (69, 70). Los neumococos producen también neuraminidasa que contribuye a la adherencia y la colonización bacteriana (71).

1.2.3. Métodos de identificación

Para su identificación en el laboratorio de microbiología se utilizan cuatro reacciones. La **α -hemólisis** en placas de agar-sangre, presencia de una zona verde alrededor de la colonia siendo el resultado de la degradación de la hemoglobina (y no de la lisis de los glóbulos rojos) mediada por la neumolisina (antes denominada α -hemolisina). Esta enzima es la responsable de la presencia del color amarillo-verdoso alrededor de las colonias de *S. pneumoniae* en agar-chocolate, un medio en el que todos los glóbulos rojos fueron lisados durante la preparación del mismo. La prueba de la **catalasa negativa**. La sensibilidad a la etil hidrocupreína (**optoquina**). La **solubilidad** en presencia de **sales biliares**, ya que los microorganismos son lisados por éstas (59).

1.3. EPIDEMIOLOGÍA

El nicho ecológico natural de *S. pneumoniae* es la nasofaringe, especialmente de los niños. Así, los cultivos apropiados son positivos en el 5-10% de los adultos sanos y en el 20-40% de los niños sanos. Si los cultivos se realizan de forma repetida estos porcentajes pueden elevarse hasta el 40-60% en aquellos niños que comienzan a caminar y en los que acuden a guarderías (59). Por razones aún desconocidas la tasa de colonización es estacional, con un aumento en mitad del invierno,

aunque pueden recuperarse neumococos de la nasofaringe de niños y adultos sanos durante todo el año.

La transmisión se realiza entre individuos como consecuencia de un contacto íntimo y prolongado (72). Por este motivo, se piensa que las guarderías podrían ser uno de los lugares de mayor transmisión entre los niños (73-75). Entre adultos la transmisión se produce sobre todo cuando se dan condiciones de hacinamiento, como en las prisiones (76), campamentos militares (77), albergues para las personas sin hogar (78) y geriátricos (79).

1.3.1. Incidencia: Magnitud del problema

La enfermedad invasiva por *S. pneumoniae* (EISP) constituye la forma más grave de infección por este microorganismo. Es responsable de aproximadamente 1,5 millones de muertes al año en todo el mundo, afectando especialmente a niños menores de 5 años de países en desarrollo (80). La tasa global de EISP es de alrededor de 15 casos por 100.000 habitantes/año, aunque su incidencia es muy variable según las diferentes poblaciones. Así algunas presentan una elevada incidencia, como los nativos de Alaska (450 casos por 100.000 habitantes/año) (81), los nativos Apaches de la Montaña Blanca (156 casos por 100.000 habitantes/año) (82) o los aborígenes australianos (47 casos por 100.000 habitantes/año) (83), mientras que en otras regiones la incidencia es muy inferior, como en Oxfordshire con 8 casos por 100.000 habitantes/año (84). En España disponemos de un estudio nacional, que recoge más de 22.000 aislamientos de *S. pneumoniae* entre 1979 y 2007, que permitió calcular una incidencia de 8,5-12,1 casos por 100.000 habitantes/año (85). La estimación de la incidencia de EISP en Galicia es ligeramente superior a la media nacional, con 15-16 casos por 100.000 habitantes/año (86).

La variación de la incidencia no sólo depende del área geográfica, sino también de la edad, presentando una incidencia más elevada las personas en las edades extremas de la vida (menores de 5 años y mayores de 65 años). Así, en la población gallega la incidencia es de 82 casos por 100.000 habitantes/años en menores de 5 años, de 30 casos por 100.000 habitantes/año en mayores de 65 años y de 9 casos por 100.000 habitantes/año entre 15-64 años (86). Además, en la población infantil la incidencia de EISP es superior en los menores de 2 años (81, 82, 87).

1.3.2. Prevención: Vacunación

1.3.2.1. Vacuna polivalente de polisacárido

La vacuna polivalente de polisacárido (VPP)-23, comercializada en 1983, cubre el 85-90% de los serotipos responsables de EISP (88). Esta vacuna induce una respuesta humoral mediante la inyección del polisacárido capsular de *S. pneumoniae*. Al activar únicamente a los linfocitos B, no se produce memoria inmunológica, por lo que la respuesta inmune se va perdiendo con el tiempo (88). Además, esta vacuna no genera protección de mucosas, por lo que no modifica el estado de portador (88).

Se ha comprobado que la respuesta humoral depende de la edad. Así, en menores de 2 años esta vacuna no es capaz de inducir inmunidad (45). En los pacientes con edad avanzada, aunque la respuesta inmunológica cualitativa es similar a la de pacientes con menor edad, la actividad de los anticuerpos es inferior (46, 89). Por otro lado, en pacientes con comorbilidades (infección por VIH, hepatopatía crónica, insuficiencia renal, neoplasias...) la eficacia de la vacuna también se ve disminuida (47, 48, 90). En pacientes infectados por el VIH los datos de eficacia de VPP-23 son contradictorios y, aunque existe la recomendación de vacunar a estos pacientes ya que presentan una elevada incidencia de EISP, no existen estudios aleatorizados que apoyen esta indicación (91).

De forma global la eficacia de la vacuna es del 47%, oscilando entre un 53% en población inmunocompetente y un 21% en pacientes inmunodeprimidos (48). La VPP-23 ha demostrado ser eficaz en la prevención de la neumonía bacteriémica (92) y, tras su utilización, se ha observado una disminución de la mortalidad en las formas graves de neumonía (93). Sin embargo, un reciente metanálisis ha concluido que la VPP-23 es escasamente eficaz en la prevención de la EISP y de dudosa eficacia en la prevención de neumonía (94).

1.3.2.2. Vacuna polivalente conjugada

En febrero de 2000 se comercializó en Estados Unidos la vacuna conjugada heptavalente frente a *S. pneumoniae* (VPC-7, Prevenar, Pfizer), siendo posteriormente comercializada e incluida en los calendarios vacunales de otros países. En España se comercializó en junio de 2001, en Francia se introdujo en 2002 (95), en el Reino Unido (84), en Holanda (96) en 2006 y en Dinamarca en 2007 (97). Esta vacuna contiene 2 µg de cada polisacárido de los serotipos 4, 9V, 14, 18C, 19F, 23F y 4 µg del 6B, conjugados individualmente con una proteína transportadora (CRM197 20 µg), que es una variante no tóxica de la toxina diftérica. Estos siete serotipos constituían el 75% de las serotipos responsables de EISP (98), el 88% de los serotipos no sensibles a penicilina y gran parte de los multirresistentes (85, 99). Esta vacuna ha dado lugar a diferentes cambios en los serotipos circulantes, por lo que en 2011 la VPC fue ampliada con 6 serotipos más dando lugar a la vacuna 13-valente (VPC-13, Prevenar13, Pfizer). Esta vacuna incluye, además de los serotipos de la VPC-7, los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F y 19A. Desde su comercialización ha sido incluida en el calendario vacunal infantil de algunas comunidades autónomas, como en Galicia.

La vacuna conjugada origina una respuesta inmunológica combinada, humoral y celular, por lo que además de la liberación de anticuerpos, produce la activación de los linfocitos T que generan

memoria inmunológica (88). Por este motivo, las exposiciones posteriores al polisacárido capsular dan lugar a un aumento de la producción de anticuerpos. Además, esta vacuna origina también una respuesta inmunológica a nivel de las mucosas, incrementando la producción de IgA local, siendo capaz de modificar el estado de portador (100). Este hecho tiene una importancia epidemiológica trascendental, ya que los niños constituyen el reservorio de *S. pneumoniae*. Por otro lado, esta vacuna es capaz de inducir una respuesta inmunológica en menores de 2 años (pacientes con alta incidencia de EISP) y también se ha mostrado más eficaz que la VPP-23 en pacientes con diferentes comorbilidades, como VIH (101) y en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (102).

Se recomienda la administración de la VPC a menores de 2 años y en aquellos niños entre 2 y 5 años con factores de riesgo, entre los que se encuentran la enfermedad pulmonar crónica: asma tratada con dosis altas de corticoides orales, broncodisplasia pulmonar, fibrosis quística y déficit de α 1-antitripsina. Otras indicaciones incluyen: cardiopatías congénitas cianosantes o que cursen con insuficiencia cardíaca, diabetes mellitus, fístulas del espacio subaracnoideo, niños con implante coclear, anemia de células falciformes u otras hemoglobinopatías, asplenia congénita o adquirida, disfunción esplénica, infección por VIH, inmunodeficiencias congénitas, incluido el síndrome de Down, insuficiencia renal crónica y síndrome nefrótico. Así como enfermedades que requieren tratamiento con fármacos inmunosupresores o radioterapia: leucemia, linfoma, trasplante de médula ósea y de órgano sólido. La pauta de administración varía entre 3 y 4 dosis. Las 2-3 primeras se administran entre los 2 y 6 meses de vida y posteriormente se administra un recuerdo a los 12, 15 o 18 meses. Desde septiembre de 2012 se ha aprobado la utilización de la VPC-13 en adultos con riesgo elevado de EISP, como son aquellos pacientes mayores de 50 años con enfermedad de Hodgkin, leucemia, linfoma, mieloma múltiple, insuficiencia renal, síndrome nefrótico, trasplante de

órgano sólido o de células hematopoyéticas, tratamiento quimioterápico o inmunosupresor e infección por VIH.

Existen importantes variaciones en las tasas de vacunación infantil con la VCP-7 entre los diferentes países. Así, encontramos unas tasas elevadas (80-90%) en Estados Unidos (103, 104) y en determinadas poblaciones de muy alto riesgo de EISP que están sometidas a una vigilancia epidemiológica especial, como los indios de la Montaña Blanca (82), los nativos de Alaska (81) y los aborígenes australianos (83). Por otro lado, en otras regiones como en la mayoría de los países de Europa (95, 105), incluida España (86, 87, 106), las tasas de vacunación son inferiores al 50%.

1.3.2.3. Cambios tras la introducción de la vacuna polivalente conjugada

Numerosos estudios han demostrado que tras la introducción de la VPC-7 se ha producido una disminución estadísticamente significativa de la incidencia y de la mortalidad de la EISP. Así, un reciente metanálisis ha confirmado la elevada eficacia de esta vacuna (107), que se estima en torno al 87% de forma global. Esta eficacia es incluso superior, en torno al 97%, al analizar únicamente los serotipos incluidos en la VPC-7 (108). La vacuna conjugada ha demostrado su eficacia no sólo en niños vacunados (81-84, 99, 104, 109-113), sino también en niños no vacunados y en adultos (81, 82, 104, 109, 113, 114). Este efecto se conoce como *efecto rebaño* y se debe a la inmunidad local de las mucosas generada por la VPC que origina una disminución de los serotipos incluidos en la vacuna. Secundariamente la nasofaringe se coloniza por otros serotipos (81, 115), dando lugar al denominado *reemplazamiento de serotipos*.

Tras la introducción de la VCP-7 se ha observado en la mayoría de los países una disminución de la incidencia de la EISP, principalmente por una significativa disminución (en algunos estudios superior al 90%) (81) de los serotipos incluidos en la vacuna heptavalente, llamados también

serotipos vacunales (SV-7). En España, tras la introducción de la VPC-7, la incidencia de infección invasiva por SV-7 descendió desde de 5,2 a 2,4 casos por 100.000 habitantes/año (85). Por otro lado, teniendo en cuenta que los SV-7 eran los que se asociaban a una mayor tasa de resistencia a antimicrobianos, tras la introducción de la VPC-7 se observó un descenso en la prevalencia de cepas no sensibles a penicilina, así como de las cepas multirresistentes (81, 85, 110, 116, 117).

Según los datos de que disponemos en nuestra comunidad, entre 1998-2000 y 2004-06 la incidencia de EISP en menores de 5 años aumentó de 22,4 a 38,6 casos por 100.000 habitantes/año, y no se modificó en otros grupos de edad. Sin embargo, tras la introducción de la VPC-7 se encontró un descenso de la incidencia de meningitis neumocócica en menores de 5 años (especialmente en menores de 2 años) de 6,8 a 2,4 casos por 100.000 habitantes/año (118).

Sin embargo, otros trabajos han encontrado que tras la introducción de la VPC-7 la incidencia global de EISP (87, 97, 105, 119), de meningitis neumocócica (95, 117), de bacteriemia primaria (87, 117) o de neumonía neumocócica (87, 119) han aumentado o no se han modificado (116). Un hallazgo común en prácticamente todos los estudios es el aumento de determinados serotipos no incluidos en la VPC-7, denominados serotipos no vacunales (SNV-7) (81, 84, 85, 87, 109, 113, 114, 116, 117). Entre estos serotipos destacan los siguientes 1, 3, 5, 6A, 7F, 9A, 9N, 11A, 12F, 15, 16F, 19A, 22, 23, 33 y 35B (84, 85, 96, 110, 114, 119). Seleccionando aquellos que han aumentado más su incidencia, se ha desarrollado y comercializado la vacuna conjugada 13-valente (VPC-13) que incluye 6 nuevos serotipos (1, 3, 5, 6A, 7F y 19A).

Aunque el reemplazamiento de serotipos ha sido más patente tras la introducción de la VPC-7, varios estudios epidemiológicos encontraron que el aumento de incidencia de determinados SNV-7, y el descenso de algunos SV-7 se había producido antes de la introducción de dicha vacuna (82, 85, 105). Por lo tanto, aunque la VPC-7 ha colaborado con la sustitución de unos serotipos por otros,

existen otros factores a tener en cuenta como con el uso de antibióticos (120), la prevalencia de comorbilidades en la población (121, 122) o los factores ambientales (81). Así, en algunas poblaciones no se ha observado un aumento en los SNV-7 (99, 111), esto se ha relacionado con un bajo consumo de antibióticos, la utilización de la VPC-7 y las características de las cepas circulantes (111).

1.3.2.4. Serotipo 19A

Uno de los SNV-7 que más ha aumentado su incidencia es el 19A (62, 81, 83-85, 97, 99, 104, 105, 109, 111, 114, 115, 117, 119, 123-126). La importancia de este serotipo se debe fundamentalmente a la elevada prevalencia de cepas resistentes a penicilina y eritromicina, así como de cepas multirresistentes (112, 114, 119, 123-125, 127). Se han identificado diferentes clones con tasas mayores de resistencia a antibióticos como el ST-320 (123, 125, 127, 128), el ST-276 (123), el ST-663 (129) y el ST-199 (125).

El aumento de la incidencia de este serotipo se ha relacionado con múltiples factores. Así, algunos estudios han relacionado el aumento de la incidencia de este serotipo con la expansión de un determinado clon (62, 81, 117, 124), aunque otros no lo han podido demostrar (99). Además, este serotipo es un colonizador frecuente de la nasofaringe (81, 127), con gran capacidad invasiva (115) y alta tasa de resistencia a antimicrobianos (130, 131), lo que le proporcionaría una mayor supervivencia **o ventaja** (105, 123, 125). Así mismo, antes del uso de la VPC-7 era el noveno serotipo más frecuentemente aislado en pacientes con EISP, por lo que la disminución de los SV-7 daría paso a los siguientes serotipos (125). Por otro lado, aunque el 19A es considerado un serotipo relacionado con el 19F, incluido en la VPC-7, se ha observado que ésta no ofrece protección cruzada entre el serotipo 19F y el 19A (125, 132-134). Por último, el aumento de este serotipo podría estar

relacionado con variaciones naturales en su incidencia. Así, el primer brote por este serotipo ocurrió en Sudáfrica en 1978 (135) y varios trabajos han encontrado un aumento de su incidencia antes de la introducción de la VPC-7 (105, 120, 136).

1.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La infección por *S. pneumoniae* se desarrolla bien por la diseminación directa de los microorganismos desde la nasofaringe hacia el oído medio, bronquios o pulmones, bien por diseminación hematogena hacia el sistema nervioso central, las válvulas cardíacas, los huesos, las articulaciones o la cavidad peritoneal (59). La forma más grave de infección por *S. pneumoniae* es conocida como enfermedad invasiva, que se define como el aislamiento de neumococo en un líquido biológico estéril (sangre, líquido cefalorraquídeo [LCR], líquido articular, líquido pleural).

1.4.1. Enfermedad invasiva por *S. pneumoniae*

Las formas de presentación clínica más habituales de la EISP son la neumonía bacteriémica, la meningitis y la bacteriemia primaria. La mortalidad de la EISP es la más elevada entre las enfermedades infecciosas prevenibles, incluso a pesar de un tratamiento antibiótico correcto (137). La tasa de mortalidad varía según las series entre un 2,9-24,6% (83, 103, 138-142) en países desarrollados y un 50% en países en vías de desarrollo (143). Estos países llegan a acumular hasta el 90% de las muertes por EISP (111). Diferentes factores se han asociado con una mayor mortalidad (96), unos dependientes del huésped (edad, comorbilidades, consumo excesivo de alcohol) (96, 138, 141, 142), otros dependientes del tipo de EISP (mayor mortalidad en los casos de meningitis neumocócica y en los de bacteriemia primaria que en los pacientes diagnosticados de neumonía) (96, 144), otros relacionados con el tratamiento antibiótico (adecuación, demora en el inicio) y por

último los relacionados con el propio microorganismo (serotipo, resistencia a antimicrobianos) (96, 138, 142).

1.4.1.1. Neumonía

S. pneumoniae es el microorganismo que con más frecuencia se identifica en los pacientes con neumonía adquirida en la comunidad, alcanzando en algunas series hasta el 80% de los casos (145, 146). Sin embargo, solamente el 12-20% de las neumonías neumocócicas son bacteriémicas (146, 147). Debido a la baja rentabilidad de los hemocultivos, se ha desarrollado una escala de valoración del riesgo de bacteriemia en pacientes con neumonía. En dicha escala los factores que puntúan son la enfermedad hepática, el dolor pleurítico, la taquicardia, la taquipnea, la hipotensión sistólica y la ausencia de tratamiento antibiótico previo. La presencia de dos o más factores se asocia con una tasa de bacteriemia que puede llegar al 65% (146). Sin embargo, otros estudios no han encontrado ningún factor predictor de bacteriemia (148).

La neumonía neumocócica suele presentarse como una neumonía típica con tos, dificultad respiratoria, astenia, sensación distérmica, sudoración, expectoración y dolor torácico. Estos síntomas suelen ser más prominentes en pacientes jóvenes que en ancianos. En la exploración física se puede detectar fiebre, taquipnea y en la auscultación pulmonar suelen estar presentes crepitantes y, en ocasiones, se puede detectar un soplo tubárico o un aumento de la transmisión de las vibraciones vocales en la zona de la condensación neumónica (pectoriloquia) (59).

En la mayoría de los casos la radiografía muestra un área de infiltración afectando a uno o más lóbulos pulmonares. Aunque el derrame pleural puede encontrarse hasta en el 40% de los pacientes con neumonía neumocócica tras una búsqueda minuciosa, aunque sólo el 10% presentan una cuantía suficiente para la realización de una toracocentesis y de éstos una minoría, aproximadamente el 2%, cumple criterios de empiema (149). En algunas series, tras la utilización de

la VPC-7 la prevalencia de empiema ha aumentado significativamente, llegando hasta un 30% de los niños con neumonía neumocócica (144).

El “gold estándar” para el diagnóstico etiológico son los hemocultivos, pero como se ha comentado previamente, su rentabilidad es baja (147). El cultivo de esputo también es útil en el diagnóstico presuntivo, aunque su utilidad puede verse disminuida si se analizan muestras inadecuadas, es decir, con pocas células inflamatorias y muchas células epiteliales planas (59). De mayor utilidad es la detección del antígeno de neumococo en orina, que presenta una buena sensibilidad (70-80%) y especificidad (70-100%) (150-152).

1.4.1.2. Meningitis

El agente etiológico más común de meningitis bacteriana en adultos mayores de 50 años es *S. pneumoniae*. Además, tras la vacunación eficaz frente a *H. influenzae* tipo b y frente a meningococo, el neumococo se ha convertido en la causa más común de meningitis en niños entre 1-23 meses (153). La meningitis neumocócica puede producirse por dos mecanismos. Uno de ellos es por extensión directa desde los senos paranasales o el oído medio, lo que explicaría la asociación entre otitis media aguda o sinusitis y la infección del sistema nervioso central, así como el hecho de que *S. pneumoniae* sea el microorganismo más frecuentemente aislado en aquellos pacientes con fístula de LCR (153). El otro mecanismo es por diseminación hematógena, a favor de esta vía de diseminación estarían los casos de pacientes diagnosticados de bacteriemia primaria que posteriormente desarrollan una meningitis (59), así como aquellos en los que de forma simultánea se realiza el diagnóstico de meningitis, neumonía y endocarditis neumocócica (síndrome de Austrian) (154, 155).

No existen características clínicas o de laboratorio que permitan establecer una sospecha del agente etiológico en los pacientes diagnosticados de meningitis neumocócica. En cuanto a los

estudios microbiológicos, la presencia de cocos Gram-positivos proporciona un diagnóstico correcto en el 90% de los casos (153), aunque la administración previa de antibióticos puede disminuir en gran medida el número de bacterias y resultar en un falso negativo. En estos casos la detección del antígeno neumocócico en LCR es de gran utilidad, con una sensibilidad 67-100% (153).

1.4.1.3. Bacteriemia primaria

La bacteriemia primaria, es decir, el aislamiento de *S. pneumoniae* en sangre en un paciente con clínica infecciosa sin foco identificado o conocido, es la segunda o tercera forma más común de presentación de la EISP, variando según las series entre 13-50% (141, 144, 156-158). Afecta con mayor frecuencia a niños <5 años y puede presentarse como un cuadro clínico grave, en forma de shock séptico (141, 159, 160). Además, esta forma clínica se ha asociado en algunas series con una elevada mortalidad, por lo que se considera una forma grave de EISP (96).

1.4.1.4. Otras manifestaciones

Otras manifestaciones más infrecuentes de la EISP son la infección endovascular, endocarditis (161-163) o infección de dispositivos endovasculares, como infección de marcapasos (164). A nivel osteomuscular se han descrito casos de artritis séptica, tanto sobre articulaciones nativas (165) como protésicas (166). Aunque infrecuente, *S. pneumoniae* se ha relacionado con algunos casos de espondilodiscitis y abscesos epidurales, fundamentalmente en adultos (167). También se han publicado casos de infección de piel y partes blandas (168), abscesos cerebrales (169) y peritonitis bacteriana espontánea (170).

1.4.2. Relación entre el serotipo y la enfermedad invasiva

El papel patogénico en humanos de los más de 90 serotipos de *S. pneumoniae* es muy diferente y sólo algunos de ellos se han asociado con EISP. Diferentes autores han estudiado la capacidad invasiva de los diferentes serotipos, las manifestaciones clínicas más frecuentes y su evolución y las características de los pacientes afectados. Así, los serotipos 1, 5, y 7F, que poseen una elevada capacidad invasiva, se asocian con las formas clínicas graves, como meningitis o bacteriemia primaria, con una elevada tasa de ingreso en unidades de críticos y con una alta mortalidad (96, 138). Sin embargo, otros serotipos considerados como poco invasivos (serotipos 3, 6, 8, 15, 19, 23 y 33) pueden comportarse como patógenos oportunistas, afectando a pacientes inmunocomprometidos o pluripatológicos, asociando también una mortalidad elevada (96, 138).

Por otro lado, determinados serotipos se han relacionado con manifestaciones clínicas concretas. Así, los serotipos 1, 3 y 19A se aíslan con mayor frecuencia en los pacientes con empiema (144, 171). En los casos de meningitis neumocócica, los serotipos 14 y 23F eran los más prevalentes en la era prevacunal, siendo en la actualidad el 19A y el 22F los que más frecuentemente se aíslan (95, 172). Sin embargo, algunos estudios no han logrado demostrar una asociación estadística entre el serotipo y la manifestación clínica o la evolución de la misma (142).

1.4.3. Factores de riesgo de la enfermedad invasiva

Se han descrito diferentes factores asociados con un mayor riesgo de EISP. Además del serotipo de *S. pneumoniae*, existen algunas características del huésped que lo hacen más susceptible a la invasión y que pueden estar presentes hasta en el 80% de los pacientes con EISP (139). Uno de los determinantes más importantes de susceptibilidad para la EISP es la edad, con una mayor incidencia de la enfermedad en edades extremas, especialmente <5 años y >65 años (81, 82, 87).

Otros factores son el tabaquismo, el consumo excesivo de alcohol, la hepatopatía crónica, la enfermedad pulmonar crónica, factores inmunosupresores (neoplasia de órgano sólido, neoplasia hematológica, infección por VIH, trasplante de órgano sólido, fármacos) (139, 140, 142). De hecho, algunos autores consideran que las características del huésped son el principal determinante de riesgo para presentar una EISP, así como de la evolución de la misma (142).

1.5. RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

1.5.1. Penicilina

La penicilina (PE) fue descubierta por Alexander Fleming en 1928 y se utilizó por primera vez en humanos como tratamiento tópico en 1930. Este antimicrobiano supuso un avance fundamental en el manejo de la patología infecciosa y en la actualidad, es uno de los fármacos más utilizados, tanto en atención primaria como en los hospitales (173).

Se trata de un antibiótico bactericida que actúa a través de dos mecanismos fundamentales: inhibiendo la síntesis de la pared bacteria y mediante la inducción de la autólisis bacteriana. El anillo betalactámico presenta una similitud estructural con el pentapéptido, elemento final en la formación del peptidoglucano de la pared celular. Por este motivo, se une de forma covalente con las enzimas, denominadas proteínas fijadoras de penicilina (PBP, penicillin binding protein), responsables de hidrolizar esta proteína, impidiendo así la formación de la pared celular (59). Sin la pared, las bacterias quedan expuestas al medio y mueren debido a los cambios en la presión oncótica u osmótica. Por tanto, para que actúen los betalactámicos, es preciso que la bacteria esté en fase planctónica, multiplicándose, ya que es el momento en el que se sintetiza la pared celular. Por otro lado, estos fármacos también activan una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano (174).

La resistencia a PE de *S. pneumoniae* se debe a un cambio estructural en la diana de la PE. Las principales PBPs implicadas en la resistencia a los betalactámicos son las PBP 1A, 2X y 2B (175). Además, la presencia de estas PBP da lugar a una disminución de la afinidad por la PE y otros betalactámicos, aunque la ceftriaxona, la cefotaxima (CT) y los carbapenémicos suelen verse menos afectados, manteniendo su actividad (176).

En la actualidad existen dos guías fundamentales de referencia para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos. La del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) que anualmente publica una actualización y en la que se establecen los puntos de corte para *S. pneumoniae* en función del tipo de infección (meníngea o no) y de la vía de administración del antimicrobiano (oral o parenteral) (177). Por otro lado, la guía europea (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) establece un único punto de corte para PE, así como para CT, independientemente del tipo de infección o de la vía de administración (178). Los puntos de corte de ambas guías se muestran en la tabla 1. La concentración mínima inhibitoria (CMI) más baja para las infecciones meníngeas se estableció tras la observación de un aumento de fracasos terapéuticos en aquellos pacientes con meningitis en los que la CMI a PE era superior a 0,12 µg/ml. Este hecho se asoció a que los niveles de estos antimicrobianos en el sistema nervioso central eran insuficientes para erradicar los neumococos (179).

Tabla 1: Puntos de corte para PE y CT según la CLSI y EUCAST.

		PE ($\mu\text{g/ml}$)		CT ($\mu\text{g/ml}$)	
		S	R	S	R
CLSI	Vía parenteral				
	- Infección no meníngea	≤ 2	≥ 8	≤ 1	≥ 4
	- Infección meníngea	$\leq 0,06$	$\geq 0,12$	$\leq 0,5$	≥ 2
	Vía oral	$\leq 0,06$	≥ 2		
EUCAST		$\leq 0,064$	> 2	$\leq 0,5$	> 2

NOTA: CT: cefotaxima, PE: penicilina; S: sensible, R resistente.

Los primeros aislamientos con alto nivel de resistencia a PE fueron identificados en Sudáfrica en 1977, tanto en muestras respiratorias como en otras procedentes de EISP (135). Estas cepas también presentaban resistencia a otros antimicrobianos. Desde la década de 1980-90 la prevalencia de cepas no sensibles a PE se ha convertido en un problema creciente en algunos países, llegando a alcanzar entre 1990 y 2000 una prevalencia de 30,2% en España, 35,8% en Francia y 20,4% en Estados Unidos (180). Desde la introducción de la VPC-7, que incluía serotipos con una elevada tasa de resistencia a antimicrobianos, se ha observado una disminución en la tasa de neumococos no sensibles a PE, especialmente en Francia, España, Bélgica e Israel (181). En 2008 a nivel europeo la prevalencia de *S. pneumoniae* no sensibles a PE era del 10% (181). Sin embargo, en la actualidad la tasa de cepas no sensibles a PE en España sigue siendo elevada. Así, los últimos datos de nuestro país del año 2009 mostraban una tasa de cepas no sensibles a PE del 22,03%, con una prevalencia de cepas resistentes del 8,33% (181).

1.5.2. Macrólidos

Los macrólidos actúan inhibiendo la síntesis de proteínas mediante la unión de forma reversible al dominio V del ARN ribosómico (ARNr) 23S. La unión se realiza mediante la formación de puentes de hidrógeno entre los diferentes radicales hidroxilo del macrólido y determinadas bases de ARNr. En general tienen una acción bacteriostática, aunque a elevadas concentraciones pueden ser bactericidas especialmente frente a *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*. Según la CLSI 2009 los puntos de corte para la sensibilidad son: S \leq 0,25 μ g/ml, I = 0,5 μ g/ml y R \geq 1 μ g/ml. En el EUCAST 2011 los puntos de corte varían ligeramente, considerando los aislamientos con CMI $>$ 0,5 μ g/ml como resistentes.

Los primeros neumococos resistentes a macrólidos se describieron en Canadá en 1967, pero las tasas de resistencia permanecieron bajas durante la década de 1970-80 (182). Posteriormente, la prevalencia de los aislamientos resistentes ha aumentado en todo el mundo, asociada al incremento del consumo de macrólidos (183-185). En España, la tasa de resistencia ha aumentado de un 0% en 1979 a un 42,9% en 2003 (85). Al igual que ha ocurrido con la resistencia a PE, tras la introducción de la VPC-7 la tasa de resistencia a macrólidos ha disminuido (85, 185, 186). Así, la tasa más reciente de resistencia a macrólidos en España muestra una prevalencia de neumococos no sensibles a macrólidos del 19,36% (1% sensibilidad intermedia, 18,36% resistentes) (181). Un hecho importante respecto a la resistencia a los macrólidos es que diferentes estudios han asociado dicha resistencia con fracasos en el tratamiento de pacientes con neumonía (187). Por este motivo, aunque los macrólidos continúan siendo un fármaco de primera elección en el tratamiento de la neumonía adquirida en la comunidad (145), su uso empírico ha disminuido (179).

El mecanismo de resistencia más habitual, sobre todo en Europa (188), es la modificación de la diana de acción mediante la metilación del ARNr 23S, codificada por genes denominados *erm*, que pueden expresarse de forma constitutiva o inducible. Aunque existen diferentes clases de genes

erm, la más frecuente en *S. pneumoniae* es *ermB* (188). La presencia de este gen es responsable de un alto nivel de resistencia a todos los macrólidos (CMI ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$), así como a la clindamicina, conocido como fenotipo de resistencia MLS_B (189). El segundo mecanismo más habitual está mediado por la bomba de expulsión codificada por los genes *mef* (*mefA*, *mefE*) (188). Este mecanismo da lugar al fenotipo M, que se asocia con resistencia a macrólidos con anillos de 14 átomos de carbono, como la eritromicina (EM) o la claritromicina y de 15, como la azitromicina. Generalmente estos aislamientos presentan una CMI de 2-4 $\mu\text{g/ml}$, aunque se han encontrado cepas con CMI $>32\mu\text{g/ml}$ (188). Este fenotipo es el predominante en Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Alemania y Noruega (179). Otros mecanismos menos habituales de resistencia a macrólidos son mutaciones en 23S ARNr o alteraciones en las proteínas ribosomales (L4 y L22) (179).

