

# TESIS DOCTORAL



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

**Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública**

## **EPIDEMIOLOGÍA DE LA CONJUNTIVITIS NEUMOCÓCICA EN GIPUZKOA: ESTUDIO DE 777 EPISODIOS (1999-2013)**

Marta Alonso Asencor

Donostia, 2016

## **Agradecimientos**

El más sincero agradecimiento a mi director de Tesis, el Dr. Emilio Pérez-Trallero, Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Donostia y Catedrático de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad del País Vasco, por la confianza depositada en mi para la realización de este trabajo, por su implicación y ayuda recibida de su parte durante todos estos años. Muchas gracias por tu absoluta disponibilidad para solventar o discutir cualquier duda o problema y por todo lo aprendido en cada una de las revisiones del trabajo.

Al Dr. Txema Marimón, codirector de Tesis, por su estímulo continuo para que este trabajo viera la luz. Te agradezco todo el tiempo que le has dedicado, y toda la ayuda y asesoramiento recibido tanto en la lectura crítica como en el trabajo de laboratorio.

A mis compañeras y amigas del txoko de investigación, por su incondicional acogida desde el primer día, por los ánimos y consejos recibidos. Tengo la suerte de poder contar con un equipo humano muy generoso.

A la Dra. María Ercibengoa, excepcional compañera de trabajo con la que he compartido muchas horas de poyata. Gracias María por toda tu ayuda en la caracterización de las cepas, por estar siempre dispuesta a echar un cable y ser tan generosa al compartir todos tus conocimientos sobre el “neumo”.

A Esther Moreiro por su valiosa ayuda en la edición de esta tesis. Al Dr. Txema García Arenzana por su activa colaboración en la recopilación de las cepas. Recuerdo y agradezco también al Dr. José Luis del Pozo todo lo que me enseñó en los primeros trabajos de investigación durante mi periodo de residencia en la CUN, me ha resultado de gran utilidad en trabajos posteriores.

Muchas gracias a todo el personal del Servicio de Microbiología por el cariño y ánimo recibido. Eskerrik asko bihotz-bihotzez!



# ÍNDICE

<b>1.INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción general.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Generalidades de las infecciones oftálmicas bacterianas .....</b>	<b>4</b>
1.1.1. Conjuntivitis .....	6
1.1.1.1. Generalidades.....	6
1.1.1.2. Manifestaciones clínicas.....	7
1.1.1.3. Etiología infecciosa de la conjuntivitis bacteriana .....	8
1.1.1.4. Diagnóstico de la conjuntivitis bacteriana .....	9
1.1.1.5. Tratamiento de la conjuntivitis bacteriana.....	10
1.1.2. Otras infecciones oftálmicas bacterianas .....	11
1.1.2.1. Queratitis .....	11
1.1.2.2. Endoftalmitis.....	13
1.1.2.3. Infecciones en estructuras anexas al ojo.....	15
<b>1.2. Generalidades de la infección por <i>S. pneumoniae</i> .....</b>	<b>16</b>
<b>1.3. Neumococo. Aspectos microbiológicos .....</b>	<b>18</b>
1.3.1. Antecedentes históricos de <i>S. pneumoniae</i> .....	18
1.3.2. <i>S. pneumoniae</i> : características microbiológicas .....	20
1.3.2.1. Características estructurales y factores de virulencia .....	23
1.3.3. Ecología: portación nasofaríngea.....	27
1.3.4. Tipificado y caracterización molecular .....	28
1.3.4.1. Tipificado convencional .....	28
1.3.4.2. Tipificado mediante técnicas moleculares .....	30
1.3.4.3. Caracterización molecular: PGFE y MLST .....	30
<b>1.4. Prevalencia y mecanismos de resistencia a antibióticos .....</b>	<b>33</b>
1.4.1. Resistencia a beta-lactámicos .....	33
1.4.2. Resistencia a fluoroquinolonas .....	34
1.4.3. Resistencia a macrólidos .....	35
1.4.4. Resistencia a tetraciclinas.....	36
1.4.5. Resistencia a cloranfenicol .....	37

1.4.6. Resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol.....	37
1.4.7. Resistencia a glucopéptidos .....	38
<b>1.5. Cepas acapsuladas de neumococo .....</b>	<b>39</b>
<b>1.6. Vacunas antineumocócicas .....</b>	<b>41</b>
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
<b>3.1 Área geográfica.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2. Muestras estudiadas y diseño del estudio.....</b>	<b>52</b>
<b>3.3. Detección e identificación de <i>S. pneumoniae</i> .....</b>	<b>53</b>
3.3.1 Prueba de sensibilidad a optoquina .....	53
<b>3.4. Medio de transporte y congelación .....</b>	<b>54</b>
<b>3.5 Sensibilidad antibiótica. ....</b>	<b>54</b>
3.5.1 Determinación de la susceptibilidad mediante difusión en disco .....	54
3.5.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	55
<b>3.6. Serotificado.....</b>	<b>55</b>
3.6.1. Reacción de Quellung.....	55
3.6.2. Serotificado mediante Pneumoarray® .....	57
3.6.3. Tipificado mediante Multiplex-PCR .....	59
3.6.4. Detección del gen capsular ( <i>cpsA</i> ), gen de la autolisina ( <i>lytA</i> ) y neumolisina ( <i>ply</i> ) mediante PCR.....	61
<b>3.7. Caracterización genotípica .....</b>	<b>62</b>
3.7.1. PFGE .....	62
3.7.2. MLST .....	64
<b>3.8. Análisis estadístico.....</b>	<b>64</b>
<b>3.9. Soporte Informático .....</b>	<b>65</b>
<b>4.RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
<b>4.1. Características generales de la muestra original .....</b>	<b>69</b>
<b>4.3. Caracterización de las cepas de <i>S. pneumoniae</i> .....</b>	<b>73</b>
4.3.1. Distribución global de los serotipos .....	73

4.3.1.1. Serotipos vacunales .....	76
4.3.1.2. Serotipos no vacunales (no incluidos en VNC13).....	82
<b>4.4. Conjuntivitis causadas por cepas acapsuladas.....</b>	<b>84</b>
4.4.1. Prevalencia de cepas acapsuladas .....	84
4.4.1.1. Situación particular del año 2006.....	84
4.4.1.2. Distribución por grupos de edad de las conjuntivitis causadas por cepas acapsuladas	85
4.4.2. Genotipos: PFGE y MLST de las cepas acapsuladas.....	86
4.4.2.1. Dinámicas y características de los tres principales complejos clonales: CC448, CC941 y CC344 .....	88
<b>4.5. Estudio de la susceptibilidad antimicrobiana.....</b>	<b>92</b>
4.5.1. Resistencia global .....	92
4.5.2. Susceptibilidad antimicrobiana de los serotipos vacunales .....	95
4.5.2.1. Resistencia de los serotipos incluidos en la VNC7 y VNC13 .....	95
4.5.3. Susceptibilidad antimicrobiana del resto de neumococos .....	98
4.5.3.1. Resistencia de los neumococos capsulados de serotipos no incluidos en VNC13.....	98
4.5.3.2. Resistencia en cepas acapsuladas.....	100
<b>4.5. Recurrencias: reinfecciones y recaídas.....</b>	<b>102</b>
<b>4.6. Conjuntivitis neumocócicas mixtas. Coinfecciones .....</b>	<b>104</b>
4.6.1. Infecciones mixtas (coinfecciones) con <i>H. influenzae</i> .....	108
<b>4.7. Endoftalmitis.....</b>	<b>109</b>
<b>4.8. Queratitis y dacriocistitis .....</b>	<b>110</b>
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>113</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>139</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>143</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>157</b>



## **Abreviaturas:**

ADN: Ácido desoxirribonucleico

BHI: Brain heart infusion

CC: Complejo clonal

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI: Concentración mínima inhibitoria