Recientemente se han encontrado cepas de neumococos portadores de ambos genes (*ermB* y *mefA*), sobre todo en Asia, Rusia, Corea, Sudáfrica y Estados Unidos (190-192). Estos aislamientos presentan una elevada tasa de multirresistencia (192) Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito ninguna cepa con estas características en nuestro país.

1.5.3. Fluoroquinolonas

La elevada tasa de resistencias a PE y a macrólidos, unido a la aparición a finales de la década 1990-2000 de nuevas fluoroquinolonas con alta actividad frente a neumococo, como levofloxacin (LE) y moxifloxacin, han llevado a la utilización de estos antimicrobianos en el tratamiento empírico de la neumonía comunitaria (145). Sin embargo, en los últimos años, tras el incremento en la utilización de estos fármacos, en diferentes países, como Canadá y España, han aparecido cepas de *S. pneumoniae* resistentes a las fluoroquinolonas (193, 194). Aunque la tasa de resistencia es baja, en España se ha observado un incremento significativo en los últimos años, pasando de un 0,1% en

2002 a un 1,3% en 2007, $p < 0,001$ (85). La tasa de resistencia más reciente es de 2011 y está en torno al 3% (195).

Las fluoroquinolonas presentan una acción rápidamente bactericida al interferir con la replicación, transcripción y reparación del ADN cromosómico bacteriano. Para ello actúan sobre dos enzimas cruciales para estos procesos, la ADN girasa (o topoisomerasa II) y la topoisomerasa IV (196). La ADN-girasa, tetrámera formada por dos subunidades A y dos subunidades B, codificadas en los genes *gyrA* y *gyrB*, se encarga de mantener un adecuado enrollamiento del ADN bacteriano que permita su replicación y transcripción (197). La topoisomerasa IV, también formada por dos subunidades (C y E), codificadas por los genes *parC* y *parE*, tiene como principal función la de separar las hebras de ADN después de cada replicación (197). La unión de las fluoroquinolonas al complejo enzima-ADN provoca un cambio conformacional del enzima, dando lugar a un complejo fluoroquinolona-enzima-ADN que induce una inhibición reversible de la replicación del ADN y, por lo tanto, del crecimiento bacteriano, explicando así la acción bacteriostática de las fluoroquinolonas (197). Por otro lado, estas enzimas son responsables de la fragmentación del ADN, por lo que la presencia de estos fármacos evita que se puedan volver a unir las cadenas de ADN desestructuradas (197), ejerciendo así una acción bactericida (196, 197).

Desde 1998 LE se utiliza como marcador de sensibilidad de *S. pneumoniae* a las fluoroquinolonas (198). Según la CLSI 2009 se considera que una cepa es sensible si la CMI es ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ y resistente si la CMI ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$. En el EUCAST los puntos de corte son diferentes, considerando como sensibles a LE los aislamientos con CMI ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ y resistentes al resto.

Existen diferentes mecanismos de resistencia de las bacterias Gram-positivas a las fluoroquinolonas destacando dos: las mutaciones que alteran las dianas de acción y los sistemas que disminuyen la concentración intracelular del antimicrobiano (199), siendo el primero el más

importante y mejor estudiado. Se ha detectado una porción de los genes de la ADN girasa y de la topoisomerasa IV, denominados región determinante de resistencia a quinolonas (Quinolone Resistance Determining Region, QRDR), que contiene los elementos que codifican la superficie de unión del enzima al ADN (199) y en la que se concentran las mutaciones responsables de la aparición de resistencias. La generación de resistencias tiene como peculiaridad que se produce de forma secuencial, por la acumulación de mutaciones en los genes *parC* y *gyrA* (197, 200, 201). Las sustituciones de aminoácidos descritas hasta el momento se muestran en la Tabla 2.



Tabla 2: Sustituciones de aminoácidos descritos en cepas de *S. pneumoniae*.

<i>parC</i>	<i>parE</i>	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>
Ser79Phe*	Asp435Asn	Ser81Phe*	Asp435Glu
Ser79Tyr	Ile460Val	Ser81Tyr	Asp435Asn
Ser79Ala		Ser81Ala	
Asp78Ala		Glu85Lys	
Asp78Gly			
Asp83Asn*			
Asp83Tyr			
Asp83Val			
Asn91Asp			
Lys137Asn			
Glu135Asp			
Gly128Asp			

*Mutaciones más frecuentes (201-206).

El primer gen mutado suele ser el que codifica la diana enzimática primaria, que en las bacterias Gram-positivas es la topoisomerasa IV (199, 200). Así, se ha demostrado que la concentración inhibitoria de LE es 8-16 veces inferior para inhibir a la topoisomerasa IV que la necesaria para inhibir a la ADN girasa (200, 207). Esta primera mutación conlleva una disminución de la afinidad de la fluoroquinolona por su diana, disminuyendo la actividad del fármaco (201). Como consecuencia la CMI se eleva, aunque permanece dentro del rango de sensibilidad, siendo generalmente de 1-2 µg/ml (202, 208). Se han realizado varios estudios para detectar esta primera

mutación en cepas de *S. pneumoniae* con CMI 1-2 µg/ml, obteniendo resultados dispares según el origen de los aislamientos. En los aislamientos de sangre o LCR, esta primera mutación fue encontrada en el 0,35% de las cepas con CMI = 1 µg/ml y en el 7,7% de las cepas con CMI = 2 µg/ml (209). Sin embargo, en las cepas procedentes de muestras respiratorias esta prevalencia fue mucho más elevada. Así, en aquellas con CMI = 1 µg/ml la mutación en *parC* se identificó entre el 2,1-25% de las cepas, y cuando la CMI era 2 µg/ml, esta mutación se encontró en el 59-71% de los aislamientos (202, 203) (Tabla 3).

Otro mecanismo de resistencia es la presencia de bombas de expulsión de fluoroquinolonas, que condicionan la disminución de la concentración intracelular de estos antimicrobianos. Tienen un papel importante en la reducción de la sensibilidad a ciprofloxacino (CP), aunque su repercusión sobre la CMI a LE es menor (206, 209). La prevalencia de bombas de expulsión de fluoroquinolonas es muy variable entre los aislamientos con CMI a CP entre 1-2 µg/ml, desde un 0% (202, 208), hasta el 21-30% (209, 210) o hasta el 75% en un trabajo realizado en Corea (192). Por otro lado, la presencia de bombas de expulsión de fluoroquinolonas se ha asociado con el aumento de la CMI en ausencia de mutaciones en QRDR (211). Además, se ha comprobado *in vitro*, que la presencia de estas bombas es un elemento que facilita la aparición de mutaciones en la QRDR (212).

Tabla 3: Presencia de mutaciones en *parC* y *gyrA* en relación con la CMI para ciprofloxacino y/o levofloxacino y el origen del aislamiento bacteriano.

Aislamiento	CMI CP (µg/ml)	CMI LE (µg/ml)	Mutación <i>parC</i>	Mutación <i>gyrA</i>	Referencia	
Infección invasiva		1	0,35%		(209)	
		2	7,7%			
Respiratorio		1	2,1%		(208)	
Infección no invasiva	2-4	0.5	0%		(202)	
		1	7,4%			
		2	71%			
Infección no invasiva		1	25%	0%	(203)	
		2	59%	0%		
		4	100%	38%		
		8	100%	100%		
		16	100%	100%		
Infección no invasiva	1		0%	0%	(201)	
			2	11%		
			4	36%		
			8	100%		100%
Infección invasiva (30%)* y no invasiva	2		0%		(193)	
			2	36%		
			4	51%		
			8	85%		
			16	100%		
Infección invasiva y no invasiva	2		6%	0.2%	(213)	
			4	52%		4%
			8	80%		40%
			16	67%		100%
			32	100%		100%

NOTA: CMI: concentración mínima inhibitoria, CP: ciprofloxacino, LE: levofloxacino.

*Porcentaje de muestras invasivas.

El aumento progresivo de la tasa de resistencia a fluoroquinolonas se ha asociado con tres itinerarios diferentes. Por un lado, con la expansión de un clon resistente, como se demostró en primer lugar en Hong Kong (214) y posteriormente en otros países (210, 215-217). Por otro, con la recombinación genética con otras especies de *Streptococcus*, aunque es un mecanismo altamente infrecuente (205, 210). Por último, la teoría más extendida es la aparición de mutaciones de novo en cepas expuestas previamente a fluoroquinolonas (193, 205, 206, 209, 218, 219). Así, se ha visto una relación entre el aumento en la prescripción de fluoroquinolonas y el incremento de resistencias a estos antimicrobianos (193, 194).

Desde el punto de vista farmacocinético, las fluoroquinolonas son antibióticos concentración dependiente, por lo que los parámetros que mejor predicen la eficacia de estos fármacos son la relación pico de concentración máxima sobre la CMI (C_{max}/CMI) y la relación área bajo la curva y la CMI (AUC/CMI). Así, se ha visto que para una buena respuesta biológica en el tratamiento de la neumonía neumocócica con LE es necesario una AUC/CMI superior a 33,7 (220). A nivel del árbol bronquial las concentraciones de fluoroquinolonas pueden no ser suficientes para erradicar los neumococos, inhibiendo únicamente su crecimiento y generando la aparición de las mutaciones en QRDR (221, 222). Esto podría explicar por qué los neumococos aislados en vía respiratoria presentan habitualmente una prevalencia de resistencia a antimicrobianos más elevadas, que aquellos procedentes de líquidos biológicos estériles, como sangre o LCR (193, 223, 224).

Además, como se ha puesto de manifiesto en múltiples trabajos, la resistencia a fluoroquinolonas puede asociarse con la resistencia a otros antimicrobianos, especialmente a PE (193, 202, 223), así como con cepas multirresistentes (223). Este hecho supondrá en el futuro un nuevo reto para el manejo de los pacientes con EISP.



OBJETIVOS



2.1 PRIMARIOS

- Evolución de los serotipos de *S. pneumoniae* responsables de enfermedad neumocócica invasiva tras la introducción de la vacuna conjugada heptavalente.
- Evaluación de los patrones de resistencia de *S. pneumoniae* antes y después de la introducción de la vacuna.
- Análisis de las formas de presentación clínica de la enfermedad neumocócica invasiva, necesidad de ingreso en UCI y mortalidad de los pacientes en los periodos pre y postvacunal.

2.2 SECUNDARIOS

- Estudio y evolución de la resistencia a fluoroquinolonas y macrólidos.
- Estudio de la prevalencia de la enfermedad invasiva producida por el serotipo 19A, así como de los patrones de resistencia de este serotipo y su clonalidad.





MATERIAL Y MÉTODOS



3.1. DEFINICIONES

- Enfermedad invasiva por *S. pneumoniae*: presencia de signos clínicos de infección y aislamiento de *S. pneumoniae* en sangre, LCR u otro líquido biológico estéril (líquido pleural, ascítico o articular).
- Neumonía neumocócica: se diagnosticó en aquellos pacientes con al menos uno de los siguientes síntomas: fiebre, tos, expectoración o dolor pleurítico, asociados siempre con la presencia en la radiología de tórax de una condensación y con el aislamiento en sangre de *S. pneumoniae*.
- Meningitis neumocócica: presencia de clínica compatible (fiebre, cefalea, rigidez de nuca, deterioro del nivel de consciencia, coma, convulsiones), con pleocitosis en el LCR (>5 células/ml) y aislamiento de *S. pneumoniae* en el cultivo de LCR y/o en el hemocultivo.
- Bacteriemia primaria: se estableció en aquellos pacientes con signos clínicos de infección (fiebre, sepsis, shock), aislamiento de *S. pneumoniae* en los hemocultivos y sin foco séptico identificado o conocido.
- Empiema neumocócico: líquido pleural purulento o bien pH <7,0 y/o glucosa <40 mg/dl y/o Gram directo positivo. Fue necesario el aislamiento en sangre o en el líquido pleural de *S. pneumoniae*.
- Inmunodepresión: presencia de infección por VIH, diabetes mellitus, hepatopatía crónica, esplenectomía, neoplasia hematológica o de órgano sólido, enfermedad autoinmune y trasplante de órgano.
- Consumo excesivo de alcohol: consumo de etanol superior a 40 g/día en varones y 32 g/día en mujeres, asociado o no a dependencia o daño orgánico.
- Hepatopatía: presencia de datos de insuficiencia hepática crónica (hipoalbuminemia, coagulopatía, ascitis, encefalopatía hepática, asterixis) en pacientes con factores asociados

con enfermedad hepática (consumo excesivo de alcohol, infección por virus hepatotropos...).

- Tasa de cobertura vacunal: porcentaje de serotipos aislados en EISP incluidos en la VPC.
- Tasa de vacunación: porcentaje de pacientes que recibieron al menos una dosis de VPC-7.

3.2. POBLACIÓN A ESTUDIO

El Servicio de Microbiología proporcionó los datos de los pacientes para la revisión de las historias clínicas. En la Tabla 4 se muestra la relación de variables clínicas recogidas de los pacientes con EISP. Siguiendo los grupos de riesgo en función de la edad, los pacientes se clasificaron en tres grupos: menores de 5 años, entre 6-64 años y mayores de 65 años.

En España, la VPC-7 fue comercializada e incluida en el calendario vacunal infantil en junio de 2001, aunque en la Comunidad Autónoma de Galicia no estaba financiada. La población y los aislamientos bacterianos a estudio fueron divididos en dos periodos: periodo prevacunal (1992-2001) y periodo postvacunal (2002-2008).

3.3. AISLAMIENTOS BACTERIANOS

De forma retrospectiva se estudiaron todas las cepas de *S. pneumoniae* aisladas en hemocultivos o líquidos biológicos estériles (LCR, pleural, articular o ascítico) que habían sido criopreservadas en VIABANK™ (MWE Medical Wire) a -80 °C por el Servicio de Microbiología del Complejo Hospitalario Xeral-Cíes entre enero de 1992 y diciembre de 2008. Las cepas aisladas se recuperaron mediante siembra en agar-chocolate y cultivo durante 24-48 horas a 35 ± 2°C en una atmósfera de CO₂.

Tabla 4: Relación de variables clínicas analizadas.

Datos epidemiológicos

- Edad
- Sexo
- Residencia en centro sociosanitario o geriátrico
- Ingreso en los 3 meses previos
- Vacunación antineumocócica previa (VPC-7, VPP-23)

Tabaquismo: activo o previo

Consumo excesivo de alcohol

Comorbilidades

- Trastornos neurológicos: deterioro cognitivo avanzado, ACV
- Insuficiencia cardíaca congestiva
- Insuficiencia renal avanzada (aclaramiento creatinina <30 ml/min)
- Patología pulmonar: asma, EPOC, bronquiectasias
- Inmunodepresión: infección por VIH (estadío de la CDC, nivel de CD4), neoplasia, diabetes mellitus, esplenectomía, hepatopatía crónica (estadío de Child-Pugh), fármacos

Consumo previo de antibióticos**Infección neumocócica invasiva**

- Tipo de infección: neumonía, bacteriemia primaria, meningitis, otros
- Régimen de tratamiento: ambulatorio, hospitalario, ingreso en UCI
- Tratamiento antibiótico empírico
- Evolución: necesidad de hospitalización tras tratamiento ambulatorio, ingreso en UCI tras estancia en planta de hospitalización convencional, cambio de tratamiento antibiótico por mala evolución clínica, empiema, IOT, secuelas neurológicas, muerte

NOTA: ACV accidente cerebro vascular, EPOC enfermedad pulmonar obstructiva crónica, IOT intubación orotraqueal, UCI unidad de cuidados intensivos, VPC-7 vacuna conjugada heptavalente, VPP-23 vacuna de polisacárido 23-valente.

3.4. IDENTIFICACIÓN Y SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

La identificación se realizó mediante la morfología de las colonias en agar-sangre y la sensibilidad a la optoquina. El estudio de sensibilidad de penicilina (PE), eritromicina (EM), clindamicina (CM), levofloxacino (LE) y cefotaxima (CT), se realizó en Müeller-Hinton sangre 5% en atmósfera de CO₂, mediante E-test (bioMérieux), según las recomendaciones y los puntos de corte del CLSI 2009 (177). Los aislamientos con sensibilidad intermedia o resistentes fueron clasificados como no sensibles (177).

En los aislamientos resistentes a EM se realizó el test de inducción de resistencia a CM mediante el método de difusión en Müeller-Hinton sangre 5% en atmósfera de CO₂ con los tiras de E-test una de EM y otra de CM separadas 15-20 mm (177). Aquellas cepas sensibles a CM en las que al aproximar ambas tiras de E-test la elipse de inhibición de crecimiento de *S. pneumoniae* se modificaba alrededor de la tira de CM fueron consideradas como cepas con resistencia inducible a CM. De esta forma los aislamientos resistentes a EM fueron clasificados según la CMI a EM y la resistencia o no a CM en uno de los dos fenotipos más habituales: fenotipo MLS_B constitutivo (CMI a EM ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ y CMI a CM ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$), fenotipo MLS_B inducible (CMI a EM ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ y resistencia inducible a CM) y fenotipo M (CMI a EM ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ y CMI a CM $\leq 0,25$ $\mu\text{g/ml}$) (188).

Se consideraron cepas multirresistentes aquellas no sensibles a 2 o más familias diferentes de antibióticos (130).

3.5. EXTRACCIÓN DEL ADN

Para la extracción del ADN bacteriano se tomaron varias colonias de *S. pneumoniae* y se resuspendieron en un tubo eppendorf con 1 ml de agua estéril. A continuación la muestra se centrifugó durante 1 min a 15.000 rpm. Tras descartar el sobrenadante con una micropipeta, se añadieron 200 μ L de InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories, USA) y se incubó a 56 $^{\circ}$ C durante 30 min. Posteriormente la muestra se agitó mediante vórtex durante 10 s y se volvió a incubar a 100 $^{\circ}$ C durante 8 min. Tras agitar nuevamente la muestra durante 10 s mediante vórtex, se centrifugó durante 2-3 min a 10.000-12.000 rpm. Posteriormente el ADN fue congelado a -20 $^{\circ}$ C hasta su utilización.

3.6. METODOLOGÍA COMÚN DE LAS PCR

La concentración de ADN se cuantificó en un espectrofotómetro (Unicam Helios Beta). Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador automático (Bio-RAAd Thermal Cycler C1000 o S1000). La electroforesis de los productos de la PCR se realizó en un gel de agarosa al 1,5% y un voltaje de 2V/cm durante 60 min. En todas las PCR se incluyó un control negativo en el que el ADN fue excluido de la mezcla y sustituido por H₂O. Los geles fueron teñidos con 0,5 μ g/ml de RedSafe™ (iNtRON Biotechnology) y para la determinación de los tamaños de los productos de la PCR se utilizó ADN Ladder Low MW 500 pb, Citomed o de 100pb ADN Ladder (Bioline). El ADN se visualizó en un transiluminador UV (UVP ImageStore V 7.00) digitalizándose las imágenes, siendo analizadas mediante el programa Gelworks 1D versión 3.01 de UVP.

3.7. DETECCIÓN DE MUTACIONES EN *parC* Y *gyrA*

En las cepas con CMI a LE en el límite alto de la sensibilidad (CMI 1-2 µg/ml) y en aquellas con sensibilidad intermedia o resistentes (CMI ≥4 µg/ml) se detectó la presencia de mutaciones en los genes *parC* y *gyrA*. En primer lugar se realizó una PCR para amplificación de dichos genes. Para un volumen final de 50 µl con 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada nucleótido, 1µM de cada primer, 100 ng de ADN y Taq ADN polimerasa 2 U de para la amplificación de *parC* y 1 U para la de *gyrA*. Para la amplificación de *parC* (366 pb) se emplearon los primers M0363 (5'-TGGGTTGAAGCCGGTTCA) y M4271 (5'-TGCTGGCAAGACCGTTG). Las condiciones de la amplificación fueron 94 °C durante 1 min, 53 °C durante 1 min y 72 °C durante 3 min (30 ciclos) (200). Para la amplificación de *gyrA* (382 pb) se emplearon los primers 5'-GATA(TC)GCIATGAG(CT)GT y 5'-CGIGC(TC)TCIGT(AG)TA(AT)CG, siendo las condiciones de amplificación 95 °C durante 30 s, 50 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s (30 ciclos) (225).

Para la detección de las mutaciones en *parC* y *gyrA* se realizó una RFLP (restriction fragment length polymorphism). Para ello los productos de la amplificación de *parC* y *gyrA* fueron digeridos con *HinfI* (a 37 °C durante 8 h). El producto de *parC* de 366-pb de tipo salvaje presenta a nivel de los nucleótidos 232 y 288 dos puntos de restricción mediante *HinfI*, por lo que se generaron tres fragmentos de 183-, 127- y 56-pb. La ausencia del sitio 232 por la mutación del codón 78 o 79 en los aislamientos resistentes generó dos fragmentos de 183-pb que dieron lugar a una única banda electroforética de 183-pb. El producto de *gyrA* de 382-pb de tipo salvaje es digerido por *HinfI* en un único sitio, produciéndose dos fragmentos de 110- y 272-pb. La presencia de una única banda de 382 pb se interpretó como mutación en este gen (200).

3.8. DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE *ermB* Y *mefA*

En aquellos neumococos con CMI a EM ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ se estudió la presencia de los genes *ermB* y/o *mefA*. Para un volumen final de 50 μl con 100 ng de ADN, 1X PCR Buffer, 1,5 mM MgCl_2 , 1 μM de cada primer, 800 μM de dNTPs y 0,025 U de Taq ADN polimerasa. Para la amplificación del gen *ermB* (384-pb) se utilizaron los primers: 5'-GAAAAGGTACTCAACCAAATA-3' y 5'-AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC-3'. Para la amplificación del gen *mefA* se emplearon los primers 5'-AGTATCATTAACTACTAGTGC-3' y 5'-TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG-3'. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 2 min a 95 $^{\circ}\text{C}$ seguidos de 35 ciclos de 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 30 s para *mefA* o 58 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 s para *ermB*, 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 min con un último ciclo de 5 minutos a 72 $^{\circ}\text{C}$ (226).

3.9. BOMBA DE EXPULSIÓN DE FLUOROQUINOLONAS

Aleatoriamente se seleccionaron 10 cepas con CMI a LE ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$, así como un grupo control con CMI a LE < 1 $\mu\text{g/ml}$ para la detección de la presencia de bombas de expulsión de fluoroquinolonas. Para ello se determinó la sensibilidad a CP de todas las cepas en Müeller-Hinton sangre al 5% con o sin la presencia de reserpina. Los aislamientos en los que la CMI a CP disminuyó al menos 4 diluciones ante la presencia de reserpina se consideraron positivos para bombas de expulsión de fluoroquinolonas (227).

3.10. SEROTIPADO

De forma aleatoria se seleccionaron, para un nivel de confianza del 90% y un poder estadístico del 80%, 46 cepas del periodo prevacunal (1992-2001) y 89 del postvacunal (2002-08). La determinación del serotipo se realizó mediante PCR múltiple (QIAGEN Multiplex PCR Kit) (228). Se seleccionaron los 14 serotipos más prevalentes en España (85), entre los que se incluyeron los SV-7 (Tabla 5) y se agruparon en 5 reacciones múltiples en función del tamaño de los productos de la PCR para poder diferenciar los serotipos: Multiplex 1: 9N/L, 19A, 6B y 3; Multiplex 2: 14, 4 y 9 V; Multiplex 3: 7F, 5 y 1; Multiplex 4: 23F y 8; Multiplex 5: 18C y 19F.

La PCR se realizó en un volumen de 25 μ l, cada mezcla contenía: 1 X PCR buffer (20 mM Tris-HCl; pH 8,0; 100 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 1M dithiothreitol; 0,5% Tween 20; 0,5% Nonidet P-40; 2,4 mM de $MgCl_2$; 2,0 U de Taq ADN polimerasa), 1,6 μ M de cada mezcla de primers. La condiciones de la PCR fueron 95 $^{\circ}$ C durante 15 min seguido de 35 ciclos de amplificación a 94 $^{\circ}$ C durante 30 s, 60 $^{\circ}$ C durante 1 min 30 s, 72 $^{\circ}$ C durante 1 min 30 s y 1 ciclo a 72 $^{\circ}$ C durante 10 min. Las cepas que no pertenecían a ninguno de los serotipos estudiados mediante PCR fueron enviadas al centro de referencia de nuestra comunidad (Hospital Arquitecto Marcide, Ferrol, A Coruña) donde el serotipo se estableció mediante la reacción de Quellung (Pneumotest-Latex, Statens Serum Institut, Copenhague, Dinamarca).

Tabla 5: Primers utilizados para la determinación del serotipo de *S. pneumoniae*.

Serotipo	Secuencia del primer (5' → 3')	Tamaño del producto (pb)
1-f	5'-CTC TAT AGA ATG GAG TAT ATA AAC TAT GGT TA-3'	280
1-r	5'-CCA AAG AAA ATA CTA ACA TTA TCA CAA TAT TGG C-3'	
3-f	5'-ATG GTG TGA TTT CTC CTA GAT TGG AAA GTA G-3'	371
3-r	5'-CTT CTC CAA TTG CTT ACC AAG TGC AAT AAC G-3'	
4-f	5'-CTG TTA CTT GTT CTG GAC TCT CGA TAA TTG G-3'	430
4-r	5'-GCC CAC TCC TGT TAA AAT CCT ACC CGC ATT G-3'	
5-f	5'-ATA CCT ACA CAA CTT CTG ATT ATG CCT TTG TG-3'	362
5-r	5'-GCT CGA TAA ACA TAA TCA ATA TTT GAA AAA GTA TG-3'	
6A/B-f	5'-AAT TTG TAT TTT ATT CAT GCC TAT ATC TGG-3'	250
6A/B-r	5'-TTA GCG GAG ATA ATT TAA AAT GAT GAC TA-3'	
7F-f	5'-CCT ACG GGA GGA TAT AAA ATT ATT TTT GAG-3'	826
7F-r	5'-CAA ATA CAC CAC TAT AGG CTG TTG AGA CTA AC-3'	
8-f	5'- GAT GCC ATG AAT CAA GCA GTG GCT ATA AAT C-3'	294
8-r	5'- ATC CTC GTG TAT AAT TTC AGG TAT GCC ACC-3'	
9N/L-f	5'-GAA CTG AAT AAG TCA GAT TTA ATC AGC-3'	516
9N/L-r	5'-ACC AAG ATC TGA CGG GCT AAT CAA T-3'	
9V-f	5'-CTT CGT TAG TTA AAA TTC TAA ATT TTT CTA AG-3'	753
9V-r	5'-GTC CCA ATA CCA GTC CTT GCA ACA CAA G-3'	
14-f	5'-CTT GGC GCA GGT GTC AGA ATT CCC TCT AC-3'	208
14-r	5'-GCC AAA ATA CTG ACA AAG CTA GAA TAT AGC C-3'	
18C-f	5'- CTT AAT AGC TCT CAT TAT TCT TTT TTT AAG CC-3'	573
18C-r	5'- TTA TCT GTA AAC CAT ATC AGC ATC TGA AAC-3'	
19A-f	5'-GTT AGT CCT GTT TTA GAT TTA TTT GGT GAT GT-3'	478
19A-r	5'-GAG CAG TCA ATA AGA TGA GAC GAT AGT TAG-3'	
19F-f	5'-GTT AAG ATT GCT GAT CGA TTA ATT GAT ATC C-3'	304
19F-r	5'-GTA ATA TGT CTT TAG GGC GTT TAT GGC GAT AG-3'	
23F-f	5'- GTA ACA GTT GCT GTA GAG GGA ATT GGC TTT TC-3'	384
23F-r	5'- CAC AAC ACC TAA CAC ACG ATG GCT ATA TGA TTC-3'	

3.10.1. Clasificación de los serotipos

Teniendo en cuenta el elevado número de serotipos de *S. pneumoniae*, éstos fueron clasificados en diferentes grupos para su posterior análisis.

- Serotipos incluidos en la VPC-7 (SV-7): 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F.
- Serotipos incluidos en la VPC-13 (SV-13): 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F.
- Serotipos invasivos: 1, 5 y 7F (96, 138).
- Serotipos no invasivos: 3, 6, 8, 15, 19, 23 y 33 (96, 138).
- Serotipos pediátricos: 6, 9, 14, 19 y 23 (142).

3.11. ANÁLISIS CLONAL EMPLEANDO GENOTIPADO BOX-A

Para el análisis mediante PCR convencional de polimorfismos de ADN con amplificación aleatoria (REP-PCR) se preparó un volumen de 50 µl con 1X PCR Buffer; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 µM de cada primer, 800 µM de dNTPs; 2,5 U de Taq y 100 ng de ADN (aprox 5 µl). La secuencia del primer utilizado (BOX-A) fue 5'-ATACTCTTCGAAAATCTCTCAAAC-3' (229). Las condiciones de la amplificación fueron a 94 °C durante 4 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 90 °C durante 1 min, 60 °C durante 2 min y 74 °C durante 2 minutos. Cada cepa fue asignada a un tipo de PCR BOX-A basándose en el patrón de bandas (230).

3.12. TIPADO MOLECULAR MEDIANTE MLST

El tipado epidemiológico molecular de *S. pneumoniae* se realizó mediante Multi Locus Sequencing Typing (tipado por secuenciación de locus múltiples, MLST) en el Instituto Valenciano de Microbiología. Se amplificaron y secuenciaron 7 genes: Shikimate deshidrogenasa (*aroE*), Glucosa-6-

fosfato deshidrogenasa (*gdh*), Glucosa kinasa (*gki*), Transcetolasa (*recP*), Peptidasa signal I (*spi*), Xantina fosforribosiltransferasa (*xpt*), D-alanina-D-alanina ligasa (*ddl*).

Posteriormente se realizó un análisis filogenético de los STs mediante el programa eBURST (<http://eburst.mlst.net/>). Este programa utiliza un modelo de evolución bacteriana para elaborar grupos basados en la proximidad genética con los ST fundadores, también llamados complejos clonales (CCs) (231). De esta forma se confeccionó un árbol filogenético para evaluar la proximidad genética entre los diferentes clones identificados.

3.13. ESTUDIO ESTADÍSTICO

El estudio estadístico se realizó mediante el paquete estadístico SPSS 17.0. Se comprobó la normalidad de las variables continuas mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las variables continuas se compararon mediante t-student o U de Mann-Whitney y se describieron como media \pm desviación típica (DT) o como mediana y rango, según la distribución normal o no de las variables. La χ^2 y el test exacto de Fisher se utilizaron para comparar las variables categóricas, según fuese adecuado. Se realizó un análisis multivariante mediante un modelo de regresión logística binaria para estimar los diferentes factores que influyeron en las variables a estudio. Para ello se incluyeron en el modelo aquellas variables que obtuvieron un valor de $p < 0,05$ en el análisis univariante. La significación estadística se estableció para un valor de $p < 0,05$. Para el cálculo del tamaño muestral se utilizó la macro !NR2IS V2010.02.15 © JM Domenech (232).





RESULTADOS



Se partió de 294 viales de *S. pneumoniae* procedentes de EISP, 46 cepas fueron eliminadas al no poderse recuperar el microorganismo criopreservado, bien por ausencia de crecimiento, bien por contaminación del criopreservado. Las 248 cepas restantes fueron nuevamente identificadas para confirmar la presencia de *S. pneumoniae*. Éstas fueron divididas en dos grupos según el año de aislamiento: periodo prevacunal, aisladas entre 1992-2001 (105 cepas) y periodo postvacunal, aisladas entre 2002-2008 (143 cepas).

Los aislamientos de *S. pneumoniae* obtenidos a partir de hemocultivos fueron 230 (93%), 16 de LCR (6%), 1 de líquido pleural (1%) y 1 de líquido peritoneal (1%). Se realizó la determinación de antígeno de neumococo en orina en 40 pacientes (19%), siendo positivo en 25 (sensibilidad 63%). Los falsos negativos fueron más frecuentes en las mujeres (62% vs 39%, $p = 0,035$).