DHFR: Dihidrofolato reductasa

DHPS: Dihidropteroato sintetasa

DLV: Double locus variant

DO: Densidad óptica

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

MLST: Multilocus sequence typing

PBP: Penicillin binding proteins

PFGE: Electroforesis en gel de campo pulsante

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

ST: Secuenciotipo

SXT: Trimetoprim-sulfametoxazol o cotrimoxazol

TSA: Tripticasa de Soja

TE: Tris-EDTA

VNC7: Vacuna neumocócica conjugada 7-valente

VNC13: Vacuna neumocócica conjugada 13-valente



# **1.INTRODUCCIÓN**



### **Introducción general**

Dentro de las infecciones oculares, la conjuntivitis es la patología que genera una mayor demanda de atención sanitaria y representa una de las causas principales de consulta médica en la población general. La etología de las conjuntivitis varía con la edad, siendo la conjuntivitis bacteriana una entidad que predomina en la edad pediátrica. A pesar de ser muchas las bacterias que pueden causar conjuntivitis, *Streptococcus pneumoniae* es una de las más habituales.

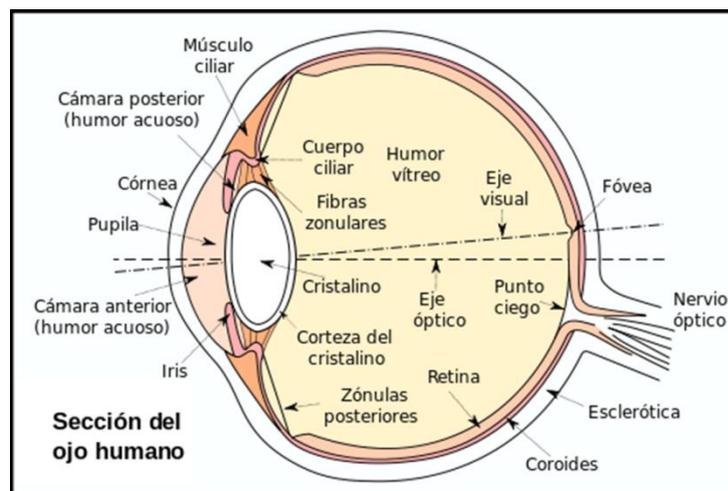
*S. pneumoniae* es un patógeno capaz de causar un amplio rango de enfermedades, desde las formas más graves como la meningitis o la neumonía bacteriémica a otras más benignas y de buen pronóstico, como la otitis o la conjuntivitis. Entre los neumococos causantes de conjuntivitis, una proporción elevada de ellos son cepas que no tienen la cápsula polisacárida; factor de virulencia principal y estructura externa característica de los neumococos causantes de enfermedad invasiva. Estos neumococos atípicos acapsulados se han descrito fundamentalmente causando brotes, aunque se debe suponer que su papel como causa de conjuntivitis esporádica debe ser también importante.

Debido a la gravedad de las formas invasivas de la enfermedad neumocócica, a principios del siglo XXI se comercializaron las primeras vacunas de polisacáridos conjugados, con actividad frente a un número limitado de serotipos de neumococo que eran activas en niños pequeños (grupo de edad con alta incidencia de infecciones graves). Estas vacunas, además de prevenir las formas graves causadas por los serotipos que incluían, prevenían la portación nasofaríngea de los mismos disminuyendo también su prevalencia en infecciones menos graves como la otitis.

El tratamiento de las conjuntivitis neumocócicas es fundamentalmente tópico, siendo anecdótico los casos de fallo en el tratamiento. Sin embargo, las infecciones neumocócicas de otras estructuras más internas del ojo pueden suponer la pérdida de la visión, por lo que el conocimiento de la susceptibilidad antibiótica de los aislamientos oculares es importante para poder establecer un tratamiento empírico inmediato y bien dirigido.

## **1.1. Generalidades de las infecciones oftálmicas bacterianas**

El aparato visual se compone por ambos globos oculares (órgano de la visión), las vías ópticas y los centros de la visión. En la Figura 1 se muestra un corte horizontal del globo ocular con las distintas estructuras que lo componen. La forma del globo ocular es debida a una cápsula esférica de tejido conjuntivo resistente que por delante tiene una porción transparente, la córnea, siendo el resto la esclerótica, de color blanquecino y opaco. Inmediatamente por detrás de la córnea está la cámara anterior del ojo ocupada por el humor acuoso y limitada por detrás por el iris y por la parte central de la cápsula anterior del cristalino, a nivel de la pupila. El cristalino se encuentra entre la cámara posterior y el cuerpo vítreo. En la parte anterior del cuerpo vítreo se encuentra la retina, que se trata de un complicado órgano multicelular destinado a la captación de los estímulos luminosos.<sup>1</sup>



**Figura 1.** Corte horizontal esquemático del globo ocular.

Las infecciones oculares se pueden adquirir exógenamente, por continuidad (infecciones de la cara, párpado...) o endógenamente por vía hematógena. La microbiota del párpado y conjuntiva protegen al ojo de microorganismos patógenos.