4.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

De los 248 aislamientos microbiológicos se realizó la revisión de la historia clínica de 195 pacientes (62 del periodo prevacunal y 133 del postvacunal). Por ausencia o error en el número de historia clínica no se pudo acceder al historial de 53 pacientes. Las características epidemiológicas de los pacientes se muestran en la Tabla 6.

No se encontró diferencia en la edad de los pacientes entre ambos periodos ($p = 0,803$). Tampoco se observó modificación en el porcentaje de pacientes pertenecientes a los grupos de mayor riesgo por edad para EISP (menores de 5 años y mayores de 65 años), 41% en el periodo prevacunal y 54% en el postvacunal ($p = 0,229$). De los 38 niños menores de 5 años, 25 eran menores de 2 años (66%). Aunque el porcentaje de niños menores de 5 años con EISP aumentó entre los dos periodos (de 15% al 22%), no se demostró diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,252$). Sin embargo, al comparar por edad y sexos, se detectó un aumento en la prevalencia de EISP en niños

varones menores de 5 años (8% en periodo prevacunal y 29% en el postvacunal, $p = 0,007$), pero no en las niñas (29% en periodo prevacunal y 17% en el postvacunal, $p = 0,339$). La edad media de los pacientes adultos (mayores de 18 años) fue de $58 \pm 19,9$ años ($56 \pm 19,9$ años en el periodo prevacunal y $60 \pm 19,7$ años en el postvacunal, $p = 0,190$).

No se observó modificación en las comorbilidades de los pacientes entre ambos periodos (Tabla 6). El 61% de los pacientes presentaba una o más comorbilidades. Las características de los pacientes adultos (mayores de 18 años) fueron similares entre ambos periodos, salvo una mayor proporción de pacientes con insuficiencia cardíaca en el periodo postvacunal (2% vs 16%, $p = 0,012$).

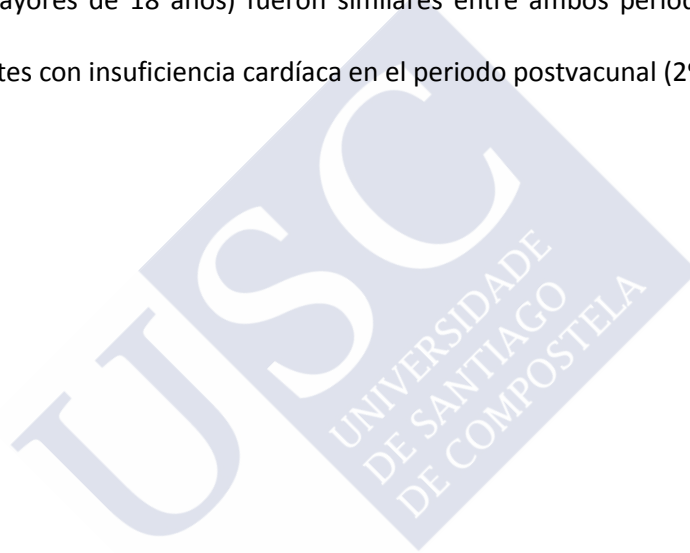


Tabla 6: Características epidemiológicas de los pacientes con EISP en los periodos pre y postvacunal.

	Periodo prevacunal (n=62)	Periodo postvacunal (n=133)	p
Sexo varón (n, %)	45 (73%)	76 (57%)	0,056
Edad (años ± DT)	46 ± 27,1	45 ± 30,5	0,803
- Menores de 5 años	9 (15%)	29 (22%)	0,252
- Entre 6-64 años	37 (60%)	61 (46%)	0,166
- Mayores de 65 años	16 (26%)	43 (32%)	0,405
Residente en centro sociosanitario (n, %)	0	2 (2%)	
Ingreso previo, <3 meses (n, %)	8 (11%)	21 (16%)	0,532
Broncoaspiración (n, %)	1 (2%)	5 (4%)	0,667
Comorbilidades (n, %)			
- Trastorno neurológico	3 (5%)	17 (13%)	0,277
- Insuficiencia cardíaca	2 (3%)	16 (12%)	0,098
- Insuficiencia renal	2 (3%)	5 (4%)	1
- Asma	2 (3%)	7 (5%)	0,722
- EPOC	8 (13%)	17 (13%)	1
- Bronquiectasias	1 (2%)	5 (4%)	0,667
- Diabetes mellitus	4 (6%)	6 (5%)	0,469
- Neoplasia	9 (14%)	23 (17%)	1
- Esplenectomía	1 (2%)	1 (1%)	0,536
- Infección por VIH	11 (18%)	13 (10%)	0,151
- Hepatopatía crónica	5 (8%)	7 (5%)	0,525
- Índice de Charlson (mediana, rango)	1 (0-7)	1 (0-8)	0,540
Consumo reciente de antibióticos (n, %)	4 (6%)	15 (11%)	0,589
Tabaquismo (n, %)	29 (47%)	60 (45%)	0,243
Consumo excesivo de alcohol (n, %)	12 (19%)	14 (11%)	0,060

NOTA: EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

Se identificaron 25 pacientes con EPOC, en su mayoría varones (88%) y fumadores (71%). Los pacientes con EPOC presentaban una edad media más avanzada ($66 \pm 14,9$ años vs $41 \pm 29,2$ años, $p < 0,001$) y una mayor tasa de comorbilidades (índice de Charlson 2 [1-7] vs 0 [0-8], $p < 0,001$) que los pacientes adultos sin EPOC. Al comparar los pacientes con y sin EPOC no se observaron diferencias en la tasa de ingreso en UCI, de IOT, ni en la mortalidad.

De los 24 pacientes infectados por el VIH, el 63% eran varones, con una edad media de $41 \pm 6,3$ años. Se identificó 1 paciente en los estadios A1, B2 y C2; 3 en el estadio A2 y 14 en el estadio C3; en 4 pacientes no se pudo conocer el estadio de la infección por VIH. El recuento de linfocitos CD4 más próximo al episodio de EISP fue 260 células/cc (rango 10-639 células/cc). En este trabajo no se recogió la carga viral del VIH. En estos pacientes la única forma clínica de EISP fue la neumonía. La tasa de ingreso en UCI fue inferior a la de la población general (4% vs 28%, $p = 0,024$). La mortalidad de estos pacientes fue inferior a la de la población general adulta, aunque la diferencia no alcanzó significación estadística (4% vs 14%, $p = 0,323$).

4.2. FORMAS DE PRESENTACIÓN CLÍNICA

Tras la introducción de la VPC-7 no se observó modificación en el tipo, ni en la gravedad (ingreso en UCI y mortalidad) de la EISP (Tabla 7). La neumonía fue la manifestación más frecuente (143 pacientes, 73%), seguida de la bacteriemia primaria (23 casos, 12%) y la meningitis (20 casos, 10%). Once pacientes con neumonía presentaron empiema (6%). En un único paciente se realizó el diagnóstico simultáneo de neumonía y meningitis neumocócica. Se encontró un origen nosocomial (es decir, en las 48 horas posteriores al ingreso) en 8 de las 143 neumonías (6%) y en 2 de las 23 bacteriemias primarias (9%). Entre las formas menos frecuentes de EISP se encontraron 3 pacientes con otitis media-otomastoiditis y 3 con peritonitis bacteriana espontánea. Otras manifestaciones clínicas fueron infección de prótesis articular (1 paciente), discitis (1 paciente), absceso cerebral temporal (1 paciente) y mediastinitis (1 paciente).

Tabla 7: Formas de presentación clínica y evolución de los pacientes con EISP en los periodos pre y postvacunal.

	Periodo prevacunal (n=62)	Periodo postvacunal (n=133)	p
Neumonía (n, %)	48 (77%)	95 (71%)	0,487
Meningitis (n, %)	6 (10%)	14 (11%)	1
Bacteriemia primaria (n, %)	5 (8%)	18 (14%)	0,344
Empiema	3 (5%)	8 (6%)	1
Otros (n, %)	2 (3%)	8 (6%)	0,784
Ingreso en UCI	12 (18%)	38 (25%)	0,166
Mortalidad	12 (18%)	19 (14%)	0,535

NOTA: UCI unidad de cuidados intensivos.

4.2.1. Neumonía

Las características de los 143 pacientes con neumonía se muestran en la Tabla 8. La neumonía fue la manifestación más frecuente en todos los grupos de edad, aunque en menores de 5 años la prevalencia de neumonía fue significativamente menor que en los otros grupos de edad (51% vs 79%, $p = 0,001$).

Entre el periodo pre y postvacunal se observó en la población adulta (mayor de 15 años) un descenso en el porcentaje de varones con neumonía (84% vs 52%, $p = 0,001$). También se detectó un descenso de pacientes con consumo excesivo de alcohol (28% vs 11%, $p = 0,018$), y un incremento de pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva (2% vs 15%, $p = 0,021$). Se observó un elevado porcentaje de pacientes con patología pulmonar (asma, EPOC, bronquiectasias). En el periodo postvacunal se observó un descenso en la prevalencia de pacientes con inmunodepresión, aunque no se demostró diferencia estadísticamente significativa (45% vs 28%, $p = 0,064$). El 77% de los pacientes presentaban al menos una comorbilidad, no encontrándose diferencia en el índice de Charlson entre ambos periodos (1 [0-7] vs 1 [0-8], $p = 0,247$). En el análisis multivariante los factores asociados a neumonía fueron la hepatopatía (odds ratio [OR] = 0,175, intervalo de convianza [IC] al 95% = 0,051-0,598) y la edad menor de 5 años (OR = 0,243, IC al 95% = 0,114-0,519). La mortalidad de los pacientes con neumonía fue inferior a la mortalidad asociada con las otras manifestaciones clínicas, aunque no se demostró diferencia estadísticamente significativa (11% vs 21%, $p = 0,103$).

Tabla 8: Características clínicas de los pacientes con neumonía de forma global y en los periodos pre y postvacunal.

	Total (n=143)	Prevacunal (n=48)	Postvacunal (n=95)	p
Sexo varón (n, %)	91 (64%)	38 (79%)	53 (56%)	0,009
Edad (media ± DT, años)	48 ± 27.1	48 ± 23.9	48 ± 28.7	0,983
- Menores de 5 años	19 (14%)	3 (6%)	16 (17%)	0,207
- Entre 6-64 años	82 (57%)	33 (69%)	49 (52%)	0,108
- Mayores de 65 años	42 (29%)	12 (25%)	30 (32%)	0,443
Tabaquismo	61 (43%)	22 (56%)	39 (42%)	0,189
Consumo excesivo de alcohol	21 (15%)	11 (28%)	10 (11%)	0,018
Comorbilidades				
- Insuficiencia cardíaca	15 (10%)	1 (2%)	14 (15%)	0,021
- Trastornos neurológicos	16 (11%)	3 (7%)	13 (14%)	0,273
- Patología pulmonar	34 (24%)	9 (19%)	25 (26%)	0,714
- Insuficiencia renal	6 (4%)	2 (4%)	4 (4%)	1
- Neoplasia	22 (15%)	9 (19%)	13 (14%)	0,461
- Diabetes mellitus	8 (6%)	4 (9%)	4 (4%)	0,438
- Hepatopatía	5 (4%)	2 (4%)	3 (3%)	1
- VIH	22 (15%)	10 (21%)	12 (13%)	0,220
- Índice de Charlson (mediana, rango)	1 (0-8)	1 (0-7)	1 (0-8)	0,247
Ingreso en UCI	26 (18%)	5 (10%)	21 (22%)	0,109
Exitus	16 (11%)	7 (15%)	9 (10%)	0,404

NOTA: UCI unidad de cuidados intensivos; VIH virus de la inmunodeficiencia humana.

Un total de 26 pacientes fueron ingresados en UCI, 5 en el periodo prevacunal (10%) y 21 en el postvacunal (22%). Aunque la tasa de ingreso en UCI aumentó, no alcanzó diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,109$). Ocho pacientes, todos ellos en el periodo postvacunal (0% vs 8%, $p = 0,052$), fueron intubados por fracaso respiratorio. Las características epidemiológicas de los pacientes ingresados en UCI fueron similares a los otros pacientes con neumonía, observándose únicamente un índice de Charlson inferior en los pacientes ingresados en UCI (0 [0-6] vs 1 [0-8], $p = 0,038$). No se observó diferencia en la mortalidad de los pacientes con neumonía que ingresaron en UCI frente a los que no ingresaron (15% vs 11%, $p = 0,498$).

Se serotiparon 76 aislamientos procedentes de pacientes con neumonía (15 en el periodo prevacunal y 61 en el postvacunal), identificándose 20 serotipos diferentes. Los serotipos más prevalentes fueron el 19A (10 aislamientos, 13%), 9V (10 aislamientos, 13%), 3 (8 aislamientos, 11%) y 14 (8 aislamientos, 11%). En la Figura 2 se muestran los 6 serotipos más frecuentes, no demostrándose variaciones significativas entre el periodo pre y postvacunal.

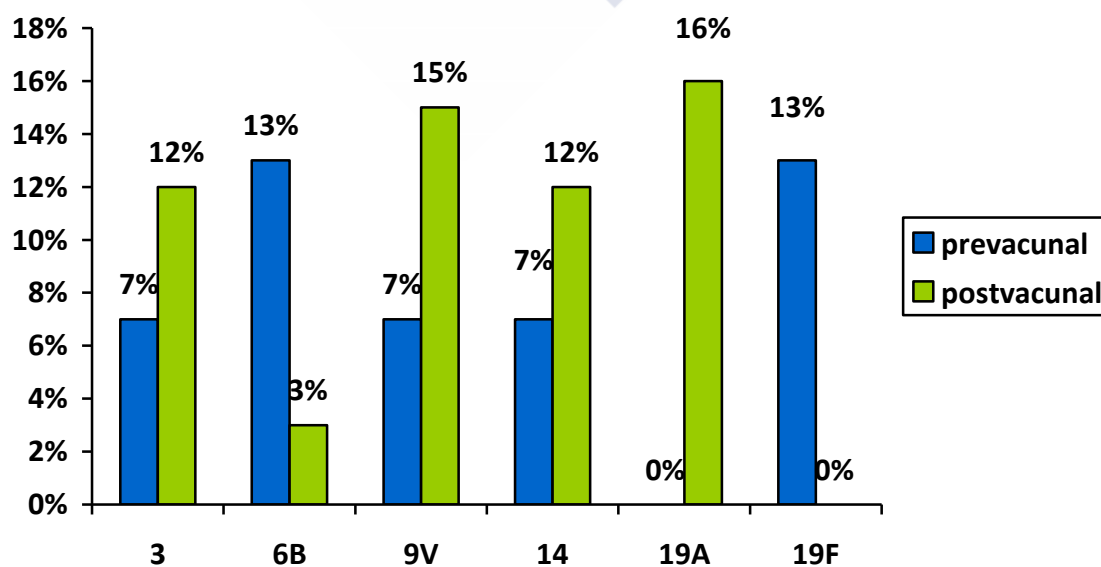


Figura 2: Serotipos más frecuentes aislados en pacientes con neumonía en los periodos pre y postvacunal.

La prevalencia de los SV-7 aislados en pacientes con neumonía no varió entre ambos periodos (53% en el prevacunal y 62% en el postvacunal, $p = 0,569$). Aunque no se pudo demostrar diferencia estadísticamente significativa, se observó un descenso de los SV-7 responsables de neumonía en los pacientes menores de 5 años (100% vs 46%), así como en los mayores de 65 años (100% vs 35%). No fue posible realizar un análisis estadístico debido al tamaño de la muestra, ya que en el periodo prevacunal se identificó un único caso de neumonía por SV-7 en ambos grupos de edad. Por otro lado, en los pacientes con neumonía se observó un descenso en los serotipos no invasivos (60% vs 23%, $p = 0,014$).

4.2.2. Bacteriemia primaria

Se identificaron 23 casos de bacteriemia primaria, siendo ésta la segunda manifestación más frecuente en nuestro estudio (12%). Las características de los pacientes se muestran en la Tabla 9. Se analizaron las características de los pacientes con bacteriemia primaria en los periodos pre y postvacunales y no se encontraron diferencias significativas, por este motivo no se muestran en la Tabla 9.

El 70% de los casos de bacteriemia primaria se concentraron en los grupos de edad extremos (menores de 5 años y mayores de 65 años), aunque no se pudo demostrar una prevalencia superior en estos grupos de edad ($p = 0,083$). En el análisis multivariante los factores asociados con bacteriemia primaria fueron el tabaquismo (OR = 0,154, IC al 95% = 0,040-0,597) y hepatopatía (OR = 12,1, IC al 95% = 2,998-49,123). Los pacientes con bacteriemia primaria presentaban una tasa menor de comorbilidades que los pacientes con otras formas de EISP, aunque no se pudo demostrar diferencia estadística (índice de Charlson 1 [0-3] vs 1 [0-8], $p = 0,480$).

Fallecieron 8 pacientes con bacteriemia primaria (35%) lo que supuso una mortalidad superior a la de otras formas de presentación clínica (11%, $p = 0,006$), incluso superior a la mortalidad observada en los casos de meningitis (10%), aunque la diferencia no alcanzó significación estadística ($p = 0,076$). Los pacientes con bacteriemia primaria que fallecieron respecto a los no fallecidos presentaban una edad más elevada (68 años [0,1-91 años] vs 41 años [0,5-89 años], $p = 0,072$), así como una mayor tasa de comorbilidad (índice de Charlson 1,5 [0-3] vs 0 [0-3], $p = 0,093$), aunque tampoco se pudo demostrar diferencia estadísticamente significativa. Por otro lado, el porcentaje de pacientes que requirieron ingreso en UCI fue similar al de otras formas clínica (27% vs 17%, $p = 0,447$).

Se serotiparon 10 aislamientos procedentes de pacientes con bacteriemia primaria y se identificaron 8 serotipos diferentes. Dos aislamientos del serotipo 6B, 1 aislamiento de los siguientes serotipos: 4, 15C, 17F, 19A, 19F, 33F, 38 y un aislamiento no tipable. En el periodo postvacunal se observó un incremento en la prevalencia de SV-7 (25% vs 50%, $p = 0,574$), aunque por el bajo número de casos (4 en el periodo prevacunal y 6 en el postvacunal) no se alcanzó diferencia estadísticamente significativa. No se identificó ningún aislamiento perteneciente a los serotipos invasivos (serotipos 1, 5 y 7F). Por otro lado, la tasa de serotipos no invasivos en pacientes con bacteriemia primaria (30%) fue similar a la de otras manifestaciones clínicas (32%).

Tabla 9: Características de los 23 pacientes con bacteriemia primaria por *S. pneumoniae*.

Sexo varón (n, %)	11 (48%)
Edad (media \pm DT, años)	43 \pm 33,3
- Menores 5 años	8 (35%)
- Entre 6-64 años	7 (30%)
- Mayores de 65 años	8 (35%)
Tabaquismo	3 (13%)
Consumo excesivo de alcohol	3 (13%)
Comorbilidades	
- Insuficiencia cardíaca	1 (4%)
- Trastornos neurológicos	0 (0%)
- Patología pulmonar	3 (13%)
- Insuficiencia renal	0 (0%)
- Neoplasia	5 (22%)
- Diabetes mellitus	1 (4%)
- Hepatopatía	6 (26%)
- VIH	0 (0%)
- Índice de Charlson (mediana, rango)	1 (0-3)
Ingreso en UCI	4 (17%)
Exitus	8 (35%)

NOTA: UCI unidad de cuidados intensivos; VIH virus de la inmunodeficiencia humana.

4.2.3. Meningitis

Veinte pacientes (10%) fueron diagnosticados de meningitis neumocócica, en 16 de ellos se realizó el aislamiento de *S. pneumoniae* de forma simultánea en sangre y en LCR y en 4 pacientes *S. pneumoniae* sólo pudo ser aislado en sangre. Las características clínicas de estos pacientes se muestran en la Tabla 10, no encontrándose diferencia significativa entre el periodo pre y postvacunal por lo que no se muestran en la tabla. Entre los pacientes diagnosticados de meningitis destacaba una baja tasa de comorbilidades en comparación con las otras formas clínicas de EISP (índice de Charlson 0 [0-2] vs 1 [0-8], $p < 0,001$). En el análisis multivariante se encontró como único factor asociado con la meningitis el índice de Charlson (OR = 0,362, IC al 95% = 0,164-0,800). Se observaron secuelas neurológicas en 4 pacientes (20%). La tasa de ingreso en UCI fue superior a la de otros cuadros clínicos (90% vs 18%, $p < 0,001$), aunque no se encontraron diferencias en la necesidad de IOT (10% vs 5%, $p = 0,324$), ni en la mortalidad (10% vs 15%, $p = 0,748$). Fallecieron 2 pacientes (10%), ambos mayores de 65 años.

Dos pacientes presentaban una fístula de LCR y uno de ellos sufrió dos episodios de meningitis neumocócica en el periodo de estudio. Los serotipos de los neumococos de los dos episodios fueron diferentes (serotipo 21 en el primer episodio y serotipo 3 en el segundo).

Se serotiparon los 20 neumococos aislados en pacientes con meningitis y se identificaron 13 serotipos diferentes: 4 aislamientos del serotipo 3, 3 aislamientos del serotipo 19F, 2 aislamientos de los serotipos 6A y 9V y 1 aislamiento de los serotipos 4, 6B, 7F, 9N, 14, 17F, 19A, 19F, 21 y 23B. Se observó un descenso significativo de los SV-7 en el periodo postvacunal (83% vs 21%, $p = 0,018$), que se asoció con un descenso de las cepas no sensibles a PE en el periodo postvacunal (67% vs 14%, $p = 0,042$), aunque no se observó modificación de las cepas multirresistentes (17% vs 14%, $p = 1$). Cabe destacar que en el periodo postvacunal no se identificó ninguna cepa no sensible a CT (17% vs 0%, p

= 0,300). Se detectaron 12 casos (60%) de meningitis producidas por serotipos pediátricos, 1 (5%) por serotipos invasivos y 10 (50%) por serotipos no invasivos.

Tabla 10: Características de los 20 pacientes con meningitis.

Sexo varón (n, %)	14 (70%)
Edad (mediana, rango años)	34 (0,1-83)
- Menores 5 años	7 (35%)
- Entre 6-64 años	7 (35%)
- Mayores de 65 años	6 (30%)
Tabaquismo	8 (40%)
Consumo excesivo de alcohol	2 (10%)
Comorbilidades	
- Insuficiencia cardíaca	0 (0%)
- Trastornos neurológicos	1 (5%)
- Patología pulmonar	1 (5%)
- Insuficiencia renal	1 (5%)
- Neoplasia	1 (5%)
- Diabetes mellitus	0 (0%)
- Hepatopatía	0 (0%)
- VIH	0 (0%)
- Índice de Charlson (mediana, rango)	0 (0-2)
Ingreso en UCI	18 (90%)
Exitus	2 (10%)

NOTA: UCI unidad de cuidados intensivos, VIH virus de la inmunodeficiencia humana.

4.2.4. Empiema

Se identificaron 11 pacientes con empiema (6%), en un paciente el aislamiento de *S. pneumoniae* se realizó en líquido pleural y en el resto en sangre. Las características de los pacientes se muestran en la Tabla 11. No se encontraron diferencias significativas en las características de los pacientes entre el periodo pre y postvacunal.

El 55% de los empiemas se diagnosticaron en pacientes menores de 15 años. Así, en los pacientes entre 6-15 años la tasa de neumonía complicada con empiema fue significativamente superior a la de los otros grupos de edad (40% vs 7%, $p = 0,049$). Asimismo, en mujeres se detectó un mayor riesgo de ingreso en UCI (OR = 11,6, IC al 95% = 1,125-119,618). Este hallazgo se puso en relación con una edad significativamente inferior en las mujeres ($11 \pm 18,4$ años vs $41 \pm 36,7$ años, $p = 0,005$).

Se serotiparon todos los aislamientos de pacientes con empiema y se identificaron 8 serotipos diferentes: serotipo 3 (3 aislamientos), 1 (2 aislamientos) y 1 aislamiento de los serotipos 7F, 8, 9V, 14, 19A, 19F. No se demostró cambio en la tasa de SV-7 antes y después de la introducción de la VPC-7 (33% vs 25%, $p = 1$). Los serotipos invasivos fueron más frecuentes en los pacientes con empiema que en otras formas de EISP, aunque no se observó diferencia estadísticamente significativa (27% vs 9%, $p = 0,095$).

Tabla 11: Características de los 11 pacientes con empiema.

Sexo varón (n%)	7 (64%)
Edad (mediana, rango años)	9 (0,7-100)
- Menores de 5 años	4 (36%)
- Entre 6-64 años	5 (46%)
- Mayores de 65 años	2 (18%)
Tabaquismo	2 (18%)
Consumo excesivo de alcohol	1 (9%)
Comorbilidades	
- Insuficiencia cardíaca	1 (9%)
- Trastornos neurológicos	0 (0%)
- Patología pulmonar	2 (18%)
- Insuficiencia renal	0 (0%)
- Neoplasia	0 (0%)
- Diabetes mellitus	1 (9%)
- Hepatopatía	1 (9%)
- VIH	1 (9%)
- Índice de Charlson (mediana, rango)	0 (0-6)
Ingreso en UCI	5 (45%)
Exitus	0 (0%)

NOTA: UCI unidad de cuidados intensivos, VIH virus de la inmunodeficiencia humana.

4.3. EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES CON EISP

La evolución clínica fue favorable en 152 pacientes (78%). El tratamiento se realizó de forma ambulatoria en 22 pacientes (11%), 4% en el periodo prevacunal y 14% en el postvacunal ($p = 0,054$). Dos pacientes requirieron ingreso por mala evolución (9%). En los pacientes entre 15 y 24 años se realizó tratamiento ambulatorio en un porcentaje mayor que en otros grupos de edad (50% vs 9%, $p = 0,017$). Al analizar y comparar las características de los pacientes tratados de forma ambulatoria en ambos periodos, se observó un aumento del número de pacientes diagnosticados de neumonía (0% vs 82%), una mejor evolución clínica (67% vs 100%) y una menor tasa de reingresos (33% vs 0%) en el periodo postvacunal.

4.3.1. Ingreso en UCI

Un total de 50 pacientes (28%) requirieron ingreso en UCI, 12 (19%) en el periodo prevacunal y 38 (29%) en el postvacunal ($p = 0,166$). La patología con mayor tasa de ingreso en UCI fue la meningitis (90%), seguido del empiema (45%). Los pacientes mayores de 65 años presentaron una menor tasa de ingreso en UCI (19%) en comparación con los otros grupos de edad (29% en menores de 5 años, 26% en pacientes entre 6-64 años), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0,478$). Por otro lado, la tasa de comorbilidad fue significativamente inferior en los pacientes que ingresaron en UCI (índice de Charlson 0 [0-6] vs 1 [0-8], $p = 0,001$). En el análisis multivariante los factores asociados con el ingreso en UCI fueron la meningitis (OR = 46,385, IC al 95% = 10,144-212,092) y el empiema (OR = 4,295, IC al 95% = 1,220-15,125). Once pacientes precisaron IOT (5%), 7 de ellos (64%) eran mayores de 65 años, 3 tenían entre 6-64 años (27%) y uno (9%) era menor de 5 años ($p = 0,035$).

4.3.2. Mortalidad

De los 195 pacientes estudiados fallecieron 31 (16%): 16 con neumonía, 8 con bacteriemia primaria, 2 con meningitis y un paciente con un absceso cerebral. No se pudo acceder a la historia clínica de los otros 4 pacientes para establecer el tipo de EISP. La tasa de mortalidad no se modificó entre ambos periodos (18% prevacunal y 14% postvacunal, $p = 0,531$). En función de la edad, la mortalidad osciló entre un 5% en menores de 5 años y un 30% en mayores de 65 años ($p < 0,001$). En el análisis multivariante los factores asociados con la mortalidad fueron: edad superior a 65 años (OR = 3,532, IC al 95% = 1,421-8,779), bacteriemia primaria (OR = 5,164, IC al 95% = 1,801-14,806) e IOT (OR = 5,327, IC al 95% = 1,383-20,521). Los pacientes fallecidos presentaban una mayor tasa de comorbilidades (índice de Charlson 2 [0-6] vs 1 [0-8], $p = 0,030$). No se observó relación entre la mortalidad y los diferentes serotipos (invasivos, no invasivos, pediátricos o SV-7).

4.3.3. EISP recurrente

En el estudio se identificaron dos pacientes con EISP recurrente (1%), ambos habían sido vacunados previamente con VPP-23. Uno de ellos era una mujer VIH positiva que en el periodo de estudio presentó dos episodios de neumonía. En el segundo episodio el *S. pneumoniae* pertenecía al serotipo 9N/L, incluido en la VPP-23. El otro paciente era un varón con una fístula de LCR tras una fractura facial, que en un periodo de 2 años presentó dos meningitis neumocócicas por dos serotipos diferentes (en el primer episodio se identificó *S. pneumoniae* serotipo 21 y en el segundo serotipo 3). Tras el cierre de la fístula de LCR el paciente no presentó nuevas recurrencias de meningitis neumocócica.

4.4. SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

Se estudió la sensibilidad a PE, CT, EM, CM y LE en las 248 cepas de *S. pneumoniae*, sin que se demostrara variación de la sensibilidad a estos antimicrobianos entre el periodo pre y postvacunal (Tabla 12). En la Figura 3 se muestran los 6 serotipos más prevalentes y su tasa de aislamientos no sensibles a los antimicrobianos testados.

Tabla 12: Prevalencia de aislamientos no sensibles a PE, CT, EM, CM y LE y multirresistentes entre el periodo pre y postvacunal.

	Periodo prevacunal (n= 105)	Periodo postvacunal (n= 143)	p
No sensible PE	33 (31%)	35 (24%)	0,250
No sensible CT	6 (6%)	5 (3%)	0,535
No sensible EM	17 (16%)	32 (22%)	0,260
No sensible CM	16 (15%)	23 (16%)	1
No sensible LE	0	1 (1%)	
Multirresistentes	12 (11%)	16 (11%)	1

NOTA: CM clindamicina, CT cefotaxima, EM eritromicina, LE levofloxacino, PE penicilina.

*Véase en el apartado 3.4 la definición de cepas no sensibles y de multirresistentes.

4.4.1. Betalactámicos

Se identificaron 68 cepas (27%) no sensibles a PE, 14 de ellas (6%) resistentes (en los 6 casos de infección meningea la CMI fue $\geq 0,12\mu\text{g/ml}$ y en los 8 casos restantes fue $\geq 2\mu\text{g/ml}$). Estas cepas se aislaron más frecuentemente en pacientes menores de 4 años (35% vs 14%, $p = 0,002$) y pertenecían en su mayoría a los SV-7 (88% vs 17%, $p < 0,001$), especialmente a los serotipos 14 (27%), 9V (22%), 19F (20%) y 6B (12%). En el análisis multivariante los factores asociados con las cepas no sensibles a

PE fueron los SV-7 (OR = 53,356, IC al 95% = 15,763-180,601) y la EPOC (OR = 12,613, IC al 95% = 2,069-76,882).

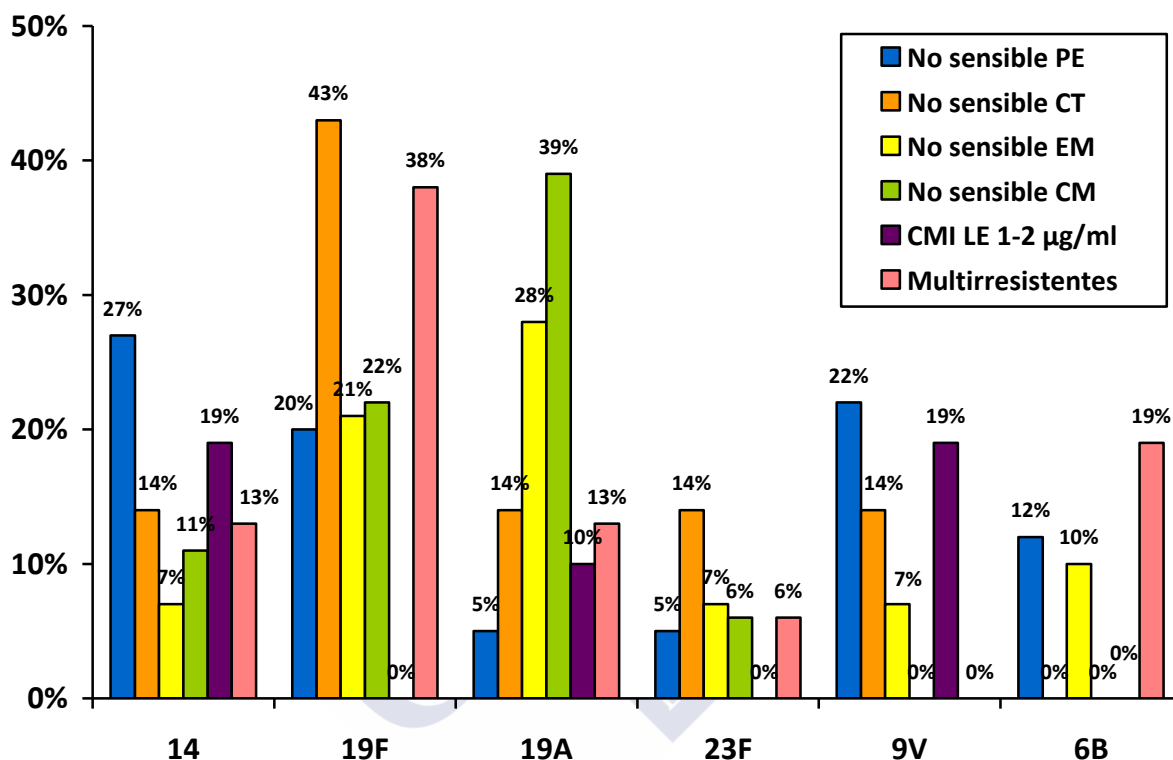


Figura 3: Serotipos y tasa de aislamientos no sensibles a PE, CT; EM y CM.

NOTA: CM clindamicina, CT cefotaxima, EM eritromicina, LE levofloxacino, PE penicilina.

De los 11 *S. pneumoniae* no sensibles a CT (4%), ninguno era resistente. Se detectó un mayor porcentaje de SV-7 en las cepas no sensibles a CT (86% vs 38%, $p = 0,017$). Los serotipos no sensibles a CT más frecuentemente aislados fueron: 19F (43%), 14 (14%), 23F (14%) y 9V (14%). No se observó una mayor mortalidad en los pacientes con aislamientos no sensibles a PE (13% vs 16%, $p = 0,825$) o CT (20% vs 15%, $p = 0,561$).

4.4.2. Macrólidos

Se detectaron 49 cepas no sensibles a EM (20%), de ellas 46 (19%) eran resistentes (CMI ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$). La tasa de aislamientos resistentes a EM fue significativamente más elevada en pacientes menores de 5 años (31% vs 15%, $p = 0,023$). En el periodo postvacunal no se modificó la prevalencia de cepas no sensibles a EM (Tabla 12), aunque se observó un descenso de los SV-7 entre estos aislamientos ((86% vs 46%, $p = 0,094$). Los serotipos no sensibles a EM más frecuentemente identificados fueron: 19A (28%), 19F (17%) y 14 (10%). Pertenecer al serotipo 19A fue el único factor asociado con la disminución de la sensibilidad a EM en el análisis multivariante (OR = 8,696, IC al 95% = 2,411-31,368).

Se detectaron 37 cepas con fenotipo MLS_B (80%), 7 de ellas (19%) con un fenotipo inducible, y 9 (20%) con fenotipo M. En ambos periodos el fenotipo MLS_B fue el más prevalente, aunque se observó un descenso de este fenotipo en el periodo postvacunal (94% vs 73%, $p = 0,132$). En 34 (92%) aislamientos con fenotipo MLS_B se identificó el gen *ermB* y en todas las cepas con fenotipo M se identificó el gen *mefA*. Una cepa poseía ambos genes de resistencia (serotipo 14, ST-156), presentando sensibilidad intermedia a PE, resistencia a CM, siendo sensible a CT y LE. En tres aislamientos resistentes a EM no se pudo identificar ninguno de estos dos genes de resistencia. El fenotipo M se asoció con una CMI a LE entre 1-2 $\mu\text{g/ml}$ (33% vs 3%, $p = 0,021$). Al comparar ambos fenotipos no se encontró diferencia en la tasa de cepas no sensibles a PE (44% vs 60%, $p = 0,472$), ni de cepas multirresistentes (44% vs 60%, $p = 0,472$).

4.4.3. Fluoroquinolonas

De las 248 cepas de *S. pneumoniae* estudiadas, se detectó un único aislamiento resistente a LE (0,4%). Esta cepa fue aislada en el periodo postvacunal y pertenecía al serotipo 23F, ST-81. Era portadora de mutaciones en *parC* y *gyrA*, así como de bomba de expulsión de fluoroquinolonas. Fue

identificada en un paciente con demencia evolucionada que residía en un centro sociosanitario e ingresó por neumonía asociada a cuidados sanitarios. Se desconocía la exposición previa a fluoroquinolonas y no pudo realizar seguimiento posterior, ya que fue trasladado a otro centro. La cepa de neumococo presentaba además una sensibilidad intermedia a PE y CT y era resistente a EM y CM (fenotipo MLS_B , genotipo *ermB*).

Se observó un incremento significativo de cepas con CMI a LE 1-2 $\mu\text{g/ml}$ entre el periodo pre y postvacunal (7% vs 21% $p = 0,002$). En ninguno de estos aislamientos se detectaron mutaciones en *parC* o *gyrA* y el estudio de bomba de expulsión de fluoroquinolonas fue negativo en todos los casos analizados. No se demostró relación entre estas cepas y aquellas con sensibilidad disminuida a otros antimicrobianos (Tabla 13). De estos 37 aislamientos 4 presentaban una CMI a EM $\geq 1 \mu\text{g/ml}$, tres con genotipo *mefA* y un *emrB*. En el análisis multivariante se encontró asociación entre la CMI a LE 1-2 $\mu\text{g/ml}$ y la patología pulmonar (OR = 2,870, IC al 95% = 1,241-6,637), así como con el genotipo *mefA* (OR = 15, IC al 95% = 1,355-166,054).

Tabla 13: Características de los pacientes y de las resistencias a antimicrobianos de los *S. pneumoniae* con CMI a LE <1 µg/ml o CMI a LE 1-2 µg/ml.

	CMI-LE < 1 µg/ml (n = 173)	CMI-LE 1-2 µg/ml (n = 37)	p
Edad (media ± DT años)	45 ± 29,9	44 ± 26,0	0,833
Sexo varón (n, %)	103 (60%)	26 (70%)	0,268
Residente en centro sociosanitario (n, %)	1 (1%)	1 (3%)	0,322
Ingreso previo (n, %)	22 (13%)	7 (19%)	0,285
Tabaquismo (n, %)	59 (38%)	14 (41%)	0,704
Consumo excesivo de alcohol (n, %)	24 (15%)	2 (6%)	0,183
Patología pulmonar	23 (13%)	11 (30%)	0,022
Tratamiento antibiótico previo (n, %)	14 (8%)	5 (14%)	0,334
Índice de Charlson (mediana, rango)	1 (0-8)	1 (0-8)	0,314
Resistencia a antibióticos (n, %)			
- No sensible a PE	57 (27%)	10 (27%)	1
- No sensible a CT	9 (4%)	1 (3%)	1
- No sensible a EM	44 (21%)	4 (11%)	0,183
- No sensible a CM	34 (16%)	4 (11%)	0,622
- Multirresistente	26 (12%)	1 (3%)	0,904

NOTA: CM clindamicina, CT cefotaxima, EM eritromicina, EPOC enfermedad pulmonar obstructiva crónica, LE levofloxacino, PE penicilina.

4.4.4. Multirresistentes

Se identificaron 28 cepas (11%) multirresistentes (véase definición en apartado 3.4). Todos los aislamientos fueron no sensibles a PE (3 de ellas resistentes) y EM (26 de ellas resistentes), un aislamiento fue no sensible a CT, 19 fueron no sensibles a CM (16 de ellas resistentes) y uno resistente a LE. La prevalencia de cepas multirresistentes no se modificó entre ambos periodos (11% vs 11%, p = 0,459) y estos aislamientos pertenecían con más frecuencia a los SV-7 (24% vs 6%, p =

0,004), siendo los más frecuentes los serotipos 19F (6 aislamientos, 21%) y 6B (3 aislamientos, 11%). Otros serotipos multirresistentes identificados fueron el 14, 19A, 23F, 3 y 9N/L. Las cepas multirresistentes se aislaron con mayor frecuencia en los pacientes menores de 5 años (41% vs 18%, $p = 0,022$) y menos frecuentemente en pacientes con neumonía (8% vs 19%, $p = 0,034$). No hubo diferencia en las otras formas clínicas de EISP: meningitis (15% vs 11%, $p = 0,359$), bacteriemia primaria (17% vs 10%, $p = 0,246$). En los pacientes infectados por cepas multirresistentes no se observó un mayor porcentaje de casos de modificación del tratamiento antibiótico por mala evolución clínica (4% vs 5%, $p = 1$). No se demostró un aumento en la mortalidad en los pacientes infectados por cepas multirresistentes (17% vs 10%, $p = 0,745$), ni una mayor tasa de exposición previa a antibióticos (14% vs 10%, $p = 0,404$). En el análisis multivariante se encontró asociación entre las cepas multirresistentes y los SV-7 (OR = 6,737, IC al 95% = 2,081-21,818).

4.5. TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO

El tipo de tratamiento antibiótico se recogió en 141 pacientes, el 97% de los cuales fueron tratados en régimen hospitalario. De los 22 pacientes en los que se realizó tratamiento ambulatorio sólo se pudo conocer el tratamiento antibiótico en 4 pacientes (18%), 3 recibieron tratamiento con fluoroquinolonas y 1 con betalactámicos. De los 137 pacientes ingresados se utilizó un antibiótico en monoterapia en 58 pacientes (42%), siendo amoxicilina-clavulánico el fármaco más utilizado (36%), seguido de ceftriaxona (11, pacientes, 19%) y levofloxacino (7 pacientes, 12%). En los 79 pacientes en los que se utilizó combinación de varios antimicrobianos, 73 recibieron 2 fármacos antibióticos y 6 fueron tratados con 3 antibióticos. El antibiótico más frecuentemente utilizado en combinación fue ceftriaxona (58 pacientes, 79%) que se asoció a levofloxacino (31 pacientes, 53%) o macrólidos (16 pacientes, 28%); en los 11 pacientes restantes se emplearon combinaciones con otros antimicrobianos, como glicopéptidos, metronidazol, aminoglucósidos o linezolid.

El tratamiento combinado empírico fue significativamente más frecuente que la monoterapia en pacientes con meningitis (19% vs 5%, $p = 0,020$). Por el contrario, la monoterapia se empleó con más frecuencia en pacientes menores de 5 años (32% vs 14%, $p = 0,024$) y aquellos con bacteriemia primaria (19% vs 4%, $p = 0,004$). En pacientes con neumonía, en los que se recogió el tratamiento utilizado (98 pacientes), el 60% recibieron tratamiento combinado. La mortalidad de los pacientes que recibieron tratamiento combinado fue superior, aunque no se demostró diferencia estadísticamente significativa (13% vs 3%, $p = 0,082$). Esta mayor mortalidad se relacionó con una mayor gravedad clínica y necesidad de ingreso en UCI en el grupo de pacientes que recibieron tratamiento combinado (34% vs 10%, $p = 0,008$). Al comparar las diferentes combinaciones de antibióticos se observó una mayor mortalidad en los pacientes que recibieron betalactámico con fluoroquinolona (18%) frente a los que recibieron betalactámico con macrólido (6%), aunque la diferencia no alcanzó significación estadística ($p = 0,556$). Este hallazgo también se relacionó con un mayor porcentaje de pacientes ingresados en UCI entre los que recibieron betalactámico con fluoroquinolona frente a la combinación de betalactámico con macrólido (42% vs 12%, $p < 0,001$). Finalmente, la mortalidad de los pacientes que recibieron combinación de betalactámico con un antibiótico diferente de fluoroquinolona o macrólido, fue superior (25%) a la de aquellos tratados con betalactámico y fluoroquinolona (18%) o macrólido (6%), aunque la diferencia no alcanzó significación estadística ($p = 0,406$).

4.6. VARIACIÓN DE LOS SEROTIPOS

La prevalencia de los serotipos más frecuentes en periodo prevacunal y postvacunal se muestra en la Tabla 14. Analizando los serotipos más prevalentes en ambos periodos, se demostró un descenso significativo de un SV-7, el 19F (17% vs 2%, $p = 0,001$), y un aumento no significativo, de un SNV-7, el 19A (2% vs 13%, $p = 0,058$).

Tabla 14: Prevalencia de los serotipos más prevalentes en el periodo pre y post-vacunal.

Serotipo	Periodo Prevacunal (n = 46)	Periodo Postvacunal (n= 89)	p
1	3 (7%)	4 (5%)	0,688
3	5 (11%)	12 (14%)	0,788
6B	4 (9%)	4 (5%)	0,444
7F	0 (0%)	6 (7%)	0,095
8	3 (7%)	2 (2%)	0,335
9V	3 (7%)	10 (11%)	0,542
14	3 (7%)	10 (11%)	0,542
19A	1 (2%)	11(12%)	0,058
19F	9 (20%)	2 (2%)	0,001

Al estudiar los serotipos por grupos de edad, no se observaron modificaciones significativas, salvo un descenso del 6B en menores de 15 años ($p = 0,057$) y un descenso del 19F en pacientes mayores de 15 años ($p = 0,004$). En la figura 4A y 4B se muestran las modificaciones de los serotipos más prevalentes en los pacientes menores o mayores de 15 años.

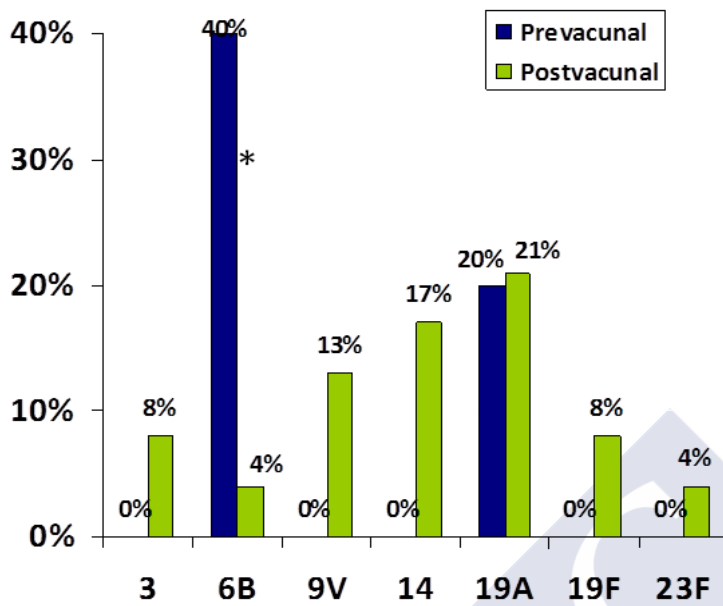


Figura 4A: Modificación de los serotipos más prevalentes en pacientes menores de 15 años en los periodos pre y postvacunal.

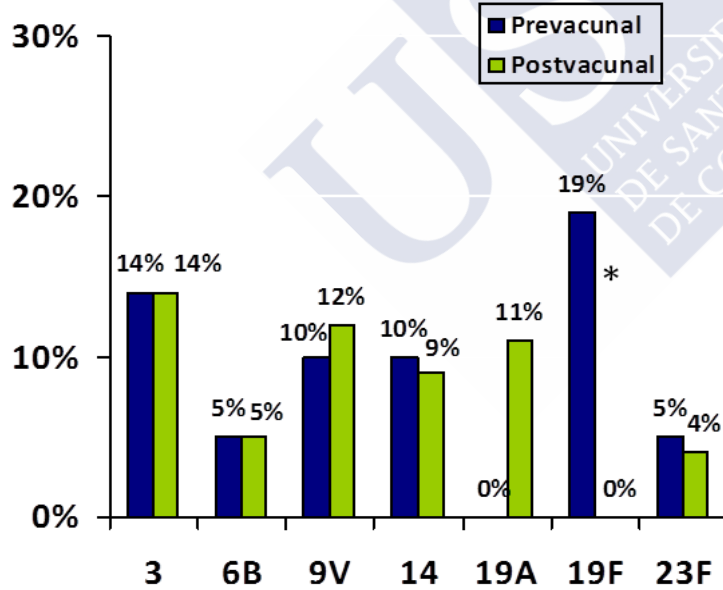


Figura 4B: Modificación de los serotipos más prevalentes en pacientes mayores de 15 años en los periodos pre y postvacunal.

*p < 0,05

4.6.1. Serotipos vacunales

De forma global no se detectó modificación en la prevalencia de SV-7 entre ambos periodos (43% en el periodo prevacunal y 39% en el postvacunal, $p = 0,703$), aunque sí se observó un descenso de los SV-7 en los pacientes mayores de 65 años (67% vs 25%, $p = 0,044$). Además, se observó un descenso significativo de los SV-7 aislados en pacientes con meningitis en el periodo postvacunal (83% vs 21%, $p = 0,018$). En ambos casos se detectó un descenso de las cepas no sensibles a PE (27% vs 16%, $p = 0,0321$ y 67% vs 14%, $p = 0,042$, respectivamente). Por otro lado, la cobertura vacunal de la VPC-13 en ambos periodos fue similar (69% en el prevacunal y 79% en el postvacunal, $p = 0,268$), y superior a la observada para la VPC-7. En la Tabla 15 se muestran las tasas de cobertura vacunal de la VPC-7 y VPC-13 en el periodo pre y postvacunal según los grupos de edad.

Tabla 15: Tasas de cobertura vacunal de VPC-7 y VPC-13 en función de la edad en el periodo pre y post-vacunal.

	Periodo prevacunal (n = 46)	Periodo postvacunal (n = 89)	p
VPC-7			
- Menores 5 años	60%	52%	1
- Entre 6-64 años	44%	37%	0,763
- Mayores de 65 años	67%	25%	0,044
VPC-13			
- Menores 5 años	80%	91%	0,459
- Entre 6-64 años	56%	73%	0,341
- Mayores de 65 años	89%	75%	0,642

NOTA: VPC vacuna polivalente conjugada.

4.6.2. Serotipos invasivos y no invasivos

Se identificaron 12 cepas pertenecientes a los serotipos invasivos (véase definición en apartado 3.9). La prevalencia de estos serotipos aumentó en el periodo postvacunal, aunque no se demostró diferencia estadísticamente significativa (7% vs 15%, $p = 0,262$). Nueve de estos pacientes (75%) tenían entre 6-64 años, 2 (17%) eran mayores de 65 años y 1 (8%) era menor de 5 años. La tasa de comorbilidades de los pacientes infectados por los serotipos invasivos fue significativamente inferior a los demás pacientes (índice de Charlson 0 [0-1] vs 1 [0-8], $p = 0,015$). En estos 12 pacientes la forma clínica de EISP fue la neumonía, complicada en 3 casos con empiema (25%). En un paciente se realizó el diagnóstico simultáneo de neumonía neumocócica y de meningitis. Tanto la tasa de ingreso en UCI (33% vs 35%, $p = 1$), como la mortalidad (8% vs 17%, $p = 0,688$) en los pacientes infectados por los serotipos invasivos fue similar a la de otros serotipos. La prevalencia de cepas no sensibles a PE (0% vs 36%, $p = 0,002$), no sensibles a EM (0% vs 26%, $p = 0,022$), así como las cepas multirresistentes (0% vs 15%, $p = 0,220$) entre los serotipos invasivos fue inferior a la de otros serotipos. En el análisis multivariante las variables asociadas con los serotipos invasivos fueron la edad inferior a 5 años (OR = 0,108, IC al 95% = 0,013-0,903) y el índice de Charlson (OR = 0,216, IC al 95% 0,055-0,847).

Se analizaron 41 cepas pertenecientes a los serotipos no invasivos (véase definición en apartado 3.9), observándose un descenso de los aislamientos de un 48% en el periodo prevacunal a un 26% en el postvacunal ($p = 0,016$). El 44% de estos serotipos se aislaron en pacientes entre 6-64 años, el 32% en pacientes mayores de 65 años y el 24% en menores de 5 años. En los pacientes infectados por estos serotipos no se identificó una mayor prevalencia de comorbilidades (índice de Charlson 0 [0-6] vs 0 [0-8], $p = 0,835$). Las manifestaciones clínicas de los pacientes infectados por estos serotipos fueron neumonía en 23 pacientes (61%), en 5 casos complicada con empiema (22%), 10 pacientes con meningitis (26%), 3 con bacteriemia primaria (8%) y 5 pacientes con otras

manifestaciones. Se observó una mayor tasa de ingreso en UCI en los pacientes infectados por los serotipos no invasivos (45% vs 29%, $p = 0,102$), hecho que se relacionó con un elevado porcentaje de pacientes diagnosticados de meningitis neumocócica entre los pacientes de UCI (57% vs 0%, $p < 0,001$). Sin embargo, no se encontró una mayor mortalidad en los pacientes infectados por estos serotipos (13% vs 17%, $p = 0,786$). Por otro lado, entre los serotipos no invasivos se detectó una elevada prevalencia de cepas multirresistentes (27% vs 7%, $p = 0,004$). Los serotipos más frecuentemente asociados con multirresistencia entre los serotipos no invasivos fueron el 19F (58%) y el 6B (25%).

En la Tabla 16 se comparan las características de los pacientes con infección por serotipos invasivos frente a los no invasivos. Los serotipos no invasivos afectaron a pacientes con mayor edad; así, la prevalencia de pacientes mayores de 65 años fue superior en el grupo de serotipos no invasivos (32% vs 18%, $p = 0,472$) y la de pacientes entre 6-64 años fue superior entre los serotipos invasivos (75% vs 44%, $p = 0,099$), aunque en ningún caso se alcanzó significación estadística. Se observó una mayor tasa de comorbilidades en los pacientes infectados por los serotipos no invasivos (índice Charlson 0 [0-1] vs 0 [0-6], $p = 0,037$), aunque no se encontró ninguna comorbilidad más frecuente en este grupo. En los serotipos invasivos se encontró una mayor prevalencia de neumonía (100% vs 72%, $p = 0,047$). No se detectaron diferencias en las otras formas clínicas de EISP, ni en la tasa de ingreso en UCI o de exitus. Finalmente, en los serotipo no invasivos se detectó una mayor prevalencia de cepas no sensibles a PE (39% vs 0%, $p = 0,003$) y EM (32% vs 0%, $p = 0,012$), así como de cepas multirresistentes (27% vs 0%, $p = 0,026$).

Tabla 16: Características de los pacientes con infección por serotipos invasivos frente a los serotipos no invasivos.

	Serotipos invasivos (n = 12)	Serotipos no invasivos (n= 41)	p
Edad (mediana, rango años)	50 (3-74)	40 (0,1-105)	0,975
- Menores de 5 años	1 (8%)	10 (24%)	0,421
- Entre 6-64 años	9 (75%)	18 (44%)	0,099
- Mayores de 65 años	2 (18%)	13 (32%)	0,472
Sexo hombre (n, %)	5 (42%)	21 (51%)	0,334
Tabaquismo	4 (33%)	10 (24%)	1
Consumo excesivo de alcohol	1 (8%)	3 (7%)	1
Comorbilidades			
- Broncoaspiración	0	1 (3%)	
- Trastorno neurológico	0	3 (7%)	1
- Insuficiencia cardíaca	1 (8)	2 (5%)	1
- Insuficiencia renal	0	1 (3%)	
- Asma	2 (17%)	1 (3%)	0,186
- EPOC	1 (8%)	3 (7%)	1
- Diabetes mellitus	0	2 (5%)	1
- Neoplasia	0	2 (5%)	1
- VIH	0	5 (16%)	0,319
- Hepatopatía	0	3 (9%)	1
- Índice de Charlson (mediana, rango)	0 (0-1)	0 (0-6)	0,037
Forma de presentación			
- Neumonía	12 (100%)	23 (72%)	0,047
- Meningitis	1 (8%)	4 (13%)	1
- Bacteriemia primaria	0	3 (9%)	1
- Empiema	3 (25%)	5 (16%)	0,670
Evolución			
- Ingreso en UCI	4 (33%)	12 (35%)	1
- Exitus	1 (8%)	4 (13%)	1
Resistencia a antibióticos			
- No sensible a PE	0	16 (39%)	0,003
- No sensible a CT	0	4 (10%)	0,574
- No sensible a EM	0	13 (32%)	0,012
- Multirresistente	0	11 (27%)	0,026

NOTA: serotipos invasivos (1, 5 y 7F), serotipos no invasivos (3, 6AyB, 8, 19F y 23F). CT cefotaxima, EM eritromicina, EPOC enfermedad pulmonar obstructiva crónica, PE penicilina, UCI unidad de cuidados intensivos, VIH virus de la inmunodeficiencia humana.

4.6.3. Serotipos pediátricos

Se aislaron 63 cepas pertenecientes a los serotipos pediátricos (véase definición en apartado 3.9). Estos serotipos fueron más frecuentes en los pacientes con menos de 5 años (35% vs 11%, $p = 0,006$) y se aislaron con menor frecuencia en pacientes entre 6-64 años (38% vs 60%, $p = 0,026$). No se observó diferencia en la prevalencia de estos serotipos frente a otros en los pacientes mayores de 65 años (29% vs 27%, $p = 0,839$). La tasa de comorbilidades y las formas de presentación clínica fueron similares a las observadas en los pacientes infectados por otros serotipos. Aunque la proporción de pacientes que precisaron ingreso en UCI (34% vs 35%, $p = 1$) fue similar a la de otros serotipos, los pacientes infectados por serotipos pediátricos presentaron una mortalidad inferior a la de los pacientes infectados por otros serotipos, aunque no se pudo demostrar diferencia estadísticamente significativa (10% vs 22%, $p = 0,121$). Se observó una mayor proporción de cepas no sensibles a PE (61% vs 5%, $P < 0,001$), a CT (11% vs 0%, $p = 0,013$), a EM (39% vs 8%, $p = 0,001$) y a CM (23% vs 7%, $p = 0,020$) en los aislamientos clasificados como serotipos pediátricos. Al mismo tiempo, la tasa de cepas multirresistentes fue superior en este grupo (24% vs 2%, $p = 0,001$). Los aislamientos multirresistentes pertenecían a los serotipos 19F (41%), 14 (18%), 6B (18%) y 19A (12%).

4.6.4. Serotipo 19A

En el periodo de tiempo estudiado se identificaron 12 cepas de *S. pneumoniae* pertenecientes al serotipo 19A (1 en el periodo prevacunal y 11 en el postvacunal). Las características de estos pacientes se muestran en la Tabla 17. En el análisis multivariante los factores asociados con infección invasiva por el serotipo 19A fueron la edad inferior a 5 años (OR = 4,173, IC al 95% = 1,141-15,259) y el consumo previo de antibióticos (OR = 6,798, IC al 95% = 1,546-29,891).

Tabla 17: Características de los pacientes infectados por el serotipo 19A.

Edad (mediana, rango años)	22 (0,5-88)
- Menores de 5 años	6 (50%)
- Entre 6-64 años	3 (25%)
- Mayores de 65 años	3 (25%)
Tratamiento antibiótico previo	4 (33%)
Índice de Charlson (mediana, rango)	0 (0-6)
Clínica	
- Neumonía	10 (84%)
- Meningitis	1 (8%)
- Bacteriemia primaria	1 (8%)
- Empiema	1 (8%)
Exitus	0
Sensibilidad a antimicrobianos	
- No sensible a PE	2 (17%)
- No sensible a CT	1 (8%)
- No sensible a EM	8 (67%)
- No sensible a CM	7 (58%)
- CMI a LE 1-2 µg/ml	2 (17%)
- Multirresistente	2 (17%)

NOTA: CM clindamicina, CT cefotaxima, EM eritromicina, LE levofloxacino, PE penicilina.

En estos aislamientos se observó una elevada tasa de cepas no sensibles a EM (67% vs 19%, $p < 0,001$) y a CM (58% vs 10%, $p < 0,001$), pero la tasa de cepas no sensibles a PE (17% vs 35%, $p = 0,334$) y CT (8% vs 5%, $p = 0,52$), así como los aislamientos multirresistentes (17% vs 13%, $p = 0,650$) fueron similares. Todas las cepas del serotipo 19A eran sensibles a LE y 2 presentaban una CMI a LE 1-2 µg/ml. Mediante BOX-A PCR se demostró que únicamente 2 aislamientos pertenecían al mismo tipo clonal (Figura 5, calles 12 y 13).

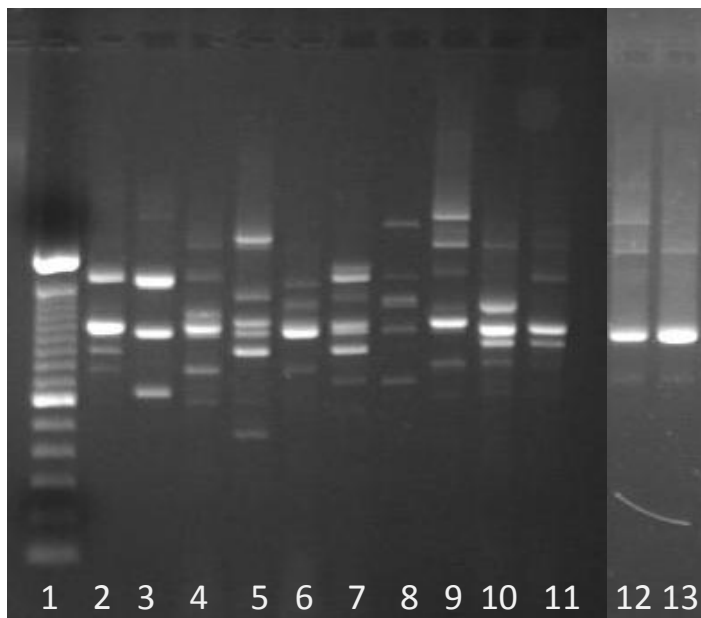


Figura 5: BOX A de los *S. pneumoniae* serotipo 19A.

Calle1: peso molecular; calles 2-13 cepas 192 y 193.

Los ST identificados mediante MLST se muestran en la Tabla 18. De los 12 aislamientos, 4 pertenecían al mismo perfil alélico (ST-193), aunque de éstos sólo 2 eran idénticos mediante BOX-A PCR. Se identificó un nuevo perfil alélico para *S. pneumoniae* (ST-8489). Esta cepa se aisló en una paciente de edad avanzada con múltiples comorbilidades que fue diagnosticada de neumonía. La cepa era sensible a PE, CT y LE y presentaba alto nivel de resistencia para EM y CM (fenotipo MLS_B, genotipo *ermB*).

Tabla 18: MLST de los *S. pneumoniae* serotipo 19A.