Los microorganismos que se consideran parte de la microbiota saprofita y aquellos microorganismos comúnmente patógenos se resumen en la Tabla 1.<sup>2</sup>

**Tabla 1.** Microorganismos que pueden encontrarse en el ojo.

Microbiota normal	Patógenos frecuentes
<b>Bacterias aerobias</b>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Corynebacterium spp</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Staphylococcus spp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Micrococcus spp</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y otros bacilos Gram-
<i>Neisseria spp no patógenas</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Aerococcus spp</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<b>Bacterias anaerobias</b>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
<i>Propionibacterium spp</i>	Hongos: <i>Aspergillus spp</i> , <i>Candida spp</i> , <i>Fusarium spp</i>
<i>Peptostreptococcus spp</i>	Virus: Adenovirus
	Protozoos: <i>Acanthamoeba</i>

Las glándulas lagrimales y las células caliciformes que se encuentran dentro de la conjuntiva son las responsables de mantener el ojo lubricado. La película lagrimal juega un papel importante en la defensa frente a las infecciones bacterianas y constituye un agente esencial en la oxigenación e hidratación del epitelio corneal. Además actúa como agente lubricante al disminuir el roce durante el parpadeo y movimiento ocular.

La secreción lagrimal la produce fundamentalmente la *glándula lagrimal principal*, que se trata de una glándula sebácea especializada que secreta su producción a través de ductos que se vacían al fondo del saco conjuntival. El sistema de drenaje permite la eliminación de la película lagrimal que no se ha evaporado. Este sistema de drenaje está compuesto por los canaliculos lagrimales, el saco lagrimal y el conducto nasolagrimal.

La fibrosis y obstrucción del conducto nasolagrimal es lo que condiciona la epífora y el acúmulo de detritus y proliferación bacteriana en el saco lagrimal, con el consiguiente riesgo de dacriocistitis.<sup>3</sup>

La lágrima posee los siguientes agentes antibacterianos: transferrina, lisozima, beta-lisina, IgA, IgG, factores del complemento y leucocitos que aumentan en cantidad

cuando el párpado está cerrado. En el componente lipídico de la película lagrimal también se encuentran ácidos grasos de cadena corta y larga, siendo los de cadena corta desestabilizadores de la membrana celular bacteriana, interfiriendo los de cadena larga en el metabolismo bacteriano.<sup>3</sup>