Perfil alélico	ST	ST Fundador	Grupo	Serotipos asociados	Sensibilidad a antimicrobianos
4,4,2,4,4,1,1	81	81	13	23F, 19A, 19F	[PE, CT] ^{no S} , [EM, CM] ^R
8,10,2,16,1,26,1	193	177	6	19A	S
10,8,30,35,6,1,9	1848	432	39	19A	S
8,10,2,16,1,26,1	193	177	6	19A	[EM, CM] ^R
2,19,2,17,6,22,14	276	230	11	19A	PE ^{no S} , [EM, CM] ^R
2,5,36,12,17,21,14	63	63	9	14, 19A, 19F, 15A	[EM, CM] ^R
8,13,4,4,6,4,14	2109	199	5	19A	S
8,10,2,16,1,26,1	193	177	6	19A	[EM, CM] ^R
8,10,2,16,1,26,1	193	177	6	19A	[EM, CM] ^R
8,13,14,4,6,4,14	876	199	5	19A, 14	EM ^R
1,5,1,12,17,3,8	1201	15	3	19A	S
8, 10, 9, 16, 1, 26, 1	8489	Singleton	Singleton	*	[EM, CM] ^R

*Nuevo perfil alélico. No serotipos asociados hasta el momento.

NOTA: CM clindamicina, CT cefotaxima, EM eritromicina, PE penicilina, R resistente, S sensible.

Con estos resultados se elaboró un árbol filogenético (Figura 6) de los diferentes ST identificados en la población y un modelo de evolución bacteriana donde se puede observar la proximidad genética con los ST fundadores y con los diferentes ST (Figura 7).

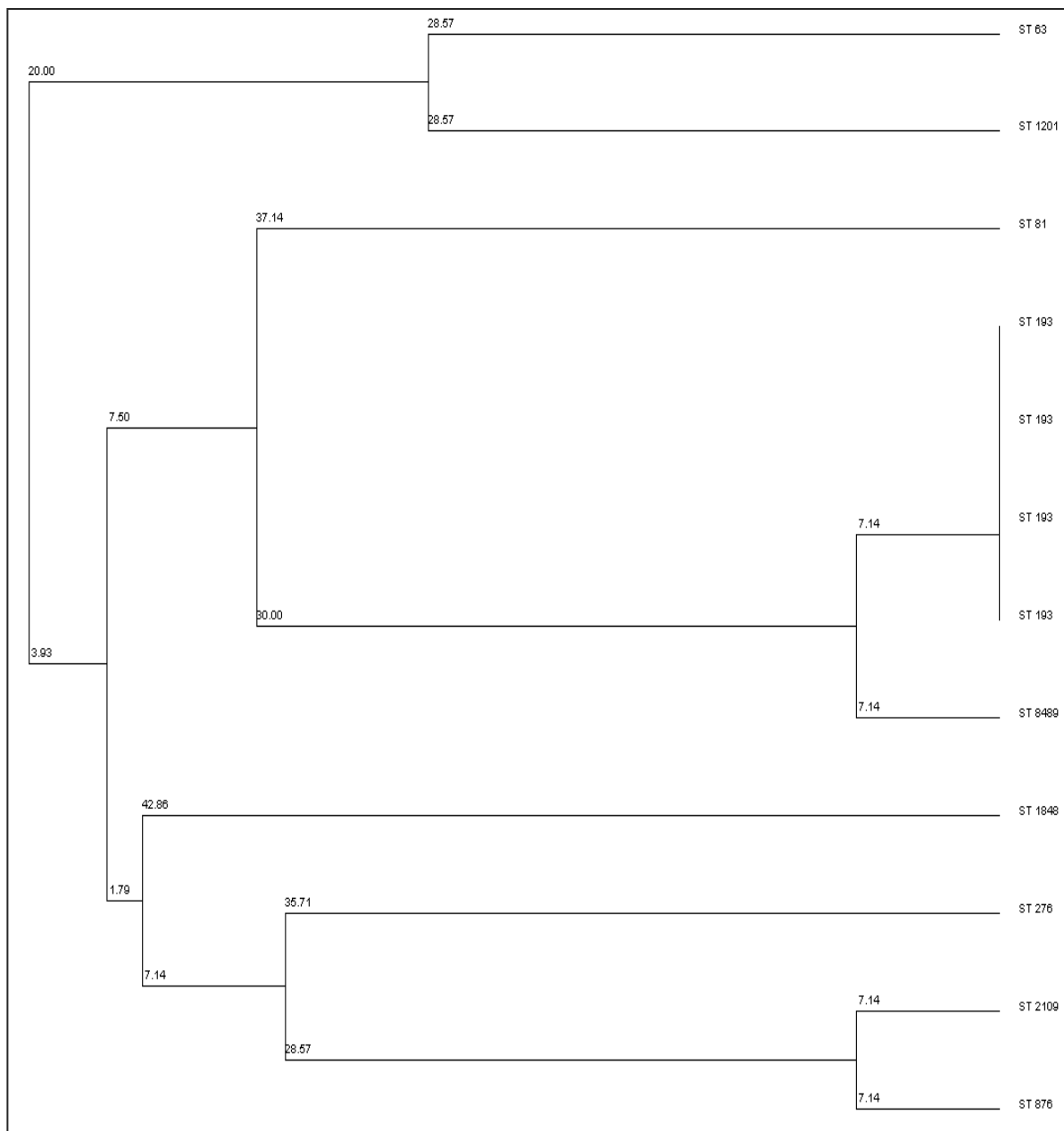


Figura 6: Árbol filogenético de los *S. pneumoniae* serotipo 19A.

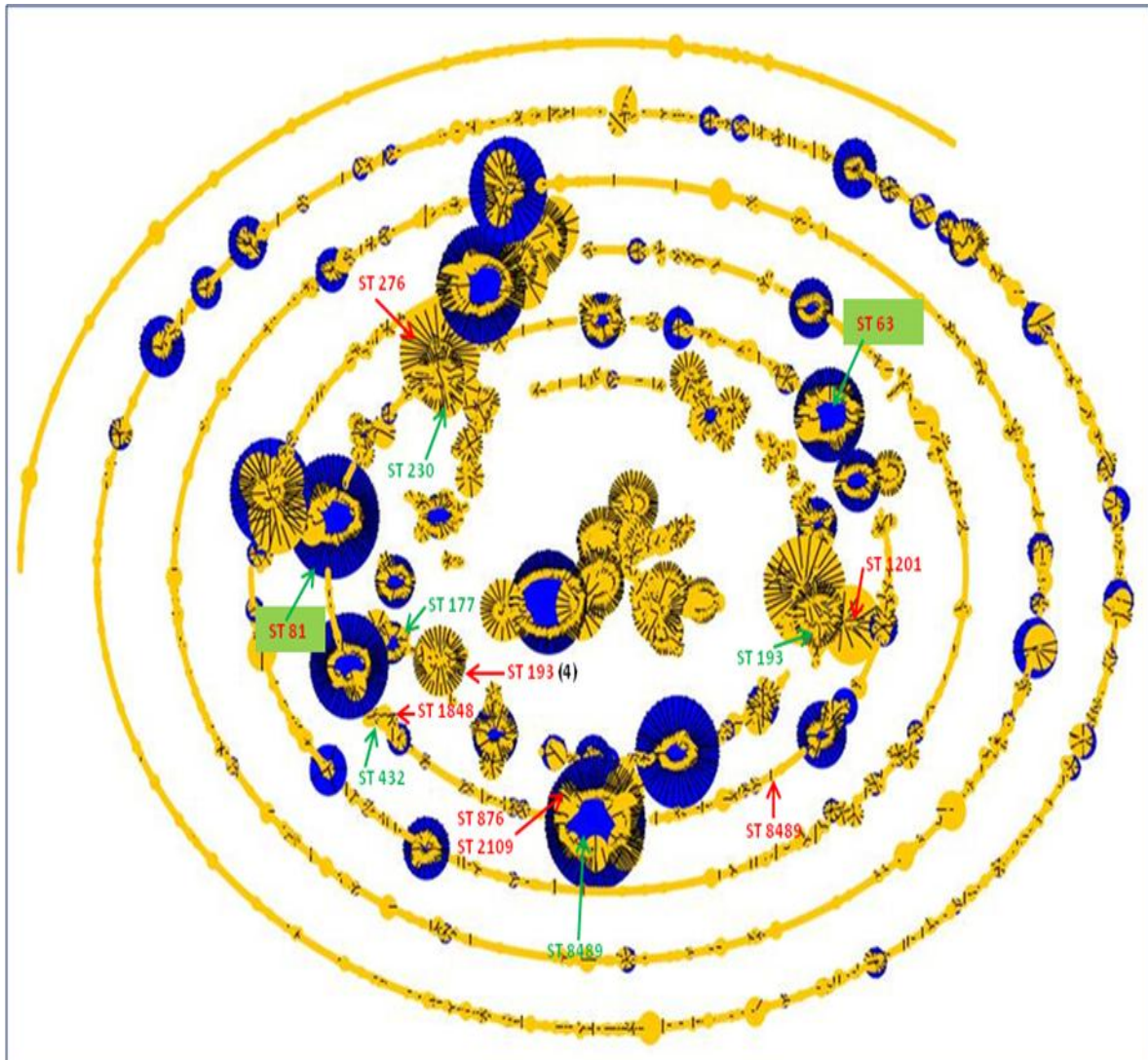


Figura 7: Relación de los *S. pneumoniae* del serotipo 19A con los diferentes ST identificados.
 NOTA: En color verde se resaltan los ST fundadores, en rojo los ST identificados en este trabajo y los incluidos en el recuadro verde el ST fundador coincide con el identificado en este trabajo.

4.7. VACUNACIÓN

En el periodo postvacunal, solamente 5 de los 33 niños menores de 5 años (15%) habían recibido al menos una dosis de VPC-7. Se determinó el serotipo en 3 de estos pacientes, identificándose en dos pacientes el serotipo 19A y en el otro el serotipo 38, ninguno de ellos incluidos en la VPC-7.

El Servicio Galego de Saúde (SERGAS) proporcionó los datos de la cobertura vacunal. Según estos datos, entre los nacidos en 2002 y los nacidos en 2005, la cobertura con 3 dosis de VPC-7 aumentó del 15% al 57%, y la cobertura con 4 dosis del 9 al 46% (233). Se encontró un aumento lineal del 36% al año ($R^2 = 0,95$) entre 2002 y 2010 de las dosis distribuidas en farmacia (DDF). Con estos datos se estimó una cobertura vacunal, con 3 dosis, en los niños nacidos en 2009 del 73% y con 4 dosis del 59% (233). Sin embargo, estos datos difieren de la información que, de forma oral, ha proporcionado el laboratorio distribuidor de la VPC-7 (Prevenar 7, Pfizer) para Galicia. Según los datos del laboratorio la tasa de niños nacidos entre 2005-2006 que recibieron 2 o más dosis de VPC-7 fue inferior al 50%.





DISCUSIÓN



La EISP continúa siendo en la actualidad una de las principales causas de muerte de origen infeccioso y la primera entre las enfermedades prevenibles (88, 96, 113, 234). Además, la mortalidad de la EISP es elevada a pesar del tratamiento antibiótico adecuado (104). El elevado número de serotipos de *S. pneumoniae* da lugar a diferentes formas de enfermedad, incluso con variantes geográficas específicas. Por otro lado, la gran variedad clonal de *S. pneumoniae* dificulta considerablemente el establecimiento de estrategias de prevención eficaces y duraderas. Por este motivo es importante conocer las características de la EISP en cada región, para identificar los serotipos más prevalentes y, de esta forma, poder implantar las medidas preventivas más adecuadas en cada momento. Además, el estudio del perfil de resistencia de este microorganismo en cada área sanitaria es fundamental para establecer las pautas de tratamiento empírico más adecuadas en función de los patrones de resistencia antimicrobiana.

5.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

Uno de los principales factores de riesgo para EISP son las edades extremas de la vida, así el mayor porcentaje de casos se concentra en los pacientes menores de 5 años y entre los mayores de 65 años (141, 157, 235). En este trabajo aproximadamente el 50% de los pacientes pertenecían a uno de estos dos grupos de edad, destacando que en el grupo de menores de 5 años, el 66% eran menores de 2 años. Este resultado está en la línea de otros trabajos, en los que los pacientes menores de 2 años presentaban las cifras más elevadas de incidencia de EISP (81, 82, 87, 157). Por otro lado, en diferentes estudios, al igual que en este, se ha constatado una mayor prevalencia de enfermedad neumocócica en varones (141, 157, 160, 235, 236), tanto niños, como adultos, no pudiéndose identificar las causas de este hecho. En la población adulta de nuestro estudio (mayores de 18 años) la edad media fue de $58 \pm 19,9$ años, similar a la encontrada en el trabajo de Gutiérrez et

al (157), aunque ligeramente inferior a la de otras series, en las que la edad de los pacientes adultos era superior a los 60 años (140, 147, 156).

Más de la mitad de los pacientes del estudio (61%) presentaba una o más comorbilidades, como hepatopatía crónica, patología pulmonar, ICC, inmunodepresión... también identificadas en otros trabajos (139, 140, 142). No obstante, la tasa de comorbilidades en pacientes con EISP es muy variable dependiendo de la población a estudio, variando entre un 38% (141, 157) y un 80-90% (139, 156). En general, los estudios con elevadas tasas de comorbilidades están realizados en población anciana y con pluripatología (139, 156). Por otro lado, en los estudios poblacionales revisados (141, 157) la tasa de comorbilidades era inferior a la encontrada en nuestra población (38% vs 61%). En nuestro caso se ha realizado una revisión exhaustiva de las diferentes comorbilidades que presentaban los pacientes, lo que podría explicar la mayor tasa de comorbilidades encontrada en este trabajo. Debemos destacar que el tabaquismo y el consumo excesivo de alcohol son dos factores relacionados con EISP tanto en nuestra serie como en otras (139).

La EPOC es una de las comorbilidades más frecuentemente identificadas en los pacientes de este estudio. Aunque la EPOC se considera un factor de riesgo para EISP, la evolución, gravedad y mortalidad de estos pacientes es similar a la de otros grupos de pacientes (237-240). En nuestro estudio, los pacientes EPOC presentaban una edad superior al resto de la población adulta, así como una mayor tasa de comorbilidades. Sin embargo no se demostró diferencia en el porcentaje de pacientes que precisaron ingreso en UCI e IOT. Otros estudios han encontrado una tasa de ingreso en UCI y de IOT inferior en pacientes EPOC, esto podría estar relacionado con una mayor dificultad para utilizar técnicas agresivas (IOT) en estos pacientes debido a su patología pulmonar de base y por sus comorbilidades asociadas (237).

Como se ha puesto de manifiesto en otros estudios (224), se encontró asociación entre las cepas no sensibles a PE y la EPOC (OR = 12,613, IC al 95% = 2,069-76,882), aunque no se observó relación entre estos pacientes y la tasa de cepas no sensibles a EM o LE, ni con las cepas multirresistentes. En los pacientes con EPOC la tasa de resistencia a antimicrobianos suele ser superior a la de la población general. Esto se ha relacionado con la frecuente prescripción antibióticos para el manejo de las exacerbaciones infecciosas que presentan estos pacientes (224). Así, la EPOC es uno de los factores de riesgo asociados con la resistencia a LE (241). De hecho, varios de los casos publicados de fracaso terapéutico con fluoroquinolonas eran pacientes con EPOC (204, 222, 242, 243). Algunos autores han sugerido que estos pacientes podrían constituir uno de los reservorios de cepas resistentes a fluoroquinolonas (241).

Los pacientes infectados por el VIH son otro de los grupos de riesgo para la EISP, siendo el porcentaje encontrado en este trabajo similar al de otros estudios (11%) (140). Existen múltiples factores que pueden contribuir a este riesgo elevado de EISP en los pacientes infectados por el VIH, como sexo femenino, edad superior a 60 años, determinadas razas, bajo nivel de educación, ADVP, tabaquismo, nadir de CD4 <200/cc, carga viral elevada en el momento de la vacunación, EPOC, hepatitis C (244-246).

Hasta la introducción de la VPP-23 la incidencia de EISP en los pacientes VIH positivos era muy elevada (342 casos por 100.000 personas/año), lográndose disminuir la incidencia en los pacientes vacunados a 187 casos por 100.000 personas/año (245). Al igual que en pacientes no VIH, la vacunación con VPP-23 se ha asociado con un mejor pronóstico de la EISP, una menor tasa de ingreso en UCI, una menor mortalidad, una menor estancia hospitalaria, así como con una menor tasa de empiema (244). Sin embargo, la eficacia de la VPP-23 en pacientes inmunodeprimidos, como son los pacientes infectados por el VIH, es subóptima (88, 101). Por este motivo desde septiembre

de 2012 se ha aprobado la utilización de la VPC-13 en determinados grupos de riesgo, entre los que se encuentran los pacientes VIH positivos (247).

Por otro lado, la TARGA ha originado una disminución de las infecciones oportunistas en estos pacientes, a pesar de esto la incidencia de EISP en pacientes VIH ha aumentado en los últimos años de un 24,1 a 84,4 por 100.000 pacientes/año (246). Esto podría deberse por un lado a un aumento de la supervivencia de los pacientes infectados por el VIH y por otro, a las múltiples comorbilidades que suelen presentar estos pacientes. Finalmente, algunos autores han sugerido una mayor mortalidad de los pacientes VIH positivos con EISP (246). En este trabajo se ha observado una mortalidad inferior a la de los pacientes no infectados por el VIH, así como un bajo porcentaje de pacientes que precisaron ingreso en UCI.

5.2. FORMAS DE PRESENTACIÓN CLÍNICA

Como ya se ha comentado anteriormente, la EISP es la forma más grave de infección causada por *S. pneumoniae*, con múltiples formas de presentación clínica, siendo la neumonía, la bacteriemia primaria y la meningitis las más habituales. Tras la comercialización de la VPC-7 algunos autores han observado modificaciones, no sólo de la incidencia de la EISP, sino también en la prevalencia de las diferentes formas clínicas de EISP (87, 104, 248). Sin embargo, en el presente trabajo tras la introducción de la VPC-7 no se han observado variaciones en las diferentes formas de manifestarse la EISP. Esto podría estar relacionado con la ausencia de modificaciones significativas en los serotipos responsables de EISP.

5.2.1. Neumonía

La neumonía es, sin duda alguna, la forma clínica más frecuente de la enfermedad neumocócica invasiva (144, 156-158, 160, 249), no solo en la población general, sino también en pacientes infectados por el VIH (244, 246), así como en los casos de EISP recurrente (250). Sin embargo, la prevalencia de neumonía neumocócica bacteriémica varía en función de los grupos de edad. Así, en pacientes menores de 5 años, aunque la neumonía es la forma clínica de EISP más frecuente, el porcentaje de casos es inferior al de otros grupos de edad (159, 160). Este hallazgo coincide con lo observado en nuestra población, en la que la prevalencia de neumonía en menores de 5 años fue del 51% y en el resto de grupos de edad del 79% ($p = 0,001$).

Dentro de la neumonía neumocócica la presencia de bacteriemia, es decir de enfermedad invasiva, se ha asociado con una mayor mortalidad y con una estancia hospitalaria más prolongada (139, 147). Por este motivo se han intentado desarrollar escalas con diferentes factores asociados con un mayor riesgo de bacteriemia (148). Así, Marrie et al identificaron como factores de riesgo para bacteriemia la edad avanzada, la neumonía extensa, la sepsis grave y una elevada tasa de comorbilidades. Sin embargo, en el análisis multivariante no se demostró asociación estadística entre ninguna de estas variables y la bacteriemia (148). Otros trabajos han identificado otros factores que también podrían aumentar el riesgo de bacteriemia, como el consumo excesivo de alcohol (139), o bien, disminuirlo, como la EPOC (139).

Los factores asociados con neumonía fueron similares a los publicados en otros trabajos en los que también se observó una elevada prevalencia de pacientes con hepatopatía, inmunodepresión, patología pulmonar, así como una elevada tasa de comorbilidades (237). En nuestro trabajo el 77% de los pacientes presentaba al menos una comorbilidad, tasa similar a la observada en otros estudios, en los que la tasa de comorbilidades varió entre un 60-84% (139, 236). En el periodo postvacunal se observó un incremento de pacientes con insuficiencia cardíaca

congestiva. Esto podría estar relacionado con un aumento de la edad de los pacientes en dicho periodo; aunque la edad media no se modificó, sí se observó un aumento de pacientes mayores de 65 años (25% vs 32%, $p = 0,443$).

Tras la comercialización de la VPC-7 los serotipos que con más frecuencia se aíslan en pacientes diagnosticados de neumonía son el 1, 3, 5, 7F y 19A (157, 251). En nuestra población se observó también una elevada prevalencia de los serotipos 3 y 19A y de dos serotipos incluidos en la VPC-7, el 9V y 14. Tanto en el periodo prevacunal como en el postvacunal, los SV-7 fueron los predominantes en los pacientes diagnosticados de neumonía. No obstante, se observó un descenso de los SV-7 en los pacientes menores de 5 años, así como en los mayores de 65 años. En otros trabajos realizados en el periodo postvacunal la prevalencia de los SV-7 fue muy inferior a la observada en nuestra población (87, 249). Esto podría estar en relación con un bajo porcentaje de SV-7 en el periodo prevacunal en los casos de neumonía neumocócica (53%), por lo que el efecto de la VPC-7 podría haber sido menor al esperado. De hecho, algunos autores han sugerido que para observar un reemplazamiento de serotipos tras la introducción de la VPC-7 era preciso que en el periodo prevacunal los SV-7 fueran responsables de más del 80% de los casos de EISP (107).

Por último, cabe destacar que en el periodo postvacunal se observó un descenso estadísticamente significativo de los serotipos no invasivos en los pacientes diagnosticados de neumonía neumocócica. Sin embargo, no se ha encontrado ningún trabajo que analice la variación de los serotipos no invasivos en los pacientes con esta forma clínica de EISP.

5.2.2. Bacteriemia primaria

En la mayoría de las series, la bacteriemia primaria es la segunda o tercera forma más frecuente de EISP (144, 156-158). Sin embargo, en algunos trabajos realizados antes de la comercialización de la VPC-7 la bacteriemia primaria era la manifestación más frecuente, especialmente en población menor de 18 años (141, 159, 160). En este trabajo se observó una prevalencia superior de bacteriemia primaria en los pacientes menores de 5 años y en aquellos mayores de 65 años, acumulando estos dos grupos de edad hasta el 70% de los casos.

Al analizar las características de los pacientes con bacteriemia primaria se observó una menor tasa de comorbilidades con respecto a otras formas clínicas de EISP, aunque la diferencia no alcanzó significación estadística (índice de Charlson 1 [0-3] vs 1 [0-8], $p = 0,480$). Este hallazgo discrepa del único estudio encontrado que analiza los factores asociados con la bacteriemia primaria, destacando, además de la hepatopatía crónica enólica, una elevada tasa de comorbilidades (156). Este trabajo fue realizado en un hospital de veteranos en Estados Unidos, por lo que puede haber un sesgo de selección de pacientes. En nuestro trabajo el único factor asociado con un aumento de riesgo de bacteriemia primaria fue la hepatopatía.

Un hallazgo destacable en nuestro trabajo es la alta tasa de mortalidad asociada con la bacteriemia primaria, superior a la mortalidad observada en los pacientes con meningitis (35% vs 10%, $p = 0,076$). Otros estudios también han encontrado una mortalidad elevada en pacientes con bacteriemia primaria, similar a la mortalidad asociada con la meningitis (96) y 3 veces superior a la de otras formas de EISP (156, 157). En los pacientes que fallecieron se observó una edad más avanzada, así como una mayor tasa de comorbilidades. Ambos hechos se han relacionado en múltiples trabajos con un peor pronóstico de la EISP (96, 138, 141, 142). De todas formas, teniendo en cuenta la elevada mortalidad de los pacientes con bacteriemia primaria, se deberían optimizar las medidas terapéuticas y de vigilancia, para intentar mejorar el pronóstico de estos pacientes.

Diferentes estudios coinciden en que los serotipos más frecuentemente identificados en los pacientes diagnosticados de bacteriemia primaria y meningitis son similares, constituyendo lo que se conoce como serotipos invasivos (96, 144, 157). Sin embargo, en esta serie, así como en un reciente trabajo realizado en España (157), los casos de bacteriemia primaria en los que se aíslan estos serotipos son infrecuentes.

5.2.3. Meningitis

La meningitis es considerada la forma más grave de EISP (142), con una elevada tasa de morbilidad y mortalidad. Por un lado, la mayoría de los pacientes con esta forma clínica precisan ingreso en UCI (144), hecho también encontrado en nuestra serie, en la que el 90% de los pacientes con meningitis ingresaron en UCI. Por otro, la mortalidad en el mundo desarrollado y con un tratamiento antibiótico adecuado es muy elevada, oscilando entre un 6,7% en niños (144) y un 22,3% en adultos (144, 159, 172). En este trabajo fallecieron dos pacientes (10%), ambos mayores de 65 años. Debido al bajo número de fallecidos en este trabajo no se pudo realizar un análisis de factores relacionados con la mortalidad.

Al igual que otras formas clínicas de EISP, la meningitis neumocócica afecta con mayor frecuencia a los pacientes en edades extremas de la vida (172). El análisis de la incidencia de la meningitis neumocócica tras la introducción de la VPC-7 arroja unos resultados contradictorios. Así, algunos trabajos (158, 249), incluso este, no han encontrado modificación de la incidencia o prevalencia de esta forma clínica de infección neumocócica. Sin embargo, otros autores demostraron un descenso en la incidencia de meningitis (104, 106, 110, 172, 252), mientras que en otros estudios la incidencia de meningitis aumentó tras la comercialización de la VPC-7 (95, 117).

Estos hechos se han relacionado con la modificación de los serotipos circulantes (117), así como con la lenta implantación de la VPC-7 (95).

Un hallazgo significativo de este trabajo es el descenso de los SV-7 en los pacientes con meningitis tras la introducción de la VPC-7 (83% vs 21%, $p = 0,018$). Se analizó así mismo la prevalencia de los serotipos incluidos en la VPC-13 observándose una excelente cobertura de los serotipos aislados en pacientes con meningitis (79%), lo que hace suponer una gran eficacia de esta vacuna para disminuir la incidencia de esta forma grave de EISP. El descenso de los SV-7 se acompañó, al igual que en otros estudios, de un descenso de las cepas no sensibles a PE (172). Sin embargo, no se observó modificación de la prevalencia de cepas multirresistentes entre ambos periodos. Por otro lado, en el periodo postvacunal no se identificó ninguna cepa no sensible a CT, por lo que las cefalosporinas de tercera generación continúan siendo un tratamiento empírico adecuado en los pacientes con meningitis neumocócica de nuestra población.

Aunque los serotipos invasivos que se han asociado con la meningitis neumocócica y los no invasivos con otras formas de manifestación clínica (253), varios trabajos, al igual que el nuestro, encontraron una baja prevalencia de serotipos invasivos en los pacientes con meningitis neumocócica (96, 157, 172) y una elevada prevalencia de serotipos no invasivos (172). Otro hallazgo destacable en este trabajo ha sido la elevada proporción de serotipos pediátricos en los pacientes diagnosticados de meningitis neumocócica (60%). Este hecho no ha sido publicado previamente y desconocemos los factores que han podido condicionar la elevada prevalencia de este grupo de serotipos.

5.2.4. Empiema

La tasa de empiema en nuestro estudio ha sido baja (6%), similar a la observada en otros trabajos (2-12%) (140, 147, 157, 236). Al igual que en este estudio, algunos autores han encontrado una prevalencia mayor de empiema en la población infantil (158, 171, 235). Tras la introducción de la VPC-7 varios autores han encontrado un aumento de la incidencia de empiema (248, 249, 252, 254), por el contrario en este trabajo, no se ha observado modificación en la prevalencia. Los factores que se han relacionado con el aumento de incidencia del empiema son múltiples, destacando entre ellos los cambios en los serotipos circulantes, con un aumento significativo de SNV-7 (254) y de los serotipos pediátricos (171), así como, con la aparición de cepas resistentes (171). Sin embargo, para algunos autores el incremento de la incidencia de empiema se habría producido antes de la introducción de la vacuna y este cambio podría formar parte de las variaciones cíclicas de esta forma de EISP (252, 254).

El empiema es considerado una de las formas graves de EISP (142), por la elevada tasa de ingreso en UCI (20%) y por la mortalidad hospitalaria asociada, que en algunas series alcanza el 12% (142, 236). En este trabajo, también se observó un elevado porcentaje de pacientes que precisaron ingreso en UCI (45%), sin embargo no falleció ningún paciente.

Los serotipos más frecuentemente aislados en los pacientes con empiema tras la comercialización de la VPC-7 son el 1, 3, 7F y 19A (171, 236, 251, 252). De estos serotipos los que acumulan hasta el 50% de los casos de empiema son los serotipos 1 y 3 (236, 254), que también han sido los que más frecuentemente se han identificado en este trabajo. Al igual que Lujan et al en los pacientes con empiema se observó una mayor prevalencia de serotipos invasivos (138).

5.3. EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES CON EISP

Se observó un incremento del número de pacientes en los que el tratamiento se realizó de forma ambulatoria entre los periodos pre y postvacunal (4% vs 14%, $p = 0,054$). Este aumento se produjo de forma estadísticamente significativa en el grupo de adultos jóvenes (entre 14 y 25 años), sin comorbilidades, con el diagnóstico de neumonía. Las nuevas fluoroquinolonas (levofloxacino y moxifloxacino) permiten realizar un tratamiento oral, seguro y muy activo frente a los microorganismos que habitualmente causan las neumonías comunitarias, con una cobertura adecuada tanto para los microorganismos típicos, como para los atípicos (140, 145). La introducción de estos antimicrobianos al final de la década de 1990-2000 podría haber colaborado con el incremento de pacientes con neumonía que fueron tratados ambulatoriamente. En nuestro trabajo sólo fue posible identificar el antibiótico prescrito en 4 pacientes (18%) que fueron tratados en régimen ambulatorio, de éstos 3 recibieron una fluoroquinolona. El bajo número de casos analizados no permite extraer una conclusión a cerca del uso de estos antimicrobianos en nuestra población.

El hecho de que los pacientes fueran tratados ambulatoriamente no significó un incremento en la tasa de reingresos. Así, en el periodo postvacunal la tasa de reingreso fue cero. Otros trabajos también han encontrado una tasa baja de reingreso (en torno al 8%) en estos pacientes (148). Todo esto apoya la utilización de los nuevos antibióticos para el manejo de la neumonía comunitaria, ya que han mostrado ser fármacos eficaces y seguros. No hemos encontrado series publicadas que analicen el régimen de tratamiento (ambulatorio-hospitalario) y el ingreso de los pacientes diagnosticados de EISP, antes y después de la introducción de la VPC-7.

5.3.1. Ingreso en UCI

Un elevado porcentaje de pacientes con EISP precisan ingreso en unidades de críticos, especialmente los que presentan determinadas formas graves, como meningitis o empiema (142, 144, 236), hecho también observado en este trabajo. Varios autores han analizado la influencia de la VPC-7 en la tasa de ingresos en UCI, encontrando resultados contrapuestos. Así, algunos autores, al igual que nosotros, no encontraron modificación en el porcentaje de pacientes que precisaron ingreso en UCI entre ambos periodos (248), otros detectaron una disminución únicamente en pacientes mayores de 2 años (248), mientras que otros demostraron un aumento de las formas graves de EISP que precisaron ingreso en UCI (117, 158). Este aumento de formas graves de EISP se ha relacionado con múltiples factores, como el incremento de serotipos no invasivos que, al afectar a pacientes más debilitados, dan lugar a formas más graves de infección (138). Otros factores que también se han asociado con este aumento de formas graves ha sido el incremento de los serotipos invasivos (96), o la diseminación de determinados serotipos resistentes a antimicrobianos (255).

Por otro lado, la tasa de ingreso en UCI varía en función de la edad de los pacientes objeto de estudio, incrementándose con la edad. Así, la tasa de ingreso en UCI en población pediátrica es del 11-22% (87, 160, 249) y en población adulta (mayores de 18 años) del 37% (160). En el presente trabajo los resultados son inversos a los encontrados en la literatura, con una mayor tasa de ingreso en UCI en la población infantil (29% en menores de 5 años, frente al 19% en mayores de 65 años), aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,478$). Sin embargo, tanto la mortalidad (5% vs 30%, $p < 0,001$), como la tasa de IOT (2% vs 12%, $p = 0,035$) de los pacientes menores de 5 años fue significativamente inferior a la de los adultos. Esto podría deberse a las implicaciones médicas y sociales que rodean a un proceso séptico en los pacientes pediátricos, dando lugar a una mayor tasa de ingreso en UCI para una vigilancia intensiva, aunque, como se

deduce de la tasa de IOT y de la mortalidad, los cuadros clínicos no sean en sí más graves que en los adultos.