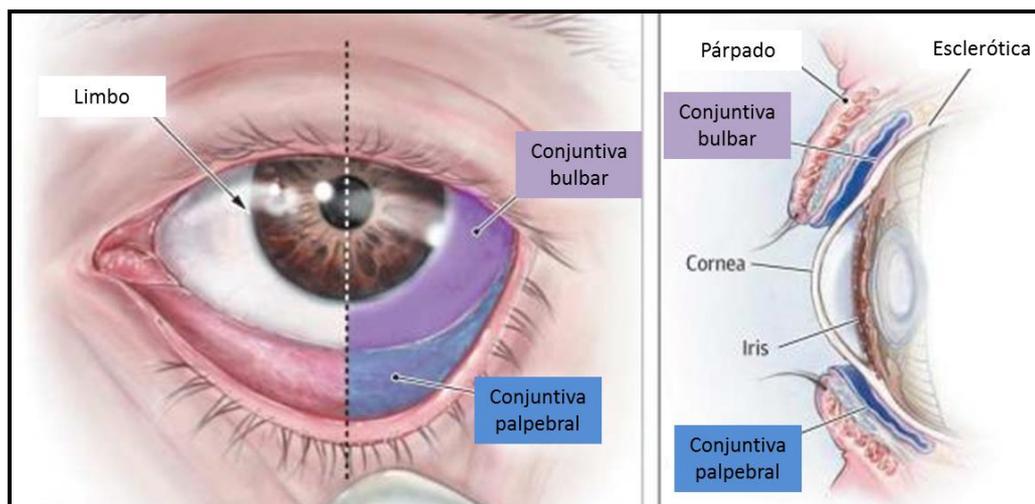
### **1.1.1. Conjuntivitis**

#### 1.1.1.1. Generalidades

La conjuntiva es una membrana delgada y translúcida que recubre la parte anterior de la esclerótica y el interior de los párpados. Tiene dos partes, bulbar y palpebral. La porción bulbar comienza en el borde de la córnea y cubre la parte visible de la esclerótica y la parte palpebral recubre el interior de los párpados (Figura 2).<sup>4</sup>

La conjuntiva está compuesta por un epitelio estratificado no queratinizado y un estroma laxo. El epitelio conjuntival (consta de 2 a 5 estratos celulares) tiene un enorme potencial de respuesta a la infección debido a su gran vascularización, gran cantidad de células inmunitarias y secreción de inmunoglobulinas y enzimas bactericidas. La conjuntiva junto con el epitelio corneal, participa en la síntesis de mucinas, las cuales son esenciales para la estabilidad lagrimal y transparencia corneal. La mucina MUC-1, es una glicoproteína de transmembrana presente en el epitelio corneal y conjuntival, cuya función es de anclaje de la película lagrimal siendo probablemente su función la de impedir la unión de bacterias patógenas a la superficie ocular.<sup>3 4</sup>

La conjuntivitis se define como una inflamación de la conjuntiva, normalmente causada por una infección, alérgenos, o sustancias irritativas, siendo los síntomas más comunes el enrojecimiento del ojo y sensación dolorosa.<sup>5</sup>



**Figura 2.** La conjuntiva es una membrana fina que cubre la esclerótica (conjuntiva bulbar en color púrpura), y el interior de los párpados (conjuntiva palpebral en color azul).

Aparte de las lesiones traumáticas, la conjuntivitis es una de las afecciones más comunes de los ojos. Las conjuntivitis infecciosas pueden estar producidas por virus, bacterias (incluyendo clamidias), hongos o parásitos, si bien las más frecuentes son las causadas virus y bacterias. La edad del paciente es un factor importante que determina qué microorganismos infectan con mayor frecuencia la conjuntiva. En la infancia, las conjuntivitis bacterianas son más habituales que las virales, mientras que en adultos ocurre lo contrario.<sup>2</sup>

La conjuntivitis infecciosa aguda es la infección oftálmica más frecuente y es especialmente prevalente en la edad pediátrica. Se estima que uno de cada ocho niños sufre un episodio de conjuntivitis al año y se trata de una de las consultas más frecuentes de atención primaria a pesar de su baja morbilidad.<sup>6</sup> Se considera que, *H. influenzae* junto con *S. pneumoniae* son los agentes que con mayor frecuencia causan conjuntivitis bacteriana tanto en niños como en adultos.<sup>7</sup>

#### 1.1.1.2. Manifestaciones clínicas

Todos los tipos de conjuntivitis se caracterizan por irritación, picor, sensación de cuerpo extraño, lloro y secreción. La conjuntivitis bacteriana se distingue de los otros tipos de conjuntivitis por la presencia de un exudado mucopurulento y una reacción papilar (Figura 3).<sup>2</sup> El dolor es mínimo y la agudeza visual apenas disminuye.<sup>5</sup>

A diferencia de la viral, la conjuntivitis bacteriana suele ser típicamente unilateral. En los casos severos suele haber frecuentemente edema del párpado con abundante pus y eritema conjuntival marcado y puede estar asociado a queratitis.<sup>2</sup>



**Figura 3.** Ojo afectado de conjuntivitis.

#### 1.1.1.3. Etiología infecciosa de la conjuntivitis bacteriana

En la población sana, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, y *S. aureus* son los microorganismos a los que con mayor frecuencia se les ha atribuido ser responsables de las conjuntivitis bacterianas. Sin embargo el agente causal que predomina varía en función de la edad del paciente.

En el recién nacido, la conjuntivitis aguda puede ser causado por *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *P. aeruginosa* u otros bacilos Gram negativos, aunque son principalmente *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* los responsables principales de la *ophthalmia neonatorum*.<sup>2</sup>

A pesar de que son muchos los microorganismos que se han descrito como causantes de conjuntivitis en la edad pediátrica, en niños mayores de 1 mes de vida *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *M. catarrhalis* son los patógenos que se han referido con mayor frecuencia.<sup>8 9</sup> Los estreptococos del grupo viridans se han asociado a conjuntivitis en niños menores de 1 año.<sup>10</sup> En los adultos, los patógenos comúnmente encontrados son los mismos que los de edad pediátrica junto con *S. aureus*, mientras que en adolescentes y adultos sexualmente activos, junto a los anteriores hay que incluir a *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*.<sup>10</sup> Algunas especies de micobacterias también son potenciales agentes etiológicos causando conjuntivitis atípica y asociada a ulceración en el ojo.<sup>2</sup>

Por último hay que destacar que microorganismos considerados saprofitos (habitualmente no patógenos) pueden ocasionalmente producir conjuntivitis, aunque su detección debe ser evaluada con prudencia. Así como la presencia de *H. influenzae* o *S. pneumoniae* en el cultivo de un sujeto con inflamación conjuntival es muy indicativa de ser su causa, la presencia de otras bacterias, incluyendo entre otros a *S. aureus* y *M. catarrhalis*, no lo es de igual forma. Giglioti *et al*<sup>8</sup> encontraron *S. aureus* con frecuencia casi similar en controles y en pacientes con conjuntivitis. Otros estudios han puesto de manifiesto la dificultad de atribuir causalidad al hallazgo de potenciales contaminantes o saprófitos de la conjuntiva.<sup>9 10</sup>

La sintomatología clínica, así como la calidad de la muestra y un crecimiento abundante del microorganismo ayudarán a la hora de establecer el diagnóstico etiológico de las conjuntivitis.

#### 1.1.1.4. Diagnóstico de la conjuntivitis bacteriana

La forma más habitual de determinar el microorganismo causante de la conjuntivitis bacteriana es cultivar la secreción conjuntival. Para ello es necesario utilizar un hisopo estéril siendo aconsejable recoger el material purulento de ambos ojos (Figura 4). Una vez obtenida la muestra, ésta debe ser sembrada directamente sobre agar sangre o agar chocolate atemperados o introducirla en un medio de transporte si no se va a sembrar inmediatamente. Después de sembrar los medios de cultivo se hace una extensión de la muestra para la tinción de Gram. En las conjuntivitis agudas se suelen observar abundantes microorganismos y leucocitos polimorfonucleares, mientras que en las crónicas o víricas se observan más linfocitos o células mononucleares que neutrófilos.<sup>9</sup> El diagnóstico molecular es posible para mayor parte de los agentes causantes de conjuntivitis aunque no suele emplearse debido a que su sensibilidad sería excesiva para atribuir causalidad a la mayoría de microorganismos. Una excepción sería *C. trachomatis*.



**Figura 4.** Toma de muestra mediante hisopado.

#### 1.1.1.5. Tratamiento de la conjuntivitis bacteriana

Los casos leves de conjuntivitis normalmente son autolimitados y frecuentemente se resuelven sin tratamiento antibiótico pero ante la sospecha de una conjuntivitis bacteriana el tratamiento antibiótico es aconsejable.<sup>11</sup> Para la mayoría de los expertos no existe un tratamiento empírico de primera elección aunque se suelen aconsejar antibióticos oculares tópicos de amplio espectro.<sup>12</sup>

En la Tabla 2 se muestran los principales principios activos y presentaciones que existen comercializadas en España para el tratamiento de las conjuntivitis (Tabla 2).<sup>13</sup>