5.3.2. Mortalidad

Tras la introducción de la VPC-7 se ha observado un descenso en la mortalidad por la EISP (103). Ésta varía considerablemente en función de las características de la población objeto de estudio, de la forma clínica de EISP y posiblemente, de la virulencia de *S. pneumoniae*. Dentro de los factores relacionados con la población, los factores más determinantes de la mortalidad son la edad (96, 157, 160, 256), así como con las comorbilidades (142, 157). En esta línea, en este trabajo se observó una mortalidad significativamente superior en los pacientes mayores de 65 años y en aquellos con un índice de Charlson elevado. Diferentes patologías se han relacionado con un aumento de mortalidad en pacientes con EISP, como la inmunodepresión, la enfermedad cardiovascular (insuficiencia cardíaca) o el consumo excesivo de alcohol (96, 142, 160, 237). En este trabajo, no se ha podido establecer una relación con ninguna de estas patologías.

Las formas de presentación clínica con mayor mortalidad son la meningitis y la bacteriemia primaria (96, 142, 144, 157). En el presente trabajo se ha encontrado asociación estadística entre la mortalidad y la bacteriemia primaria, pero no con la meningitis. Esto podría estar relacionado con el bajo número de casos meningitis. En este trabajo, aunque los pacientes con bacteriemia primaria que fallecieron presentaban otros factores de riesgo, como edad más elevada o mayor tasa de comorbilidades. En el estudio multivariante se observó que la bacteriemia primaria en sí misma constituía un factor de riesgo de mortalidad (OR = 5,164, IC al 95% = 1,801-14,806). Por otro lado la mortalidad atribuida a la neumonía neumocócica es muy variable según las series, entre 1-11% (138, 140, 141, 144, 237). Algunos autores han encontrado que la neumonía constituye un factor

protector para la mortalidad al compararla con otras formas clínicas de EISP, como la meningitis o la bacteriemia primaria (157). Por otro lado, la gravedad del cuadro séptico también es un factor determinante en el pronóstico de los pacientes con EISP, así el shock séptico o la necesidad de IOT se asocian con un incremento de la misma (237), como también se ha observado en los pacientes de esta serie.

Finalmente, las características del microorganismo pueden influir en la mortalidad. Así, tanto las cepas no sensibles a PE, como las resistentes a múltiples antibióticos se han asociado con un incremento de la mortalidad (138, 142, 255). Al igual que en este trabajo, otros autores no han encontrado asociación entre la mortalidad y la disminución de la sensibilidad a PE (257, 258). Por otro lado, varios autores han analizado la relación entre el serotipo y la mortalidad encontrando resultados contradictorios. Algunos han asociado el incremento de la mortalidad con la extensión de los serotipos invasivos, al ser responsables de las formas graves de EISP (meningitis, bacteriemia primaria) (96). En cambio, otros estudios han asociado la mortalidad con los serotipos no invasivos, ya que afectan a pacientes de más edad con pluripatología (138). Los serotipos pediátricos también se han asociado con una mayor mortalidad, especialmente en pacientes adultos (142). En este trabajo no se ha podido establecer ninguna relación entre mortalidad y los diferentes grupos de serotipos.

5.3.3. EISP recurrente

La tasa de recurrencia de EISP está en torno al 3% (250), superior a la encontrada en este trabajo (1%). Entre los factores que se han relacionado con la EISP recurrente se encuentra la infección por el VIH, con una tasa de recurrencia 2-3 veces superior a la población general, pudiendo llegar hasta el 8% (244). De hecho, la neumonía neumocócica recurrente es uno de los criterios

clínicos para el diagnóstico de SIDA (259). Otros factores de riesgo para la EISP recurrente son las neoplasias sólidas y hematológicas (especialmente el mieloma múltiple), el consumo excesivo de alcohol o la esplenectomía (250).

Para disminuir la recurrencia de EISP en pacientes adultos pertenecientes a los grupos de riesgo, desde los años 80 se ha utilizado la VPP-23, aunque su eficacia para prevenir la EISP es controvertida (88, 94). Tras la introducción de la VPP-23 ha disminuido la gravedad y la mortalidad de la EISP en determinados grupos de pacientes, como en aquellos infectados por el VIH (244, 247). Sin embargo, varios trabajos han demostrado una baja eficacia de este tipo de vacuna en pacientes VIH positivos y en aquellos con diversas comorbilidades (244, 260). Por todo esto, en los últimos años se ha estudiado la utilidad de la VPC en determinados grupos de riesgo de población adulta observándose una mayor efectividad (101, 102, 261, 262). Así, desde septiembre de 2012 se ha aprobado la utilización de la VPC-13 en pacientes mayores de 50 años con determinadas patologías (neoplasias hematológicas, insuficiencia renal, síndrome nefrótico, trasplante de órgano sólido o de células hematopoyéticas, tratamiento quimioterápico o inmunosupresor, infección por VIH). También la combinación de la VPC y la VPP, cuando se administra en primer lugar la VPC, genera una respuesta inmunológica más potente que cuando se administran en orden inverso o individualmente (102, 263, 264). Sin embargo hasta el momento no se ha podido comprobar la repercusión clínica de este hallazgo.

5.4. SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS Y TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO

En nuestra población, tras la comercialización de la VPC-7 no se encontró modificación de la prevalencia de cepas resistentes o no sensibles a los antimicrobianos estudiados (véase definición en apartado 3.4). Este hallazgo concuerda con la ausencia de modificación de los serotipos entre ambos periodos, como se comentará en el apartado 5.5. Los resultados en esta materia son divergentes, ya que otros autores han demostrado disminución de la tasa de resistencia a los antimicrobianos (81, 99, 116, 117, 134, 158, 172), en tanto que en otros estudios se observó un incremento de las cepas no sensibles, debido al aumento de algunos SNV-7 (85, 265).

Aunque un 27% de las cepas eran no sensibles a PE, el porcentaje de aislamientos resistentes a PE, teniendo en cuenta el tipo de infección (meníngea, no meníngea), fue bajo (6%). Si únicamente se tuvieron en cuenta los aislamientos con CMI a PE $\geq 2\mu\text{g/ml}$ esta prevalencia sería del 3%. En los estudios más recientes en España, la tasa de cepas no sensibles a PE oscila entre un 2,5-24% (85, 117, 144, 235, 249). En nuestra comunidad autónoma disponemos de los datos de Pardo Sánchez et al que analizaron en 2007 la sensibilidad de *S. pneumoniae* a diferentes antibióticos encontrando una tasa de cepas no sensibles a PE del 18% (86). Como datos de referencia más recientes, está el trabajo post-comercialización de la VPC-13, realizado entre 2011-2012, en el que la tasa de cepas no sensibles a PE era del 21%, no identificándose cepas con CMI a PE $\geq 2\mu\text{g/ml}$ (251). Al igual que en trabajos previos, los SV-7 (85, 99), así como los serotipo pediátricos (142) se asociaron con los aislamientos de *S. pneumoniae* no sensibles a PE. Algunos autores han observado un aumento de resistencia a PE tras la introducción de la VPC-7 por expansión de determinados SNV-7, como el 19A (114, 124).

Al igual que en otros trabajos (238), los pacientes con EPOC presentaron un mayor riesgo de infección por cepas no sensibles a PE. Este hecho se ha relacionado con diferentes factores, como un mayor porcentaje de cepas aisladas en muestras respiratorias, así como con un elevado consumo de

antibióticos en este grupo de pacientes debido a las frecuentes reagudizaciones (239). Otros autores, por el contrario, no han encontrado diferencias en cuanto a la tasa de resistencias entre pacientes con y sin EPOC (237). En este trabajo, todas las muestras procedían de infección invasiva, por lo que la menor sensibilidad a PE no se puede relacionar con el análisis de muestras de origen respiratorio. Por este motivo, pensamos que en los pacientes EPOC el uso frecuente de antibióticos para el control de las exacerbaciones respiratorias puede contribuir a la disminución de la sensibilidad a determinados antimicrobianos.

La tasa de cepas resistentes o no sensibles a CT fue muy baja (0% y 4%, respectivamente), al igual que en otras series españolas (86, 249, 251). De hecho, los betalactámicos, bien en monoterapia o en combinación, son el tratamiento antibiótico más comúnmente utilizado en el tratamiento de EISP, especialmente de las formas graves como la meningitis (138, 148, 156). En este trabajo, aproximadamente el 50% de los pacientes fueron tratados con betalactámicos, siendo estos los antimicrobianos más frecuentemente utilizados en los tratamientos combinados (79%).

En la actualidad son múltiples los estudios que han mostrado un mejor pronóstico en aquellos pacientes con EISP que recibieron tratamiento antibiótico combinado. Así, tanto en pacientes con neumonía neumocócica (266-268), como en aquellos con neumonía adquirida en la comunidad (269-271), la combinación de betalactámicos con macrólidos ha sido superior a la monoterapia con betalactámicos, observándose un mayor beneficio en los pacientes más graves (272, 273). Existen varias teorías que han intentado explicar la superioridad de la combinación de estos dos antimicrobianos, que *in vitro* no muestran sinergia. Por un lado, podría deberse a la acción antiinflamatoria de los macrólidos, que actuarían como factor regulador de las citoquinas liberadas en la sepsis (274). Por otro, cabría la posibilidad de que existiera otro microorganismo atípico (*Chlamydia*, *Mycoplasma*) asociado con la neumonía neumocócica, sobre el que el macrólido sería eficaz (274). Por otro lado, las nuevas fluoroquinolonas con actividad frente a neumococo

(levofloxacino, moxifloxacino) han mostrado ser superiores en el tratamiento de la neumonía neumocócica que ciprofloxacino y ofloxacino (275). Sin embargo, no se ha encontrado ningún trabajo que analice si alguna combinación de antimicrobianos (betalactámico y macrólido o betalactámico y fluoroquinolona) es igual o superior en el tratamiento de la neumonía neumocócica, en cuanto a mortalidad y duración del ingreso.

En este estudio, la mortalidad de los pacientes que recibieron tratamiento combinado fue ligeramente superior a la de aquellos tratados con un único antimicrobiano (14% vs 3%, $p = 0,082$). Esto se relacionó con un mayor porcentaje de pacientes ingresados en UCI en el grupo de tratamiento combinado (34% vs 10%, $p = 0,008$). Así mismo, la mortalidad de los pacientes que recibieron tratamiento combinado de betalactámico con fluoroquinolona fue superior a la de aquellos que recibieron betalactámico con macrólido (18% vs 6%, $p = 0,556$), pero también se encontró un mayor número de pacientes ingresados en UCI en el grupo que recibió betalactámico con fluoroquinolona (42% vs 12%, $p < 0,001$), lo que podría constituir un sesgo de gravedad en estos pacientes. Por otro lado, no se han podido establecer diferencias pronósticas entre las diferentes combinaciones de antimicrobianos, aunque aquellas combinaciones de betalactámicos con un fármaco diferente a un macrólido o a una fluoroquinolona, mostraron una mayor tasa de mortalidad (25% vs 6% en combinación con macrólido vs 16% en combinación con fluoroquinolona, $p = 0,406$). Esto apoyaría la utilización de las pautas de tratamiento recomendadas en las guías clínicas (145, 276). Sin embargo, al no ser este uno de los objetivos del estudio, este resultado podría estar sesgado, ya que los pacientes con combinaciones de tratamiento diferentes a las recomendadas podrían ser pacientes más graves o con determinadas comorbilidades que condicionarían una pauta de tratamiento fuera de las guías y que al mismo tiempo influirían en la mortalidad.

La prevalencia de resistencia a macrólidos fue del 19%, similar a otras series españolas (86, 87), europeas (191, 277) o norteamericanas (189). Además, al igual que en otros trabajos, se

observó un mayor número de aislamientos resistentes a macrólidos en los pacientes menores de 5 años (277-279). Los estudios que han analizado la variación de la sensibilidad a macrólidos tras la VPC-7 también arrojan resultados discordantes. Algunos autores han encontrado un descenso de las cepas resistentes a EM (87, 279, 280), mientras que otros han observado un incremento relacionado con el aumento de determinados SNV-7, especialmente 19A y 15A (189). Por otro lado, en otro trabajo la incidencia de cepas resistentes a EM no se modificó tras la comercialización de la VPC-7, observándose un descenso de las cepas resistentes pertenecientes a los SV-7 y un aumento de los clasificados como SNV-7 (281). Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestra serie, en la que la prevalencia de *S. pneumoniae* resistentes a EM no se modificó (16% vs 22%, $p = 0,260$), detectándose un descenso de los SV-7 en los aislamientos resistentes a EM (86% vs 46%, $p = 0,094$).

Al igual que en otras series europeas y españolas (188), el fenotipo de resistencia a macrólidos más frecuentemente identificado fue el fenotipo MLS_B, que era constitutivo en la mayoría de los aislamientos (81%). En el periodo postvacunal se observó un descenso en la prevalencia de este fenotipo, aunque éste no alcanzó significación estadística (94% vs 73%, $p = 0,132$). En Estados Unidos también se ha observado una modificación del fenotipo de resistencia a macrólidos tras la introducción de la VPC-7. En este país el fenotipo M es el más habitual (189) y tras la introducción de la VPC-7 se ha producido un descenso significativo de este fenotipo y un incremento de los aislamientos con fenotipo MLS_B (189).

En diferentes países se han identificado cepas con dos genes de resistencia a macrólidos (*ermB* y *mefA*), con una prevalencia que varía entre el 0 y el 50% (188, 191, 192). Cabe destacar que estas cepas se han asociado con resistencia a múltiples antimicrobianos (189, 190, 192, 282) y que tras la comercialización de la VPC-7 su incidencia ha aumentado (189). Esto se ha relacionado con la expansión de determinados complejos clonales como el CC81 (191) y el CC271 (190, 283). En nuestra población se aisló una única cepa portadora de ambos genes de resistencia, que fue clasificada como

multirresistente ya que presentaba una sensibilidad intermedia a PE y era resistente a CM. Esta cepa pertenecía al serotipo 14, ST-156, CC1109. Este complejo clonal no se ha relacionado previamente con la resistencia a macrólidos.

En el periodo de tiempo estudiado (1992-2008) sólo se identificó una cepa resistente a LE (0,4%), siendo la prevalencia similar a la de otras series españolas (85, 86, 224, 235). En esta cepa se demostró mutación en *parC* y *gyrA*, así como la presencia de bombas de expulsión de fluoroquinolonas. Era una cepa multirresistente, no sensible a PE y CT y resistente a EM y CM, fenotipo MLS_B genotipo *ermB*. La resistencia a LE se ha relacionado con una disminución de la sensibilidad a otros antimicrobianos, especialmente PE (202, 205, 214, 223), así como con cepas multirresistentes (201, 223). La cepa de *S. pneumoniae* resistente a LE pertenecía al serotipo 23F, que ya se ha relacionado previamente con resistencia a LE (205, 210, 216, 284, 285). Sin embargo, hasta el momento este serotipo no se había identificado en nuestro país asociado a resistencia a LE. En España el serotipo que con más frecuencia se asocia a resistencia a fluoroquinolonas es el serotipo 8 (195, 204, 251).

Diferentes factores se han asociado con una mayor probabilidad de resistencia a fluoroquinolonas, como son el uso previo de fluoroquinolonas, la EPOC, pacientes hospitalizados, residentes en geriátricos y edad superior a 65 años (179, 204, 209, 243, 286). Por este motivo, se desaconseja la utilización de monoterapia con fluoroquinolonas en el tratamiento de neumonía neumocócica en pacientes que recientemente han recibido estos antimicrobianos, por el riesgo de aparición de resistencias y de fracaso terapéutico (204, 218, 243, 287). Otros autores no han encontrado asociación entre el uso de fluoroquinolonas y un aumento de resistencia a LE, ni con la selección de cepas precursoras de resistencia (288).

En este trabajo se observó un incremento significativo de las cepas con CMI a LE 1-2 $\mu\text{g/ml}$ entre el periodo pre y postvacunal (7% vs 21%, $p = 0,002$). Al igual que en otros trabajos, no se ha podido demostrar mutación en ninguno de los genes del QRDR estudiados (*parC* y *gyrA*), ni se han identificado en estas cepas bombas de expulsión a fluoroquinolonas (199-202, 208). Los aislamientos de *S. pneumoniae* con CMI a LE 1-2 $\mu\text{g/ml}$, se asociaron con la patología pulmonar (asma, EPOC, bronquiectasias) y con el genotipo *mefA*.

En la actualidad, varios autores han sugerido la posibilidad de disminuir el punto de corte de sensibilidad a LE a 1 o 2 $\mu\text{g/ml}$ (223, 243, 289). Otros abogan por unificar el punto de corte entre la guía americana (CLSI) y la europea (EUCAST) (209, 287, 290), ya que según la CLSI los *S. pneumoniae* con CMI a LE de 4 $\mu\text{g/ml}$ son clasificados como sensibilidad intermedia (177), mientras que con la EUCAST, aquellos neumococos con CMI a LE ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ ya se consideran resistentes (178). Si en este trabajo se siguieran las recomendaciones de la EUCAST, la tasa de resistencia a LE se duplicaría, de un 0,4% a un 0,8%. Desconocemos si esto supondría un cambio en el pronóstico de los pacientes, o si simplemente llevaría a la restricción del uso de un grupo de antibióticos altamente activos en el manejo de los pacientes con infección neumocócica.

Por último, el porcentaje de *S. pneumoniae* multirresistentes (véase definición en apartado 3.4) fue ligeramente inferior a la encontrada en otras series (11%), en las que la tasa de multirresistencia varió entre un 15%-22% (134, 291, 292). Se han identificado diversos factores asociados con las cepas multirresistentes, como los SV-7 (99), la tasa de prescripción antibiótica ambulatoria, especialmente de cefalosporinas y macrólidos (291), así como la expansión del serotipo 19A (112, 125, 249, 256). En nuestra población únicamente se encontró asociación entre las cepas multirresistentes y los SV-7 (OR = 6,737, IC al 95% = 2,081-21,818). Aunque, a priori, la mortalidad de los pacientes infectados por cepas multirresistentes debería ser superior a la de los pacientes infectados por cepas sensibles, los resultados de la literatura no son homogéneos. Así, algunos

autores han encontrado una mayor mortalidad (293), en cambio otros, al igual que nosotros, no lograron demostrar esta asociación (258, 294).

5.5. VARIACIÓN DE LOS SEROTIPOS

Como ya se ha comentado previamente, la mayoría de los estudios poblacionales han demostrado una disminución de la prevalencia de SV-7 responsables de EISP tras la comercialización de la VPC-7, no sólo en la población vacunada (87, 105, 114, 134, 248, 295), sino también, por el efecto rebaño, en la población infantil no vacunada y en la población adulta (111, 256). Pocos estudios han encontrado que tras la introducción de la VPC-7 los serotipos responsables de EISP no se hayan modificado. Uno de ellos es un trabajo francés en el que, tras la introducción de la VPC-7, observaron un incremento en la incidencia de meningitis, sin modificación en la prevalencia de los SV-7 (95). Este hecho se relacionó con una introducción lenta de la VPC-7. Otro, es un estudio realizado en el País Vasco en el que sólo encontraron disminución de los SV-7 en la población infantil, pero no en la población adulta (99).

En el presente trabajo no se ha podido demostrar que tras la introducción de la VPC-7 en 2001 los serotipos aislados en pacientes con EISP se hayan modificado de forma global, ni en la población infantil. No obstante, se observó una disminución de los SV-7 aislados en pacientes mayores de 65 años (67% vs 25%, $p = 0,044$) y en los diagnosticados de meningitis neumocócica (83% vs 21%, $p = 0,018$). Observándose en ambos casos una disminución de los aislamientos no sensibles a PE. En este trabajo, los pacientes mayores de 65 años presentaban, en el periodo prevacunal una prevalencia de SV-7 superior a los otros grupos de edad. Sin embargo, en la mayoría de las series la prevalencia de los SV-7 era superior en la población infantil (87, 99, 130, 248). Varios trabajos apoyan la importancia de la prevalencia prevacunal de los SV-7 en el efecto de la VPC-7. Así,

en el estudio de Pérez-Trallero et al se observó un descenso de los SV-7 en la población infantil (de un 63% a un 33%), pero no en la población adulta, que presentaba una prevalencia de SV-7 inferior (40%) (99). Por otro lado, algunos autores han sugerido que es necesaria una prevalencia de SV-7 del 80% antes de la introducción de la VPC-7 para constatar la eficacia de la misma (107). La peculiar distribución de los SV-7 de nuestra población, con una mayor prevalencia de SV-7 en la población ≥ 65 años y menor en los ≤ 5 años, ha podido condicionar que el descenso de estos serotipos únicamente se haya producido en los pacientes de mayor edad.

Otro factor que también ha podido influir en la ausencia de modificación de los serotipos circulantes en nuestro trabajo, ha podido ser una baja tasa de vacunación, ya que la VPC-7 aunque estaba incluida en el calendario de vacunación infantil, no estaba financiada. Los datos sobre vacunación infantil en Galicia de los que disponemos son discordantes. El SERGAS estimó que hasta un 73% de los niños menores de 2 años habrían recibido al menos 3 dosis de la VPC-7 en 2009 (233). Por otro lado, según la información facilitada por Pfizer menos del 50% de los niños nacidos entre 2005-2006 recibieron 2 o más dosis de VPC-7. Según las dosis de PREVENAR 7 dispensadas en 2006 (43.000) y la natalidad en Galicia entre 2004-2006 (19.000-21.000 nacimientos/año) se ha estimado una media de 2,04-2,26 dosis por niño. Finalmente, en un estudio europeo en el que se analizaban las particularidades de la infección neumocócica en cuatro países europeos (Francia, España, Bélgica y Reino Unido), la tasa de vacunación española estaba en torno al 30% (105). A pesar de esto, otros estudios de nuestro entorno con baja tasa de vacunación, sí han encontrado modificación de los serotipos responsables de EISP (85, 87, 99, 116, 256). La baja tasa de vacunación infantil, unida a una prevalencia de SV-7 circulantes en la población general inferior al 50% han podido influir en la ausencia de modificación de los serotipos responsables de EISP en este trabajo.

En Galicia no se ha realizado ningún estudio que analice la prevalencia o la incidencia de los diferentes serotipos antes de la introducción de la VPC-7, lo que dificulta la interpretación y, de

alguna forma, la validación de los resultados encontrados en nuestro trabajo. En estos momentos se está llevando a cabo un estudio a nivel de la comunidad gallega para valorar las modificaciones de los serotipos de neumococo aislados en pacientes con EISP tras la introducción de la VPC-13 (Vixilancia e mellora da enfermidade pneumocócica invasora, Saúde Pública, SERGAS) (251). Este trabajo llevado a cabo entre 2011-12, muestra una prevalencia de los SV-7 de un 15%, inferior a la encontrada en nuestro estudio. Sin embargo, la población incluida en ese trabajo presenta una edad superior a la de nuestros pacientes, con una alta prevalencia de pacientes mayores de 65 años (60%) y una baja prevalencia de pacientes menores de 5 años (5%), lo que dificulta la comparación de ambos trabajos. La mayor edad en el estudio de vigilancia epidemiológica podría deberse a varios motivos. Por un lado, podría haberse producido un descenso en la incidencia de la EISP en la población infantil tras la introducción de la VPC-13, aunque parece un efecto demasiado precoz desde la implantación de la misma. Por otro lado, el perfil demográfico de nuestra población es reflejo de las características del área sanitaria de nuestro centro, que presenta una elevada natalidad, y que difiere de otras amplias regiones de la Comunidad Autónoma.

Aunque los SV-7 no disminuyeron globalmente en el periodo postvacunal, si se observó un descenso estadísticamente significativo de un SV-7, el 19F (20% vs 2%, $p = 0,001$). Este serotipo era el más prevalente antes de la introducción de la VPC-7, lo que podría explicar su disminución. Además, se observó un incremento del serotipo 19A, que a pesar de ser un serotipo relacionado con el 19F, que está incluido en la VPC-7, no presenta protección cruzada (134). De hecho, este serotipo se ha convertido en el segundo serotipo más frecuente en nuestra población (12%), después del serotipo 3 (14%).

Por otro lado, se observó una elevada prevalencia de los SV-13, tanto antes de la comercialización de la VPC-7, como después. Este hecho hace pensar, que la introducción en el calendario vacunal infantil de la VPC-13 desde enero de 2011 y su financiación por el SERGAS, así

como su nueva indicación para grupos de riesgo de edad adulta, colaborará a una disminución significativa de la enfermedad neumocócica en nuestra población.

Los serotipos invasivos (serotipos 1, 5 y 7F) se han asociado con formas clínicas graves (meningitis, bacteriemia primaria), en pacientes sin comorbilidades, presentando una elevada tasa de ingreso en UCI y de mortalidad (253). Recientemente, estos serotipos se han identificado mayoritariamente en pacientes diagnosticados de neumonía (157, 239), presentando una elevada tasa de empiema, especialmente en los casos producidos por el serotipo 1 (138, 254). En este trabajo los serotipos invasivos únicamente se aislaron en pacientes diagnosticados de neumonía, identificándose también un elevado porcentaje de empiema (25% vs 8%, $p = 0,095$). Al igual que en otros estudios, los pacientes infectados por serotipos invasivos eran pacientes con baja tasa de comorbilidades (96, 138). Pero al contrario que en otros trabajos (96, 138, 253), el porcentaje de pacientes que precisaron ingreso en UCI, así como la mortalidad de los pacientes infectados por serotipos invasivos fue similar a la de los infectados por otros serotipos. Cabe destacar por último, que entre los serotipos invasivos, no se identificó ningún aislamiento no sensible a PE o EM, ni multirresistentes, aunque no hay estudios previos que permitan comparar estos resultados.

Los serotipos no invasivos (serotipos 3, 6, 8, 15, 19, 23 y 33) suelen comportarse como patógenos oportunistas, afectando a pacientes pluripatológicos, dando lugar a infecciones graves (meningitis, bacteriemia primaria) y, en consecuencia, asociando una elevada morbimortalidad (96, 138). En nuestro trabajo, sin embargo, las características de los pacientes, las formas de presentación clínica, así como la mortalidad de los pacientes infectados por los serotipos no invasivos fueron similares a las de los pacientes infectados por otros serotipos. Finalmente, en estos serotipos se detectó una elevada tasa de cepas multirresistentes (27% vs 7%, $p = 0,004$). Estas cepas pertenecían a los serotipos 19F y 6B, que se han relacionado previamente con aislamientos multirresistentes (296). Otro hecho a destacar, en esta serie, es el descenso de los serotipos no

invasivos en el periodo postvacunal. Este hallazgo no ha sido comunicado previamente y no se ha encontrado ningún factor asociado con este descenso.

Como cabría esperar los serotipos pediátricos fueron más frecuentes en pacientes menores de 5 años. Aunque estos serotipos se han relacionado previamente con una elevada mortalidad (25-40%) (142), en este trabajo se observó que los pacientes infectados por los serotipo pediátricos presentaban una mortalidad inferior (10% vs 22%, $p = 0,121$). Otro hallazgo destacable es que las cepas clasificadas dentro de los serotipos pediátricos presentaban una elevada tasa de resistencia a los diferentes antimicrobianos (PE, CT, EM, CM), así como un elevado porcentaje de cepas multirresistentes. Este hallazgo, que previamente no había sido analizado, podría estar en relación con los serotipos clasificados como pediátricos, entre los que se incluyen determinados serotipos que se asocian con un elevado porcentaje de cepas resistentes a los antimicrobianos, especialmente los serotipos 6, 14 y 19 (296).

5.6. SEROTIPO 19A

En nuestro trabajo se ha observado un incremento del serotipo 19A tras la introducción de la VPC-7 (2% vs 12%, $p = 0,058$). Múltiples autores de diferentes países también han encontrado un aumento de los casos de EISP relacionados con este serotipo tras la introducción de la VPC-7 (62, 81, 83-85, 97, 99, 104, 105, 109, 111, 114, 115, 117, 119, 123-126). Sin embargo, otros autores observaron este cambio antes de la comercialización de la VPC-7 (105, 120, 135, 136). Así, el serotipo 19A ha pasado a ser en muchos países uno de los serotipos más prevalentes en los casos de EISP (85, 119, 278), por lo que la nueva VPC-13 incluye este serotipo.

Se han postulado diferentes factores que han podido condicionar un aumento del serotipo 19A (231), como son el aumento del consumo de antibióticos, especialmente de macrólidos (85,

105, 120), cambios en el polisacárido capsular (297), el aumento de cepas resistentes por expansión de determinados clones (125, 127, 128, 136, 298), que conferirían a este serotipo una ventaja de supervivencia. También se cree que los cambios epidemiológicos propios de *S. pneumoniae* (85) han podido influir en la modificación de la prevalencia de este serotipo, lo que explicaría el aumento del mismo en determinadas poblaciones antes de la introducción de la VPC-7. Por otro lado, el serotipo 19A era el noveno serotipo en frecuencia como colonizador de la nasofaringe de los niños (125), por lo que la erradicación de los SV-7 tras la utilización de la VPC-7 (81, 115), haría de este serotipo el segundo colonizador más frecuente.

Se han identificado diferentes factores relacionados con la enfermedad neumocócica invasiva producida por este serotipo, como una mayor prevalencia en menores de 5 años (111, 123, 125, 160), el aumento del consumo de antibióticos (123, 127, 231) y las comorbilidades (119). De esta forma, en nuestro estudio se observó un mayor riesgo de EISP por serotipo 19A en los pacientes menores de 5 años, así como en los que había recibido tratamiento antibiótico previo. En este trabajo la forma clínica de EISP predominante en los pacientes infectados por este serotipo fue la neumonía, complicada en el 10% de los casos con empiema. Otros autores, han encontrado una elevada tasa de meningitis y de bacteriemia primaria (123).

El aumento del serotipo 19A ha adquirido una gran importancia a nivel mundial, ya que, como se ha comentado previamente, este serotipo se ha asociado a una elevada tasa de resistencia a antibióticos (112, 114, 119, 123-125, 127). En Galicia, el serotipo 19A es, tras la introducción de la VPC-13 el serotipo resistente a EM más frecuente (35%) (251). En nuestra población, también se ha observado una elevada prevalencia de resistencia a EM en las cepas de este serotipo. Sin embargo, la mayoría de los aislamientos fueron sensibles a PE, CT o LE. Por otro lado, la tasa de cepas multirresistentes fue similar a la de los demás serotipos (17% vs 13%, $p = 0,650$). Es posible que la baja tasa de multirresistencia del serotipo 19A en nuestra población se deba a la ausencia de

determinados tipos clonales, como con el ST-320 (123, 125, 127, 128), ST-276 (123), ST-81 (124, 125, 127), ST-663 (129), ST-199 (125), que se asocian a multirresistencia. En este trabajo se identificaron únicamente dos cepas multirresistentes que pertenecían a los tipos clonales ST-81 y ST-276.

Por otro lado, entre los clones pertenecientes al serotipo 19A se han identificado otras cepas sensibles a todos los antimicrobianos estudiados. Estas cepas pertenecían a los tipos clonales ST-1201, ST-2109, ST-193 y ST-1848. El ST-1201 se ha relacionado previamente con aislamientos sensibles a los antimicrobianos (127, 298). Por otro lado, el ST-193 se ha relacionado tanto con aislamientos sensibles (127), como con aislamientos resistentes a macrólidos, generalmente con fenotipo MLS_B (298), como también se ha observado en este trabajo. Por último, los ST-2109 y ST-1848 son dos tipos clonales infrecuentes por lo que no se ha establecido su relación con los patrones de resistencia.