**Tabla 2.** Antibióticos para uso oftálmico comercializados en España.

<b>Principio activo</b>	<b>Presentación</b>
Cloranfenicol	0,5% colirio y 1% pomada
Clortetraciclina	0,5% colirio y 0,5% pomada
Oxitetraciclina	1% pomada
Eritromicina	0,5% pomada
Ácido fusídico	1% gel
Trimetoprim/Polimixina B	Colirio
Gentamicina	0,3% y 0,6% colirio, y 0,3% pomada
Tobramicina	0,3% colirio y 0,3% pomada
Ciprofloxacino	0,3% colirio y 0,3% pomada
Lomefloxacino	0,3% colirio
Norfloxacino	0,3% colirio

## 1.1.2. Otras infecciones oftálmicas bacterianas

### 1.1.2.1. Queratitis

La queratitis es una inflamación que afecta a la córnea y constituye una amenaza para la visión debido al riesgo de opacidad corneal, cicatrización y perforación. El uso de lentes de contacto, así como los traumatismos y las intervenciones quirúrgicas son los principales factores de riesgo para el desarrollo de una queratitis infecciosa. En el estudio de las infecciones corneales conviene separar las infecciones superficiales (queratoconjuntivitis) de las más profundas, ulceradas y graves. Estas últimas se acompañan de una mayor pérdida de visión, dolor, fotofobia, eritema, y secreción. En los casos graves el pus se asienta en la base de la cámara anterior y provoca hipopión. El tratamiento antibiótico empírico debe iniciarse sin dilación, además de obtener material de raspado corneal para la tinción de Gram y cultivos.<sup>5</sup>

#### 1.1.2.1.1. Manifestaciones clínicas

No hay síntomas o signos clínicos que distingan una queratitis infecciosa de una no infecciosa. Debido a la gran inervación de la córnea, el síntoma más común es el dolor. A diferencia de la conjuntivitis, la queratitis suele ir asociada a disminución de la visión. Además de dolor suele presentarse fotofobia, y blefaroespasmos y es posible observar una neovascularización en los casos severos (Figura 5).<sup>2</sup>



**Figura 5.** Ojo afectado de queratitis bacteriana.

#### 1.1.2.1.2. Etiología infecciosa

Sólo microorganismos con factores de virulencia particulares son capaces de penetrar en el epitelio corneal intacto y muchos causan queratitis cuando penetran a través de

un trauma o anormalidad ocular. La mayoría de las queratitis infecciosas están causadas por bacterias, siendo las más prevalentes *Pseudomonas spp.*, enterobacterias, *Staphylococcus spp.* y *Streptococcus spp.* (incluido neumococo).<sup>2</sup>

Los hongos también pueden causar queratitis siendo *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* y *Candida spp.* los implicados con mayor frecuencia.<sup>14 15</sup> El protozoo *Acanthamoeba* es un patógeno asociado a queratitis en pacientes portadores de lentes de contacto aunque es poco común<sup>16</sup> y dentro de los virus, los pertenecientes a la familia *Herpes viridae* son los más frecuentemente asociados a queratitis.<sup>17</sup>

#### 1.1.2.1.3. Diagnóstico de la queratitis bacteriana

El diagnóstico se realiza mediante el cultivo tanto de muestras de la conjuntiva como de la córnea. El hisopado de la conjuntiva se recomienda que se recoja antes de la aplicación de la anestesia sin embargo para el raspado corneal la anestesia no interfiere. El cultivo es necesario realizarlo en medios enriquecidos, BHI (*brain heart infusión* o caldo de cerebro y corazón) suplementado con 10% de sangre de oveja, o agar chocolate, y se recomienda realizar una extensión para tinción de Gram con el material remanente aunque la tinción tiene un valor limitado. La sensibilidad y especificidad de la tinción de Gram de los raspados corneales para el diagnóstico de la queratitis fue determinado por un estudio realizado por Sharma *et al.*,<sup>18</sup> y la sensibilidad obtenida fue del 36% en la queratitis temprana, y de 40,9% en la avanzada. Sin embargo, la especificidad fue alta en ambos grupos (84,9% y 87,7% respectivamente), mientras que los valores predictivos positivo y negativo fueron bajos.