En este estudio se ha identificado un nuevo tipo clonal de *S. pneumoniae*, el ST-8489, perteneciente al serotipo 19A. Esta cepa era sensible a PE, CT y LE y presentaba alto nivel de resistencia para EM y CM (fenotipo MLS_B, genotipo *ermB*).

Finalmente, los estudios de clonalidad de los diferentes serotipos, incluido el 19A, (BOX-A), no han demostrado la expansión de ningún clon determinado. Además, mediante el estudio de tipado molecular de las cepas del serotipo 19A se ha observado una gran distancia genética entre las diferentes cepas aisladas de este serotipo. Este hallazgo concuerda con el de otros autores que también han detectado una gran diversidad clonal entre las cepas de *S. pneumoniae* (99, 235).

5.7. LIMITACIONES

Se trata de un trabajo cuyo diseño es retrospectivo, con todas las limitaciones inherentes al mismo. Sin embargo, la serie abarca un periodo extenso de tiempo (16 años). Este tipo de diseño, no ha permitido conocer las características epidemiológicas y clínicas de todos los pacientes, aunque se ha intentado realizar una revisión de las historias clínicas lo más exhaustivamente posible. Tampoco se ha podido conocer el estado vacunal de todos los pacientes, aunque el objetivo del estudio no era establecer la eficacia individual de la vacuna, sino el efecto poblacional de la misma.

Todos los aislamientos pertenecían a un único centro, por lo que los resultados pueden no ser extrapolables a otras zonas. Sin embargo, para el conocimiento de la infección neumocócica invasiva es importante tener en cuenta las variaciones geográficas y conocer las peculiaridades locales, como han puesto de manifiesto otros autores (231).

Por otro lado, no se han serotipado todos los aislamientos de *S. pneumoniae*. Teniendo en cuenta que existen más de 90 serotipos de neumococo los resultados podrían no ser representativos de la población a estudio. Sin embargo, el tamaño muestral se calculó teniendo en cuenta este factor y se estableció para obtener un nivel de confianza del 90% y con un poder estadístico del 80%.





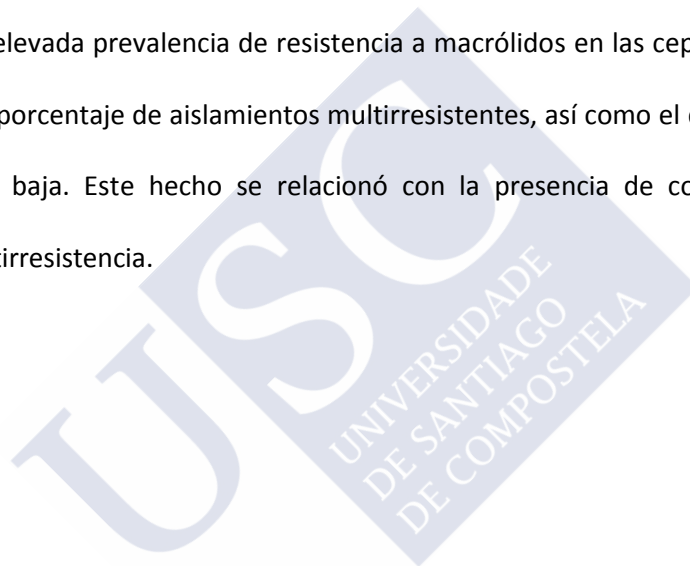
CONCLUSIONES



1. La vacunación de la población infantil con la vacuna antineumocócica heptavalente ha originado una disminución de la prevalencia de los serotipos vacunales responsables de infección neumocócica invasiva en mayores de 65 años, así como en los pacientes diagnosticados de meningitis, pero no en otros grupos de edad, ni en las otras formas de enfermedad neumocócica invasiva. Así mismo, tampoco se han observado modificaciones en los patrones de resistencia de las cepas de *S. pneumoniae* circulantes. Ambos hallazgos podrían estar en relación con una baja cobertura de la vacuna heptavalente, así como con una baja tasa de vacunación infantil.
2. Tras el inicio de la utilización de la vacuna antineumocócica heptavalente no se encontraron diferencias en las formas de presentación clínica de la enfermedad neumocócica invasiva, siendo la neumonía la manifestación clínica más frecuente en todos los grupos de edad.
3. La tasa de ingreso en UCI y la mortalidad relacionada con la enfermedad neumocócica invasiva no se modificaron tras la introducción de la vacuna antineumocócica heptavalente. Los factores asociados con el ingreso en UCI fueron una baja tasa de comorbilidades y la edad pediátrica. La mortalidad en estos pacientes se relacionó con la edad avanzada, la tasa de comorbilidad, la bacteriemia primaria, así como con la intubación orotraqueal.
4. En el periodo postvacunal se observó un aumento en la prevalencia de las cepas de *S. pneumoniae* con CMI a levofloxacino entre 1-2 µg/ml. Sin embargo, este hecho no se relacionó con la aparición de mutaciones en los genes *parC* o *gyrA*, ni con la presencia de bombas de expulsión de fluoroquinolonas.
5. Se observó una elevada prevalencia de resistencia a macrólidos en los pacientes menores de 5 años. El fenotipo de resistencia a macrólidos más frecuente fue el MLS_B, aunque en el periodo

postvacunal se observó un descenso del mismo. Así mismo, se identificó una cepa multirresistente portadora de dos genes de resistencia a macrólidos (*ermB* y *mefA*).

6. La prevalencia del serotipo 19A aumentó tras la introducción de la vacuna heptavalente, convirtiéndose en uno de los serotipos más frecuentes en los casos de enfermedad invasiva. Se observó una gran variedad clonal en las cepas de este serotipo. La infección por este serotipo se relacionó con una edad inferior a 5 años y con el consumo previo de antibióticos.
7. Se detectó una elevada prevalencia de resistencia a macrólidos en las cepas del serotipo 19A. Sin embargo, el porcentaje de aislamientos multirresistentes, así como el de cepas no sensibles a penicilina fue baja. Este hecho se relacionó con la presencia de complejos clonales no asociados a multirresistencia.





BIBLIOGRAFÍA



1. Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med.* 1933;57(4):571-95.
2. Klebs E. Beiträge zur Kenntniss der Schistomyceten. VII. Die Monadinen. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie (Leipzig).* 1875;4:409-88.
3. Pasteur L, Chamberland MM, Roux E. Sur une maladie nouvelle, provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Compt rend Acad d sci.* 1881;92:159-65.
4. Sternberg GM. The pneumonia-coccus of Friedlander (*Micrococcus Pasteuri*, Sternberg). *Am J Med Sci.* 1885;90:106-23.
5. Fraenkel A. Weitere Beiträge zur Lehre von den Mikrokokken der genuinen fibrinösen Pneumonie. *Ztschr f Klin Med.* 1886b;11:437-58.
6. Winslow CE, Broadhurst J, Buchanan RE, Krumwiede C, Rogers LA, Smith GH. The families and genera of the bacteria: Final report of the committee of the society of american bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *J Bacteriol.* 1920;5(3):191-229.
7. Deibel RH, Seeley HWJ. Family II: Streptococcaceae. *Fam nov.* In: Buchanan RE, Gibbons NE, editors. *Bergey's manual of determinative bacteriology.* 8th ed. Baltimore; 1974. p. 490-517.
8. Fraenkel A. Die genuine Pneumonie. *Verh Cong Inn Med.* 1884;3:17-31.
9. Fraenkel A. Bakteriologische Mittheilungen. *Ztschr f Klin Med.* 1885;10:401-61.
10. Friedlander C. Die Mikrokokken der Pneumonie. *Fortschr Med (Munchen).* 1883b;1:715-33.
11. Talamon c. Coccus de la pneumonie. *Bulletin de la Société Anatomique de Paris.* 1883;57:475-81.
12. Netter A. De la meningite due au pneumocoque (avec ou sans pneumonie). *Arch Gén de Méd (series 7).* 1887;19:257-77, 434-55.

13. Zaufal E. Mikroorganismen im secrete der otitis media acuta. Prager Medic Wochenschrift. 1887;12:225-7.
14. Watson DA, Musher DM, Jacobson JW, Verhoef J. A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery. Clin Infect Dis. 1993;17(5):913-24.
15. Gram C. Ueber die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnittund Trockenpräparaten. . Fortschr Med (Munchen). 1884;2:185-9.
16. Klemperer G, Klemperer F. Versuche über Immunisirung und Heilung bei der Pneumokokkeninfection. Berl Klin Wochenschr. 1891a;28:869-75.
17. Klemperer G, Klemperer F. Versuche über Immunisirung und Heilung bei der Pneumokokkeninfection. Berl Klin Wochenschr. 1891b;28:833-5.
18. Issaëff B. Contribution à l'étude de l'immunité acquise contre le pneumocoque. Ann Institut Pasteur. 1893;1893(7).
19. Metchnikoff E. Études sur l'immunité. 4 memoire. L'immunité des cobayes vaccinés contre le vibrio Metchnikowii. Ann Institut Pasteur. 1891;5:465-78.
20. Neufeld F. Ueber die agglutination der pneumokokken unf über die theroien der agglutination. Z Hyg Infektionskr. 1902;40:54-72.
21. Neufeld F, Rimpau W. Ueber die antikorper des streptokokken- und pneumokokken-immunserums. Deut Med Wochenschr 1904;30:1458-60.
22. Avery OT, Dubos R. The protective action of a specific enzyme against type III pneumococcus infection in mice J Exp Med. 1931;54(1):73-89.
23. Dubos R, Avery OT. Decomposition of the capsular polysaccharide of pneumococcus type III by a bacterial enzyme J Exp Med. 1931;54(1):51-71.

24. Neufeld F, Haendel L. Weitere untersuchungen uber pneumokokken-heilsera. III. Mitteilung. Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte. 1910;34:293-304.
25. Dochez AR, Gillespie LJ. A biologic classification of pneumococci by means of immunity reactions. JAMA. 1913;61:727-32.
26. Dochez AR, Avery OT. Soluble substance of pneumococcus origin in the blood and urine during lobar pneumonia. Proc Soc Exp Biol Med. 1917;14:126-7.
27. Heidelberger M, Avery OT. The soluble specific substance of pneumococcus J Exp Med. 1923;38(1):73-9.
28. Heidelberger M. Immunologically specific polysaccharides. Chem Rev. 1927;3:403-23.
29. Wright AE, Morgan WP, Colebrook L, Dodgson RW. Observations on prophylactic inoculation against pneumococcus infections, and on the results which have been achieved by it. Lancet. 1914;1:1-10, 87-95.
30. Austrian R. Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention. Rev Infect Dis. 1981;3 Suppl:S1-17.
31. Felton LD, Baily GH. Biologic significance of the soluble specific substances of pneumococci. J Infect Dis. 1926;38:131-44.
32. Francis T, Tillett WS. Cutaneous reactions in pneumonia: the development of antibodies following the intradermal injection of type-specific polysaccharide. J Exp Med. 1930;52(4):573-85.
33. Finland M, Brown JW. Reactions of human subjects to the injection of purified type specific pneumococcus polysaccharides. J Clin Invest. 1938;17(4):479-88.
34. Finland M, Dowling HF. Cutaneous reactions and antibody response to intracutaneous injections of pneumococcus polysaccharides. J Immunol. 1935;29:285-99.

35. Finland M, Ruegsegger JM. Immunization of human subjects with the specific carbohydrates of type III and the related type VIII pneumococcus. *J Clin Invest.* 1935;14(6):829-32.
36. Finland M, Sutliff WD. Specific antibody response of human subjects to intracutaneous injection of pneumococcus products. *J Exp Med.* 1932;55(6):853-65.
37. Smillie WG, Warnock GH, White HJ. A study of a type I pneumococcus epidemic at the state hospital at Worcester, Mass. *Am J Public Health Nations Health.* 1938;28(3):293-302.
38. Heidelberger M, MacLeod CM, di Lapi MM. The human antibody response to simultaneous injection of six specific polysaccharides of pneumococcus. *J Exp Med.* 1948;88(3):369-72.
39. MacLeod CM, Hodges RG, Heidelberger M, Bernhard WG. Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides. *J Exp Med.* 1945;82(6):445-65.
40. Felton LD. Studies on immunizing substances in pneumococci: VII. Response in human beings to antigenic pneumococcus polysaccharides, types I and II. *Public Health Rep.* 1938;53:1955-77.
41. Kaufman P. Pneumonia in old age; active immunization against pneumonia with pneumococcus polysaccharide; results of a six year study. *Arch Intern Med.* 1947;79(5):518-31.
42. Austrian R. Pneumococcal infection and pneumococcal vaccine. *N Engl J Med.* 1977;297(17):938-9.
43. Austrian R, Douglas RM, Schiffman G, Coetzee AM, Koornhof HJ, Hayden-Smith S, et al. Prevention of pneumococcal pneumonia by vaccination. *Trans Assoc Am Physicians.* 1976;89:184-94.
44. Robbins JB, Austrian R, Lee CJ, Rastogi SC, Schiffman G, Henrichsen J, et al. Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. *J Infect Dis.* 1983;148(6):1136-59.
45. Makela PH, Sibakov M, Herva E, Henrichsen J, Luotonen J, Timonen M, et al. Pneumococcal vaccine and otitis media. *Lancet.* 1980;2(8194):547-51.

46. Simberkoff MS, El Sadr W, Schiffman G, Rahal JJ, Jr. Streptococcus pneumoniae infections and bacteremia in patients with acquired immune deficiency syndrome, with report of a pneumococcal vaccine failure. *Am Rev Respir Dis.* 1984;130(6):1174-6.
47. Rodríguez-Barradas MC, Musher DM, Lahart C, Lacke C, Groover J, Watson D, et al. Antibody to capsular polysaccharides of Streptococcus pneumoniae after vaccination of human immunodeficiency virus-infected subjects with 23-valent pneumococcal vaccine. *J Infect Dis.* 1992;165(3):553-6.
48. Shapiro ED, Berg AT, Austrian R, Schroeder D, Parcells V, Margolis A, et al. The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine. *N Engl J Med.* 1991;325(21):1453-60.
49. Goebel WF, Avery OT. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins: I. The synthesis of p-aminophenol beta-glucoside, p-aminophenol beta-galactoside, and their coupling with serum globulin. *J Exp Med.* 1929;50(4):521-31.
50. Käyhty H, Eskola J. New vaccines for the prevention of pneumococcal infections. *Emerg Infect Dis.* 1996;2(4):289-98.
51. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med.* 1944;79(2):137-58.
52. Ertugrul N, Rodríguez-Barradas MC, Musher DM, Ryan MA, Agin CS, Murphy SJ, et al. BOX-polymerase chain reaction-based DNA analysis of nonserotypeable Streptococcus pneumoniae implicated in outbreaks of conjunctivitis. *J Infect Dis.* 1997;176(5):1401-5.
53. Guidolin A, Morona JK, Morona R, Hansman D, Paton JC. Nucleotide sequence analysis of genes essential for capsular polysaccharide biosynthesis in Streptococcus pneumoniae type 19F. *Infect Immun.* 1994;62(12):5384-96.

54. Watson DA, Kapur V, Musher DM, Jacobson JW, Musser JM. Identification, cloning, and sequencing of DNA essential for encapsulation of *Streptococcus pneumoniae*. *Curr Microbiol.* 1995;31(4):251-9.
55. Dillard JP, Caimano M, Kelly T, Yother J. Capsules and cassettes: genetic organization of the capsule locus of *Streptococcus pneumoniae*. *Dev Biol Stand.* 1995;85:261-5.
56. Nesin M, Ramírez M, Tomasz A. Capsular transformation of a multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in vivo. *J Infect Dis.* 1998;177(3):707-13.
57. <http://eburst.mlst.net/>. The Department of Infectious Disease Epidemiology Imperial College London; 2012 [updated 2012 15/10/2012; cited]; Available from.
58. Sorensen UB. Pneumococcal polysaccharide antigens: capsules and C-polysaccharide. An immunochemical study. *Dan Med Bull.* 1995;42(1):47-53.
59. Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2010. p. 2623-42.
60. Brueggemann AB, Griffiths DT, Meats E, Peto T, Crook DW, Spratt BG. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. *J Infect Dis.* 2003;187(9):1424-32.
61. Kelly T, Dillard JP, Yother J. Effect of genetic switching of capsular type on virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1994;62(5):1813-9.
62. Muñoz-Almagro C, Esteva C, de Sevilla MF, Selva L, Gene A, Pallarés R. Emergence of invasive pneumococcal disease caused by multidrug-resistant serotype 19A among children in Barcelona. *J Infect.* 2009;59(2):75-82.
63. Wyres KL, Lambertsen LM, Croucher NJ, McGee L, von Gottberg A, Linares J, et al. Pneumococcal capsular switching: an historical perspective. *J Infect Dis.* 2012;[Epub ahead of print].

64. Rubins JB, Charboneau D, Paton JC, Mitchell TJ, Andrew PW, Janoff EN. Dual function of pneumolysin in the early pathogenesis of murine pneumococcal pneumonia. *J Clin Invest.* 1995;95(1):142-50.
65. Rubins JB, Janoff EN. Pneumolysin: a multifunctional pneumococcal virulence factor. *J Lab Clin Med.* 1998;131(1):21-7.
66. McDaniel LS, Sheffield JS, Delucchi P, Briles DE. PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type. *Infect Immun.* 1991;59(1):222-8.
67. McDaniel LS, Yother J, Vijayakumar M, McGarry L, Guild WR, Briles DE. Use of insertional inactivation to facilitate studies of biological properties of pneumococcal surface protein A (PspA). *J Exp Med.* 1987;165(2):381-94.
68. Paton JC, Berry AM, Lock RA. Molecular analysis of putative pneumococcal virulence proteins. *Microb Drug Resist.* 1997;3(1):1-10.
69. Berry AM, Lock RA, Hansman D, Paton JC. Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1989;57(8):2324-30.
70. Berry AM, Paton JC, Hansman D. Effect of insertional inactivation of the genes encoding pneumolysin and autolysin on the virulence of *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Microb Pathog.* 1992;12(2):87-93.
71. Lock RA, Hansman D, Paton JC. Comparative efficacy of autolysin and pneumolysin as immunogens protecting mice against infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog.* 1992;12(2):137-43.
72. Kim PE, Musher DM, Glezen WP, Rodríguez-Barradas MC, Nahm WK, Wright CE. Association of invasive pneumococcal disease with season, atmospheric conditions, air pollution, and the isolation of respiratory viruses. *Clin Infect Dis.* 1996;22(1):100-6.

73. Henderson FW, Gilligan PH, Wait K, Goff DA. Nasopharyngeal carriage of antibiotic-resistant pneumococci by children in group day care. *J Infect Dis.* 1988;157(2):256-63.
74. Rauch AM, O'Ryan M, Van R, Pickering LK. Invasive disease due to multiply resistant *Streptococcus pneumoniae* in a Houston, Tex, day-care center. *Am J Dis Child.* 1990;144(8):923-7.
75. Doyle MG, Morrow AL, Van R, Pickering LK. Intermediate resistance of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin in children in day-care centers. *Pediatr Infect Dis J.* 1992;11(10):831-5.
76. Hoge CW, Reichler MR, Domínguez EA, Bremer JC, Mastro TD, Hendricks KA, et al. An epidemic of pneumococcal disease in an overcrowded, inadequately ventilated jail. *N Engl J Med.* 1994;331(10):643-8.
77. Hodges RG, Mac LC. Epidemic pneumococcal pneumonia; description of the epidemic. *Am J Hyg.* 1946;44(2):183-92.
78. Mercat A, Nguyen J, Dautzenberg B. An outbreak of pneumococcal pneumonia in two men's shelters. *Chest.* 1991;99(1):147-51.
79. Nuorti JP, Butler JC, Crutcher JM, Guevara R, Welch D, Holder P, et al. An outbreak of multidrug-resistant pneumococcal pneumonia and bacteremia among unvaccinated nursing home residents. *N Engl J Med.* 1998;338(26):1861-8.
80. Progress in introduction of pneumococcal conjugate vaccine worldwide, 2000-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2008;57(42):1148-51.
81. 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.
82. Lacapa R, Bliss SJ, Larzelere-Hinton F, Eagle KJ, McGinty DJ, Parkinson AJ, et al. Changing epidemiology of invasive pneumococcal disease among White Mountain Apache persons in the era of the pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Infect Dis.* 2008;47(4):476-84.

83. 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.
84. Foster D, Walker AS, Paul J, Griffiths D, Knox K, Peto TE, et al. Reduction in invasive pneumococcal disease following implementation of the conjugate vaccine in the Oxfordshire region, England. *J Med Microbiol*. 2011;60:91-7.
85. Fenoll A, Granizo JJ, Aguilar L, Giménez MJ, Aragonese-Fenoll L, Hanquet G, 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):1012-20.
86. Pardo Sánchez F, Pérez del Molino Bernal ML, Romero Jung PA, Martínez Lamas L, Regueiro García B. Enfermedad invasiva por *Streptococcus pneumoniae*: serotipos y sensibilidad a los antimicrobianos en un área sanitaria de Galicia. *Rev Esp Quimioter*. 2007;20(4):421-8.
87. Muñoz-Almagro C, Jordan I, Gene A, Latorre C, García-García JJ, Pallarés 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.
88. Pitsiou GG, Kioumis IP. Pneumococcal vaccination in adults: does it really work? *Respir Med*. 2011;105(12):1776-83.
89. Lee H, Nahm MH, Kim KH. The effect of age on the response to the pneumococcal polysaccharide vaccine. *BMC Infect Dis*. 2010;10:60-8.
90. Jackson LA, Janoff EN. Pneumococcal vaccination of elderly adults: new paradigms for protection. *Clin Infect Dis*. 2008;47(10):1328-38.
91. Pedersen RH, Lohse N, Ostergaard L, Sogaard OS. The effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccination in HIV-infected adults: a systematic review. *HIV Med*. 2010 Jul;12(6):323-33.

92. Jackson LA, Neuzil KM, Yu O, Benson P, Barlow WE, Adams AL, et al. Effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine in older adults. *N Engl J Med.* 2003;348(18):1747-55.
93. Vila-Córcoles A, Ochoa-Gondar O, Llor C, Hospital I, Rodríguez T, Gómez A. Protective effect of pneumococcal vaccine against death by pneumonia in elderly subjects. *Eur Respir J.* 2005;26(6):1086-91.
94. Gaillat J. Should patients with chronic obstructive pulmonary disease be vaccinated against pneumococcal diseases? *Expert Rev Respir Med.* 2009;3(6):585-96.
95. Alexandre C, Dubos F, Courouble C, Pruvost I, Varon E, Martinot A. Rebound in the incidence of pneumococcal meningitis in northern France: effect of serotype replacement. *Acta Paediatr.* 2010;99(11):1686-90.
96. Jansen AG, Rodenburg GD, van der Ende A, van Alphen L, Veenhoven RH, Spanjaard L, et al. Invasive pneumococcal disease among adults: associations among serotypes, disease characteristics, and outcome. *Clin Infect Dis.* 2009;49(2):e23-9.
97. Harboe ZB, Benfield TL, Valentiner-Branth P, Hjuler T, Lambertsen L, Kaltoft M, et al. Temporal trends in invasive pneumococcal disease and pneumococcal serotypes over 7 decades. *Clin Infect Dis.* 2010;50(3):329-37.
98. 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 Jan;30(1):100-21.
99. Pérez-Trallero E, Marimón JM, Ercibengoa M, Vicente D, Pérez-Yarza EG. Invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in children and older adults in the north of Spain before and after the introduction of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009;28(7):731-8.
100. Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet.* 2011;378(9807):1962-73.

101. Nunes MC, Madhi SA. Safety, immunogenicity and efficacy of pneumococcal conjugate vaccine in HIV-infected individuals. *Hum Vaccin Immunother.* 2012;8(2):161-73.
102. Dransfield MT, Harnden S, Burton RL, Albert RK, Bailey WC, Casaburi R, et al. Long-term comparative immunogenicity of protein conjugate and free polysaccharide pneumococcal vaccines in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Infect Dis.* 2012;55(5):e35-44.
103. Tsigrelis C, Tleyjeh IM, Lahr BD, Nyre LM, Virk A, Baddour LM. Decreases in case-fatality and mortality rates for invasive pneumococcal disease in Olmsted County, Minnesota, during 1995-2007: A population-based study. *Clin Infect Dis.* 2008;47(11):1367-71.
104. Albrich WC, Baughman W, Schmotzer B, Farley MM. Changing characteristics of invasive pneumococcal disease in Metropolitan Atlanta, Georgia, after introduction of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Infect Dis.* 2007;44(12):1569-76.
105. Hanquet G, Kissling E, Fenoll A, George R, Lepoutre A, Lernout T, et al. Pneumococcal serotypes in children in 4 European countries. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(9):1428-39.
106. Salleras L, Domínguez A, Ciruela P, Izquierdo C, Borrás E. Impacto de la vacuna neumocócica conjugada heptavalente en una población con valores bajos-intermedios de vacunación. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(5):275-7.
107. Fitzwater SP, Chandran A, Santosham M, Johnson HL. The worldwide impact of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31(5):501-8.
108. Black S, Shinefield H. Safety and efficacy of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine: evidence from Northern California. *Eur J Pediatr.* 2002;161 Suppl 2:S127-31.
109. Pilishvili T, Lexau C, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, et al. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *J Infect Dis.* 2010;201(1):32-41.

110. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Lynfield R, et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med.* 2003;348(18):1737-46.
111. 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.
112. Xue L, Yao K, Xie G, Zheng Y, Wang C, Shang Y, et al. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates that cause invasive disease among Chinese children. *Clin Infect Dis.* 2010;50(5):741-4.
113. 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.
114. Hsu KK, Shea KM, Stevenson AE, Pelton SI. Changing serotypes causing childhood invasive pneumococcal disease: Massachusetts, 2001-2007. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29(4):289-93.
115. Yildirim I, Hanage WP, Lipsitch M, Shea KM, Stevenson A, Finkelstein J, et al. Serotype specific invasive capacity and persistent reduction in invasive pneumococcal disease. *Vaccine.* 2011;29(2):283-8.
116. Artiles F, Horcajada I, Canas AM, Álamo I, Bordes A, González A, et al. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad neumocócica invasiva antes y después del uso de la vacuna neumocócica conjugada en Gran Canaria. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(1):14-21.
117. Ardanuy C, Tubau F, Pallarés R, Calatayud L, Domínguez MA, Rolo D, et al. Epidemiology of invasive pneumococcal disease among adult patients in Barcelona before and after pediatric 7-valent pneumococcal conjugate vaccine introduction, 1997-2007. *Clin Infect Dis.* 2009;48(1):57-64.
118. DXIXSP. A enfermidade pneumocócica invasora en Galicia: 2004-2006. *Boletín epidemiolóxico de Galicia.* 2007;XX(2):4.

119. 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):429-36.
120. Dagan R, Givon-Lavi N, Leibovitz E, Greenberg D, Porat N. Introduction and proliferation of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A clones that cause acute otitis media in an unvaccinated population. *J Infect Dis*. 2009;199(6):776-85.
121. Flannery B, Heffernan RT, Harrison LH, Ray SM, Reingold AL, Hadler J, et al. Changes in invasive Pneumococcal disease among HIV-infected adults living in the era of childhood pneumococcal immunization. *Ann Intern Med*. 2006;144(1):1-9.
122. Kyaw MH, Rose CE, Jr., Fry AM, Singleton JA, Moore Z, Zell ER, et al. The influence of chronic illnesses on the incidence of invasive pneumococcal disease in adults. *J Infect Dis*. 2005;192(3):377-86.
123. Picazo J, Ruíz-Contreras J, Hernández B, Sanz F, Gutiérrez 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.
124. Beall BW, Gertz RE, Hulkower RL, Whitney CG, Moore MR, Brueggemann AB. Shifting genetic structure of invasive serotype 19A pneumococci in the United States. *J Infect Dis*. 2011;203(10):1360-8.
125. 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, 2005. *J Infect Dis*. 2008;197(7):1016-27.
126. Jacobs MR, Good CE, Bajaksouzian S, Windau AR. Emergence of *Streptococcus pneumoniae* serotypes 19A, 6C, and 22F and serogroup 15 in Cleveland, Ohio, in relation to introduction of the protein-conjugated pneumococcal vaccine. *Clin Infect Dis*. 2008;47(11):1388-95.

127. Tarragó D, Aguilar L, García R, Giménez MJ, Granizo JJ, Fenoll A. Evolution of clonal and susceptibility profiles of serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* among invasive isolates from children in Spain (1990-2008). *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55 (5):2297-302.
128. Shin J, Baek JY, Kim SH, Song JH, Ko KS. Predominance of ST320 among *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A isolates from 10 Asian countries. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(5):1001-4.
129. Shouval DS, Porat N, Dagan R, Keller N, Bilavsky E, Sivan Y, et al. Bacteremia caused by a highly-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A circulating in a daycare center. *Int J Infect Dis.* 2010;14 (Suppl 3):e253-5.
130. Farrell DJ, Klugman KP, Pichichero M. Increased antimicrobial resistance among nonvaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* in the pediatric population after the introduction of 7-valent pneumococcal vaccine in the United States. *Pediatr Infect Dis J.* 2007;26(2):123-8.
131. Hanage WP, Huang SS, Lipsitch M, Bishop CJ, Godoy D, Pelton SI, et al. Diversity and antibiotic resistance among nonvaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* carriage isolates in the post-heptavalent conjugate vaccine era. *J Infect Dis.* 2007;195(3):347-52.
132. Black S, Shinefield H, Fireman B, Lewis E, Ray P, Hansen JR, et al. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *Pediatr Infect Dis J.* 2000;19(3):187-95.
133. Giebink GS, Meier JD, Quartey MK, Liebler CL, Le CT. Immunogenicity and efficacy of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide-protein conjugate vaccines against homologous and heterologous serotypes in the chinchilla otitis media model. *J Infect Dis.* 1996;173(1):119-27.
134. Whitney CG, Pilishvili T, Farley MM, Schaffner W, Craig AS, Lynfield R, et al. Effectiveness of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease: a matched case-control study. *Lancet.* 2006;368(9546):1495-502.

135. Jacobs MR, Koornhof HJ, Robins-Browne RM, Stevenson CM, Vermaak ZA, Freiman I, et al. Emergence of multiply resistant pneumococci. *N Engl J Med*. 1978;299(14):735-40.
136. Choi EH, Kim SH, Eun BW, Kim SJ, Kim NH, Lee J, et al. Streptococcus pneumoniae serotype 19A in children, South Korea. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(2):275-81.
137. Gardner P, Schaffner W. Immunization of adults. *N Engl J Med*. 1993;328(17):1252-8.
138. Lujan M, Gallego M, Belmonte Y, Fontanals D, Valles J, Lisboa T, et al. Influence of pneumococcal serotype group on outcome in adults with bacteraemic pneumonia. *Eur Respir J*. 2010;36(5):1073-9.
139. Jover F, Cuadrado JM, Andreu L, Martínez S, Cañizares R, de la Tabla VO, et al. A comparative study of bacteremic and non-bacteremic pneumococcal pneumonia. *Eur J Intern Med*. 2008;19(1):15-21.
140. Berjahn CM, Fishman NO, Joffe MM, Edelstein PH, Metlay JP. Treatment and outcomes for patients with bacteremic pneumococcal pneumonia. *Medicine (Baltimore)*. 2008;87(3):160-6.
141. Bigham M, Patrick DM, Bryce E, Champagne S, Shaw C, Wu W, et al. Epidemiology, antibiotic susceptibility, and serotype distribution of Streptococcus pneumoniae associated with invasive pneumococcal disease in British Columbia. A call to strengthen public health pneumococcal immunization programs. *Can J Infect Dis*. 2003;14(5):261-6.
142. Alane SR, McGee L, Jackson D, Chiou CC, Feldman C, Morris AJ, et al. Association of serotypes of Streptococcus pneumoniae with disease severity and outcome in adults: an international study. *Clin Infect Dis*. 2007;45(1):46-51.
143. Scarborough M, Gordon SB, Whitty CJ, French N, Njalale Y, Chitani A, et al. Corticosteroids for bacterial meningitis in adults in sub-Saharan Africa. *N Engl J Med*. 2007;357(24):2441-50.
144. Picazo J, Ruíz-Contreras J, Casado-Flores J, Giangaspro E, Del Castillo F, Hernández-Sampelayo T, et al. 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.

145. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Clin Infect Dis.* 2007;44(s2):S27-S72.

146. Falguera M, Trujillano J, Caro S, Menéndez R, Carratalá J, Ruíz-González A, et al. A prediction rule for estimating the risk of bacteremia in patients with community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2009;49(3):409-16.

147. Musher DM, Alexandraki I, Graviss EA, Yanbey N, Eid A, Inderias LA, et al. Bacteremic and nonbacteremic pneumococcal pneumonia. A prospective study. *Medicine (Baltimore).* 2000;79(4):210-21.

148. Marrie TJ. Blood cultures in ambulatory patients who are discharged from emergency with community-acquired pneumonia. *Can J Infect Dis.* 2004;15(1):21-4.

149. Light RW, Girard WM, Jenkinson SG, George RB. Parapneumonic effusions. *Am J Med.* 1980;69(4):507-12.

150. Domínguez J, Gali N, Blanco S, Pedroso P, Prat C, Matas L, et al. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen by a rapid immunochromatographic assay in urine samples. *Chest.* 2001;119(1):243-9.

151. Gutiérrez F, Mar M, Rodríguez JC, Ayelo A, Soldán B, Cebrián L, et al. Evaluation of the immunochromatographic Binax NOW Assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen in a prospective study of community-acquired pneumonia in Spain. *Clin Infect Dis.* 2003;36(3):286-92.

152. Martínez Vázquez C, Pedreira JD, Cabre-Verdiel J, Miquel C, de Buen ML, Gallart MT, et al. Diagnóstico etiológico de la neumonía neumocócica por contrainmunolectroforesis. *Med Clin (Barc).* 1979;73(8):324-6.

153. Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, et al. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis*. 2004;39(9):1267-84.
154. Kanakadandi V, Annapureddy N, Agarwal SK, Sabharwal MS, Ammakkanavar N, Simoes P, et al. The Austrian syndrome: a case report and review of the literature. *Infection*. 2012;[Epub ahead of print].
155. Muñoz P, Sáinz J, Rodríguez-Creixems M, Santos J, Alcalá L, Bouza E. Austrian syndrome caused by highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis*. 1999;29(6):1591-2.
156. Rueda AM, Serpa JA, Matloobi M, Mushtaq M, Musher DM. The spectrum of invasive pneumococcal disease at an adult tertiary care hospital in the early 21st century. *Medicine (Baltimore)*. 2010;89(5):331-6.
157. Gutiérrez Rodríguez MA, González AV, Gavín MA, Martínez FM, Marín NG, Blázquez BR, et al. Invasive pneumococcal disease: association between serotype, clinical presentation and lethality. *Vaccine*. 2011;29(34):5740-6.
158. Byington CL, Samore MH, Stoddard GJ, Barlow S, Daly J, Korgenski K, et al. Temporal trends of invasive disease due to *Streptococcus pneumoniae* among children in the intermountain west: emergence of nonvaccine serogroups. *Clin Infect Dis*. 2005;41(1):21-9.
159. Díez-Domingo J, Pereiro I, Morant A, Gimeno C, Lerma M, Oyáñez I, et al. Epidemiology of invasive streptococcus pneumoniae infections in children in Spain, 1996-1998. *J Infect*. 2002;45(3):139-43.
160. Renko M, Kukkola HL, Kauma H, Tapiainen T, Kaijalainen T, Uhari M. Comparison of the severity and outcome of invasive pneumococcal infections in children and adults. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(7):785-8.
161. Givner LB, Mason EO, Tan TQ, Barson WJ, Schutze GE, Wald ER, et al. Pneumococcal endocarditis in children. *Clin Infect Dis*. 2004 May 1, 2004;38(9):1273-8.

162. Aronin SI, Mukherjee SK, West JC, Cooney EL. Review of pneumococcal endocarditis in adults in the penicillin era. *Clin Infect Dis.* 1998;26(1):165-71.
163. Martínez E, Miró JM, Almirante B, Aguado JM, Fernández-Viladrich P, Guerrero MLF, et al. Effect of penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* on the presentation, prognosis, and treatment of pneumococcal endocarditis in adults. *Clin Infect Dis.* 2002;35(2):130-9.
164. Morita H, Misawa Y, Oki S, Saito T. Infection of pacemaker lead by penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2011;17(3):313-5.
165. Ross JJ, Saltzman CL, Carling P, Shapiro DS. Pneumococcal septic arthritis: Review of 190 cases. *Clin Infect Dis.* 2003;36(3):319-27.
166. Pazos N, Argibay A, Maure B, Sopeña B, Martínez Vázquez C. Manejo exitoso conservador de prótesis osteoarticular infectada por vía hematogena tardía por *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Clin Esp.* 2008;208(1):60-1.
167. Turner DPJ, Weston VC, Ispahani P. *Streptococcus pneumoniae* spinal infection in Nottingham, United Kingdom: not a rare event. *Clin Infect Dis.* 1999;28(4):873-81.
168. García-Lechuz J, Cuevas O, Castellares C, Pérez-Fernández C, Cercenado E, Bouza E, et al. *Streptococcus pneumoniae*; skin and soft tissue infections: characterization of causative strains and clinical illness. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007;26(4):247-53.
169. Grigoriadis E, Gold WL. Pyogenic brain abscess caused by *Streptococcus pneumoniae*: case report and review. *Clin Infect Dis.* 1997;25(5):1108-12.
170. Waisman DC, Tyrrell GJ, Kellner JD, Garg S, Marrie TJ. Pneumococcal peritonitis: Still with us and likely to increase in importance. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2010;21(1):e23-7.
171. Fenoll A, Aguilar L, Vicioso MD, Giménez MJ, Robledo O, Granizo JJ, et al. Serotype distribution and susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolates from pleural fluid in Spain from 1997 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(12):5387-90.

172. Hsu HE, Shutt KA, Moore MR, Beall BW, Bennett NM, Craig AS, et al. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. *N Engl J Med*. 2009;360(3):244-56.
173. Campos J, Ferech M, Lazaro E, de Abajo F, Oteo J, Stephens P, et al. Surveillance of outpatient antibiotic consumption in Spain according to sales data and reimbursement data. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60(3):698-701.
174. López R, Ronda C, García E. Autolysins are directly involved in the bactericidal effect caused by penicillin in wild type and in tolerant pneumococci. *FEMS Microbiol Lett*. 1990;54(1-3):317-22.
175. Hakenbeck R, Ellerbrok H, Briese T, Handwerker S, Tomasz A. Penicillin-binding proteins of penicillin-susceptible and -resistant pneumococci: immunological relatedness of altered proteins and changes in peptides carrying the beta-lactam binding site. *Antimicrob Agents Chemother*. 1986;30(4):553-8.
176. Liñares J, Alonso T, Pérez JL, Ayats J, Domínguez MA, Pallarés R, et al. Decreased susceptibility of penicillin-resistant pneumococci to twenty-four beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 1992;30(3):279-88.
177. Wayne P. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Nineteenth informational supplement. CLSI document M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009.
178. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2011.
179. Liñares J, Ardanuy C, Pallarés R, Fenoll A. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(5):402-10.
180. Felmingham D, White AR, Jacobs MR, Appelbaum PC, Poupard J, Miller LA, et al. The Alexander Project: the benefits from a decade of surveillance. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56 Suppl 2:ii3-ii21.

181. European antimicrobial resistance surveillance system (EARSS). [cited 20 de octubre de 2011]; Available from.
182. Klugman KP. Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3(2):171-96.
183. Perez-Trallero E, Fernandez-Mazarrasa C, Garcia-Rey C, Bouza E, Aguilar L, Garcia-de-Lomas J, et al. Antimicrobial susceptibilities of 1,684 *Streptococcus pneumoniae* and 2,039 *Streptococcus pyogenes* isolates and their ecological relationships: results of a 1-year (1998-1999) multicenter surveillance study in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Dec;45(12):3334-40.
184. Felmingham D, Canton R, Jenkins SG. Regional trends in beta-lactam, macrolide, fluoroquinolone and telithromycin resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates 2001-2004. *J Infect.* 2007;55(2):111-8.
185. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Lexau C, Reingold A, et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med.* 2000;343(26):1917-24.
186. Kyaw MH, Lynfield R, Schaffner W, Craig AS, Hadler J, Reingold A, et al. Effect of introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med.* 2006;354(14):1455-63.
187. Lonks JR, Garau J, Gómez L, Xercavins M, Ochoa de Echaguen A, Gareen IF, et al. Failure of macrolide antibiotic treatment in patients with bacteremia due to erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis.* 2002;35(5):556-64.
188. Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Felmingham D. Molecular characterization of macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolated from the PROTEKT 1999-2000 study. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50 Suppl S1:39-47.
189. Liu Z, Nachamkin I, Edelstein PH, Lautenbach E, Metlay JP. Serotype emergence and genotype distribution among macrolide-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in the postconjugate vaccine (PCV-7) era. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(2):743-50.

190. Farrell DJ, Jenkins SG, Brown SD, Patel M, Lavin BS, Klugman KP. Emergence and spread of *Streptococcus pneumoniae* with *erm(B)* and *mef(A)* resistance. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(6):851-8.
191. Reinert RR, Filimonova OY, Al-Lahham A, Grudinina SA, Ilna EN, Weigel LM, et al. Mechanisms of macrolide resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates from Russia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(6):2260-2.
192. Shin JH, Jung HJ, Kim HR, Jeong J, Jeong SH, Kim S, et al. Prevalence, characteristics, and molecular epidemiology of macrolide and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* at five tertiary-care hospitals in Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(7):2625-7.
193. Chen DK, McGeer A, de Azavedo JC, Low DE. Decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. *Canadian Bacterial Surveillance Network. N Engl J Med.* 1999;341(4):233-9.
194. Liñares J, de la Campa AG, Pallarés R. Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med.* 1999;341(20):1546-7.
195. Rodríguez-Avial I, Ramos B, Ríos E, Cercenado E, Ordobas M, Sanz JC. Clonal Spread of Levofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae* Invasive Isolates in Madrid, Spain (2007-2009). *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(5):2469-71.
196. Bolon MK. The newer fluoroquinolones. *Infect Dis Clin North Am.* 2009;23(4):1027-51.
197. Hawkey PM. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(suppl 1):29-35.
198. Jones RN, Pfaller MA. Can antimicrobial susceptibility testing results for ciprofloxacin or levofloxacin predict susceptibility to a newer fluoroquinolone, gatifloxacin?: Report from The SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-99). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2001;39(4):237-43.
199. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis.* 2005;41(S2):S120-S6.

200. Pan XS, Ambler J, Mehtar S, Fisher LM. Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(10):2321-6.
201. Brueggemann AB, Coffman SL, Rhomberg P, Huynh H, Almer L, Nilius A, et al. Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* in United States since 1994-1995. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(3):680-8.
202. Davies TA, Evangelista A, Pflieger S, Bush K, Sahn DF, Goldschmidt R. Prevalence of single mutations in topoisomerase type II genes among levofloxacin-susceptible clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated in the United States in 1992 to 1996 and 1999 to 2000. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(1):119-24.
203. Lim S, Bast D, McGeer A, de Azavedo J, Low DE. Antimicrobial susceptibility breakpoints and first-step *parC* mutations in *Streptococcus pneumoniae*: redefining fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(7):833-7.
204. de Cueto M, Rodríguez JM, Soriano MJ, López-Cerero L, Venero J, Pascual A. Fatal levofloxacin failure in treatment of a bacteremic patient infected with *Streptococcus pneumoniae* with a preexisting *parC* mutation. *J Clin Microbiol.* 2008;46(4):1558-60.
205. Richter SS, Heilmann KP, Beekmann SE, Miller NJ, Rice CL, Doern GV. The molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* with quinolone resistance mutations. *Clin Infect Dis.* 2005;40(2):225-35.
206. Zhanel GG, Walkty A, Nichol K, Smith H, Noreddin A, Hoban DJ. Molecular characterization of fluoroquinolone resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates obtained from across Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;45(1):63-7.
207. Morrissey I, George J. Activities of fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* type II topoisomerases purified as recombinant proteins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(11):2579-85.

208. Schurek KN, Adam HJ, Siemens CG, Hoban CJ, Hoban DJ, Zhanel GG. Are fluoroquinolone-susceptible isolates of *Streptococcus pneumoniae* really susceptible? A comparison of resistance mechanisms in Canadian isolates from 1997 and 2003. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(4):769-72.
209. Pletz MW, Shergill AP, McGee L, Beall B, Whitney CG, Klugman KP. Prevalence of first-step mutants among levofloxacin-susceptible invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(4):1561-3.
210. Adam HJ, Schurek KN, Nichol KA, Hoban CJ, Baudry TJ, Laing NM, et al. Molecular characterization of increasing fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates in Canada, 1997 to 2005. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(1):198-207.
211. Bast DJ, Low DE, Duncan CL, Kilburn L, Mandell LA, Davidson RJ, et al. Fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: contributions of type II topoisomerase mutations and efflux to levels of resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(11):3049-54.
212. Louie A, Brown DL, Liu W, Kulawy RW, Deziel MR, Drusano GL. In vitro infection model characterizing the effect of efflux pump inhibition on prevention of resistance to levofloxacin and ciprofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(11):3988-4000.
213. Doern GV, Richter SS, Miller A, Miller N, Rice C, Heilmann K, et al. Antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae* in the United States: have we begun to turn the corner on resistance to certain antimicrobial classes? *Clin Infect Dis.* 2005;41(2):139-48.
214. Ho PL, Yung RW, Tsang DN, Que TL, Ho M, Seto WH, et al. Increasing resistance of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones: results of a Hong Kong multicentre study in 2000. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48(5):659-65.
215. Orr D, Wilkinson P, Moyce L, Martin S, George R, Pichon B. Incidence and epidemiology of levofloxacin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: experience from a tertiary referral hospital in England. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(3):449-52.

216. Wolter N, du Plessis M, von Gottberg A, de Gouveia L, Klugman KP. Molecular characterization of emerging non-levofloxacin-susceptible pneumococci isolated from children in South Africa. *J Clin Microbiol.* 2009;47(5):1319-24.
217. Nichol KA, Adam HJ, Karlowsky JA, Zhanel GG, Hoban DJ. Increasing genetic relatedness of ciprofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated in Canada from 1997 to 2005. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(3):1190-4.
218. de la Campa AG, Ferrándiz MJ, Tubau F, Pallarés R, Manresa F, Liñares J. Genetic characterization of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains isolated during ciprofloxacin therapy from a patient with bronchiectasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(4):1419-22.
219. Osawa M, Ito Y, Ishida T, Imai S, Ichiyama S, Mishima M. Molecular characterization of quinolone resistance-determining regions and their correlation with serotypes and genotypes among *Streptococcus pneumoniae* isolates in Japan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010;29(2):245-8.
220. Ambrose PG, Grasela DM, Grasela TH, Passarell J, Mayer HB, Pierce PF. Pharmacodynamics of fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* in patients with community-acquired respiratory tract infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(10):2793-7.
221. Pérez-Trallero E, Marimón JM, González A, Ercibengoa M, Larruskain J. In vivo development of high-level fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Infect Dis.* 2005;41(4):560-4.
222. Davidson R, Cavalcanti R, Brunton JL, Bast DJ, de Azavedo JC, Kibsey P, et al. Resistance to levofloxacin and failure of treatment of pneumococcal pneumonia. *N Engl J Med.* 2002;346(10):747-50.
223. de la Campa AG, Balsalobre L, Ardanuy C, Fenoll A, Pérez-Trallero E, Liñares J. Fluoroquinolone resistance in penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clones, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(10):1751-9.

224. de la Campa AG, Ardanuy C, Balsalobre L, Pérez-Trallero E, Marimón JM, Fenoll A, et al. Changes in fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* after 7-valent conjugate vaccination, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(6):905-11.
225. Tankovic J, Perichon B, Duval J, Courvalin P. Contribution of mutations in *gyrA* and *parC* genes to fluoroquinolone resistance of mutants of *Streptococcus pneumoniae* obtained in vivo and in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(11):2505-10.
226. Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(11):2562-6.
227. Richardson DC, Bast D, McGeer A, Low DE. Evaluation of susceptibility testing to detect fluoroquinolone resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(6):1911-4.
228. 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.
229. van Belkum A, Sluijter M, de Groot R, Verbrugh H, Hermans PW. Novel BOX repeat PCR assay for high-resolution typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. *J Clin Microbiol*. 1996;34(5):1176-9.
230. Robinson DA, Turner JS, Facklam RR, Parkinson AJ, Breiman RF, Gratten M, et al. Molecular characterization of a globally distributed lineage of serotype 12F *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease. *J Infect Dis*. 1999;179(2):414-22.
231. 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.
232. Domenech J. Macro !NR2IS for SPSS Statistics. Sample Size (Risk) and Power Determination: Two independent samples [computer program]. Bellaterra: Universitat Autònoma de Barcelona. Available at: <http://www.metodo.uab.cat/macros.htm>. ed.

233. DXIXSP. Impacto da vacinación antipneumocócica conxugada en Galiza nos de menos de 5 anos de idade. Boletín epidemiolóxico de Galicia. 2012;XXIV(3):1-21.
234. Andrade AL, Toscano CM, Minamisava R, Costa PS, Andrade JG. Pneumococcal disease manifestation in children before and after vaccination: what's new? Vaccine. 2011;29 Suppl 3:C2-14.
235. Muñoz-Almagro C, Ciruela P, Esteva C, Marco F, Navarro M, Bartolome R, et al. Serotypes and clones causing invasive pneumococcal disease before the use of new conjugate vaccines in Catalonia, Spain. J Infect. 2011;63(2):151-62.
236. Burgos J, Luján M, Falcó V, Sánchez A, Puig M, Borrego A, et al. The spectrum of pneumococcal empyema in adults in the early 21st century. Clin Infect Dis. 2011;53(3):254-61.
237. Calbo E, Valdés E, Ochoa de Echaguen A, Fleites A, Molinos L, Xercavins M, et al. Bacteraemic pneumococcal pneumonia in COPD patients: better outcomes than expected. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009;28(8):971-6.
238. Pérez-Trallero E, Marimón JM, Larruskain J, Alonso M, Ercibengoa M. Antimicrobial susceptibility and serotypes of Streptococcus pneumoniae isolated from elderly patients with pneumonia and acute exacerbation of COPD. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(6):2729-34.
239. Domenech A, Ardanuy C, Calatayud L, Santos S, Tubau F, Grau I, et al. Serotypes and genotypes of Streptococcus pneumoniae causing pneumonia and acute exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. J Antimicrob Chemother. 2011;66(3):487-93.
240. Fine MJ, Smith MA, Carson CA, Mutha SS, Sankey SS, Weissfeld LA, et al. Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia. A meta-analysis. JAMA. 1996;275(2):134-41.
241. Ho PL, Tse WS, Tsang KW, Kwok TK, Ng TK, Cheng VC, et al. Risk factors for acquisition of levofloxacin-resistant Streptococcus pneumoniae: a case-control study. Clin Infect Dis. 2001;32(5):701-7.

242. Pérez-Trallero E, Marimón JM, Iglesias L, Larruskain J. Fluoroquinolone and macrolide treatment failure in pneumococcal pneumonia and selection of multidrug-resistant isolates. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(9):1159-62.
243. Low DE. Quinolone resistance among pneumococci: therapeutic and diagnostic implications. *Clin Infect Dis*. 2004;38 Suppl 4:S357-62.
244. Imaz A, Falcó V, Peñaranda M, Jordano Q, Martínez X, Nadal C, et al. Impact of prior pneumococcal vaccination on clinical outcomes in HIV-infected adult patients hospitalized with invasive pneumococcal disease. *HIV Med*. 2009;10(6):356-63.
245. Siemieniuk RA, Gregson DB, Gill MJ. The persisting burden of invasive pneumococcal disease in HIV patients: an observational cohort study. *BMC Infect Dis*. 2011;11:314.
246. Grau I, Ardanuy C, Liñares J, Podzamczar D, Schulze MH, Pallarés R. Trends in mortality and antibiotic resistance among HIV-infected patients with invasive pneumococcal disease. *HIV Med*. 2009;10(8):488-95.
247. French N, Gordon SB, Mwalukomo T, White SA, Mwafuilirwa G, Longwe H, et al. A trial of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in HIV-infected adults. *N Engl J Med*. 2010;362(9):812-22.
248. Ampofo K, Pavia AT, Chris S, Hersh AL, Bender JM, Blaschke AJ, et al. The changing epidemiology of invasive pneumococcal disease at a tertiary children's hospital through the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine era: a case for continuous surveillance. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(3):228-34.
249. de Sevilla MF, García-García JJ, Esteva C, Moraga F, Hernández S, Selva L, et al. Clinical presentation of invasive pneumococcal disease in Spain in the era of heptavalent conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(2):124-8.
250. Mufson MA, Hao JB, Stanek RJ, Norton NB. Clinical features of patients with recurrent invasive *Streptococcus pneumoniae* disease. *Am J Med Sci*. 2011;343(4):303-9.

251. Méndez Lage S. Laboratorio de Referencia de Neumococos de Galicia. Servicio de Microbiología. Area Sanitaria de Ferrol. 2012.
252. Calbo E, Díaz A, Canadell E, Fábrega J, Uriz S, Xercavins M, et al. Invasive pneumococcal disease among children in a health district of Barcelona: early impact of pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(9):867-72.
253. Brueggemann AB, Peto TE, Crook DW, Butler JC, Kristinsson KG, Spratt BG. Temporal and geographic stability of the serogroup-specific invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children. *J Infect Dis.* 2004;190(7):1203-11.
254. 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.
255. Tleyjeh IM, Tlaygeh HM, Hejal R, Montori VM, Baddour LM. The impact of penicillin resistance on short-term mortality in hospitalized adults with pneumococcal pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2006;42(6):788-97.
256. Vila-Córcoles A, Ochoa-Gondar O, Gómez-Bertomeu F, Raga-Luria X. Invasive pneumococcal disease in Catalanian elderly people, 2002-2009: serotype coverage for different anti-pneumococcal vaccine formulations at the beginning of the new conjugate vaccines era. *Vaccine.* 2011;29(43):7430-4.
257. Pallarés R, Liñares J, Vadillo M, Cabellos C, Manresa F, Viladrich PF, et al. Resistance to penicillin and cephalosporin and mortality from severe pneumococcal pneumonia in Barcelona, Spain. *N Engl J Med.* 1995;333(8):474-80.
258. Moroney JF, Fiore AE, Harrison LH, Patterson JE, Farley MM, Jorgensen JH, et al. Clinical outcomes of bacteremic pneumococcal pneumonia in the era of antibiotic resistance. *Clin Infect Dis.* 2001;33(6):797-805.

259. Jones JL, Hanson DL, Dworkin MS, Alderton DL, Fleming PL, Kaplan JE, et al. Surveillance for AIDS-defining opportunistic illnesses, 1992-1997. *MMWR CDC Surveill Summ.* 1999;48(2):1-22.
260. Metersky ML, Dransfield MT, Jackson LA. Determining the optimal pneumococcal vaccination strategy for adults: is there a role for the pneumococcal conjugate vaccine? *Chest.* 2010;138(3):486-90.
261. de Roux A, Schmöle-Thoma B, Siber GR, Hackell JG, Kühnke A, Ahlers N, et al. Comparison of pneumococcal conjugate polysaccharide and free polysaccharide vaccines in elderly adults: conjugate vaccine elicits improved antibacterial immune responses and immunological memory. *Clin Infect Dis.* 2008;46(7):1015-23.
262. Jackson LA, Neuzil KM, Nahm MH, Whitney CG, Yu O, Nelson JC, et al. Immunogenicity of varying dosages of 7-valent pneumococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine in seniors previously vaccinated with 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. *Vaccine.* 2007;25(20):4029-37.
263. Feikin DR, Elie CM, Goetz MB, Lennox JL, Carlone GM, Romero-Steiner S, et al. Randomized trial of the quantitative and functional antibody responses to a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and/or 23-valent polysaccharide vaccine among HIV-infected adults. *Vaccine.* 2001;20(3-4):545-53.
264. Lesprit P, Pedrono G, Molina JM, Goujard C, Girard PM, Sarrazin N, et al. Immunological efficacy of a prime-boost pneumococcal vaccination in HIV-infected adults. *AIDS.* 2007;21(18):2425-34.
265. Fenoll A, Aguilar L, Giménez MJ, Vicioso MD, Robledo O, Granizo JJ, et al. Susceptibility of recently collected Spanish pneumococci nonsusceptible to oral penicillin from serotypes not included in the 7-valent conjugate vaccine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(6):2696-8.
266. Mufson MA, Stanek RJ. Bacteremic pneumococcal pneumonia in one American City: a 20-year longitudinal study, 1978-1997. *Am J Med.* 1999;107(1A):34S-43S.

267. Martínez JA, Horcajada JP, Almela M, Marco F, Soriano A, García E, et al. Addition of a macrolide to a beta-lactam-based empirical antibiotic regimen is associated with lower in-hospital mortality for patients with bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2003;36(4):389-95.
268. Weiss K, Tillotson GS. The controversy of combination vs monotherapy in the treatment of hospitalized community-acquired pneumonia. *Chest*. 2005;128(2):940-6.
269. Tessmer A, Welte T, Martus P, Schnoor M, Marre R, Suttorp N. Impact of intravenous {beta}-lactam/macrolide versus {beta}-lactam monotherapy on mortality in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(5):1025-33.
270. Metersky ML, Ma A, Houck PM, Bratzler DW. Antibiotics for bacteremic pneumonia: Improved outcomes with macrolides but not fluoroquinolones. *Chest*. 2007;131(2):466-73.
271. Rello J, Catalán M, Díaz E, Bodi M, Álvarez B. Associations between empirical antimicrobial therapy at the hospital and mortality in patients with severe community-acquired pneumonia. *Intensive Care Med*. 2002;28(8):1030-5.
272. Waterer GW, Somes GW, Wunderink RG. Monotherapy may be suboptimal for severe bacteremic pneumococcal pneumonia. *Arch Intern Med*. 2001;161(15):1837-42.
273. Baddour LM, Yu VL, Klugman KP, Feldman C, Ortqvist A, Rello J, et al. Combination antibiotic therapy lowers mortality among severely ill patients with pneumococcal bacteremia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(4):440-4.
274. Mufson MA, Stanek RJ. Revisiting combination antibiotic therapy for community-acquired invasive *Streptococcus pneumoniae* pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2006;42(2):304-6.
275. Olive D, Georges H, Devos P, Boussekey N, Chiche A, Meybeck A, et al. Severe pneumococcal pneumonia: impact of new quinolones on prognosis. *BMC Infect Dis*. 2011;11:66.

276. Bartlett JG, Dowell SF, Mandell LA, File Jr TM, Musher DM, Fine MJ. Practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2000;31(2):347-82.
277. Imöhl M, Reinert RR, Mutscher C, van der Linden M. Macrolide susceptibility and serotype specific macrolide resistance of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Germany from 1992 to 2008. *BMC Microbiol*. 2010;10:299-308.
278. 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.
279. Henderson KL, Muller-Pebody B, Blackburn RM, Johnson AP. Reduction in erythromycin resistance in invasive pneumococci from young children in England and Wales. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(2):369-70.
280. Stephens DS, Zughaier SM, Whitney CG, Baughman WS, Barker L, Gay K, et al. Incidence of macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* after introduction of the pneumococcal conjugate vaccine: population-based assessment. *Lancet*. 2005;365(9462):855-63.
281. Calatayud L, Ardanuy C, Tubau F, Rolo D, Grau I, Pallarés R, et al. Serotype and genotype replacement among macrolide-resistant invasive Pneumococci in adults: mechanisms of resistance and association with different transposons. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1310-6.
282. McGee L, Klugman KP, Wasas A, Capper T, Brink A. Serotype 19F multiresistant pneumococcal clone harboring two erythromycin resistance determinants (*erm(B)* and *mef(A)*) in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(5):1595-8.
283. Zhou L, Ma X, Gao W, Yao KH, Shen AD, Yu SJ, et al. Molecular characteristics of erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from pediatric patients younger than five years in Beijing, 2010. *BMC Microbiol*. 2012;12(1):228.

284. Pletz MW, McGee L, Jorgensen J, Beall B, Facklam RR, Whitney CG, et al. Levofloxacin-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in the United States: evidence for clonal spread and the impact of conjugate pneumococcal vaccine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(9):3491-7.
285. Hsieh YC, Chang LY, Huang YC, Lin HC, Huang LM, Hsueh PR. Circulation of international clones of levofloxacin non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* in Taiwan. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(7):973-8.
286. Fuller JD, Low DE. A review of *Streptococcus pneumoniae* infection treatment failures associated with fluoroquinolone resistance. *Clin Infect Dis*. 2005;41(1):118-21.
287. Anderson KB, Tan JS, File TM, Jr., DiPersio JR, Willey BM, Low DE. Emergence of levofloxacin-resistant pneumococci in immunocompromised adults after therapy for community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2003;37(3):376-81.
288. Pletz MW, van der Linden M, von Baum H, Duesberg CB, Klugman KP, Welte T. Low prevalence of fluoroquinolone resistant strains and resistance precursor strains in *Streptococcus pneumoniae* from patients with community-acquired pneumonia despite high fluoroquinolone usage. *Int J Med Microbiol*. 2011;301(1):53-7.
289. Smith HJ, Noreddin AM, Siemens CG, Schurek KN, Greisman J, Hoban CJ, et al. Designing fluoroquinolone breakpoints for *Streptococcus pneumoniae* by using genetics instead of pharmacokinetics-pharmacodynamics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(9):3630-5.
290. Schurek KN, Adam HJ, Hoban DJ, Zhanel GG. Call for the international adoption of microbiological breakpoints for fluoroquinolones and *Streptococcus pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;28(3):266-9.
291. Hicks LA, Chien YW, Taylor TH, Jr., Haber M, Klugman KP. Outpatient antibiotic prescribing and nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 1996-2003. *Clin Infect Dis*. 2011;53(7):631-9.

292. Aspa J, Rajas O, Rodríguez de Castro F, Blanquer J, Zalacain R, Fenoll A, et al. Drug-resistant pneumococcal pneumonia: clinical relevance and related factors. *Clin Infect Dis*. 2004;38(6):787-98.
293. von Gottberg A, Klugman KP, Cohen C, Wolter N, de Gouveia L, du Plessis M, et al. Emergence of levofloxacin-non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* and treatment for multidrug-resistant tuberculosis in children in South Africa: a cohort observational surveillance study. *Lancet*. 2008;371(9618):1108-13.
294. Aspa J, Rajas O, Rodríguez de Castro F, Huertas MC, Borderías L, Cabello FJ, et al. Impact of initial antibiotic choice on mortality from pneumococcal pneumonia. *Eur Respir J*. 2006;27(5):1010-9.
295. Arístegui J, Bernaola E, Pocheville I, García C, Arranz L, Durán 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.
296. Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Beekmann SE, Doern GV. Changing epidemiology of antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 2004-2005. *Clin Infect Dis*. 2009;48(3):e23-33.
297. Brueggemann AB, Pai R, Crook DW, Beall B. Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. *PLoS Pathog*. 2007;3(11):e168.
298. Marimón JM, Alonso M, Rolo D, Ardanuy C, Liñares J, Pérez-Trallero E. Molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* invasive serotype 19A isolates from adults in two Spanish regions (1994-2009). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;31(6):1009-13.