#### 1.1.2.1.4. Tratamiento de la queratitis bacteriana

La queratitis bacteriana es una infección grave que puede provocar ceguera y por tanto el tratamiento antibiótico debe instaurarse lo antes posible. Los antibióticos tópicos son la vía de administración más utilizada y entre las formulaciones tópicas de administración están las gotas, los lavados continuos, la iontoforesis, o las lentes blandas terapéuticas. Además del tratamiento tópico a veces hay indicación de asociar inyecciones subconjuntivales o antibioticos vía sistémica (generalmente cuando el microorganismo causante es gonococo). El tratamiento empírico debe incluir

antimicrobianos con actividad tanto frente a microorganismos Gram-negativos como frente a Gram-positivos. Una primera opción puede ser la utilización de cefalosporinas de primera generación tópicas (cefazolina) o vancomicina en combinación con un aminoglucósido (gentamicina, tobramicina o amikacina) o ceftazidima o las soluciones oftálmicas de fluoroquinolonas.<sup>2</sup>

#### 1.1.2.2. Endoftalmitis

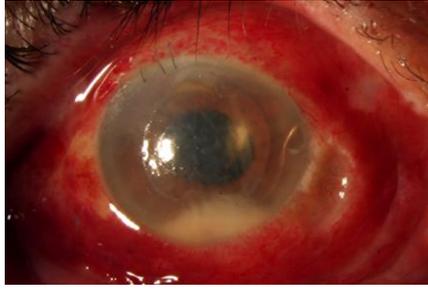
La endoftalmitis es un proceso inflamatorio que afecta a las estructuras internas del ojo. El factor más importante que predispone a la endoftalmitis infecciosa es el antecedente de cirugía en el ojo. La incidencia de la endoftalmitis post quirúrgica es baja, <0,9%, pero la alta frecuencia de la cirugía ocular (cataratas, operación glaucoma, vitrectomía, queratoplastia) hacen que sea un problema importante. Además del antecedente de cirugía, el trauma no quirúrgico es otro de los factores de riesgo, en donde la incidencia de la endoftalmitis es del 4,2%.<sup>19 20</sup>

La endoftalmitis también puede tener un origen endógeno cuando es causada por una siembra hematógena debido a la presencia de un foco de infección distante.<sup>2</sup>

##### 1.1.2.2.1. Manifestaciones clínicas

En la endoftalmitis aguda bacteriana los síntomas y signos oculares de inflamación aparecen desde pocos hasta varios días después de la cirugía o el trauma no quirúrgico causando dolor, disminución de la agudeza visual, hiperemia conjuntival, edema corneal e hipopión (Figura 6). La endoftalmitis tardía generalmente ocurre al menos tras un mes del trauma ocular y normalmente se asocia a la cirugía de catarata.<sup>21</sup>

Hay que sospechar una endoftalmitis endógena cuando se presenta de forma brusca sin antecedente previo de cirugía o trauma ocular, sobre todo en enfermos crónicos, diabéticos, o inmunodeprimidos con antecedentes de cateterismo intravenoso prolongado o hemocultivos positivos.<sup>22</sup>



**Figura 6.** Endoftalmitis tras cirugía de cataratas.

#### 1.1.2.2.2. Diagnóstico de la endoftalmitis bacteriana

Ante una sospecha clínica de endoftalmitis, las muestras para el estudio microbiológico se deben recoger lo más rápidamente posible, ya que se trata de una urgencia oftalmológica. Se debe de cultivar el humor vítreo así como el humor acuoso. El estudio microbiológico debe incluir tinción de Gram y la utilización de medios de cultivo apropiados para microorganismo aerobios y anaerobios.

Aunque el cultivo bacteriano tenga poca relevancia en el tratamiento empírico inicial, el resultado del cultivo bacteriano y antibiograma pueden dirigir el tratamiento. Los patógenos que más frecuentemente causan endoftalmitis crecen a las 24-48 horas, pero el cultivo de los microorganismos anaerobios debe mantenerse al menos de 5 a 7 días. En el caso que se sospeche infección por micobacterias, se debe realizar una tinción ácido-alcohol resistente y realizar el cultivo en los medios adecuados.<sup>2</sup>

Una alternativa al cultivo bacteriano es la utilización de la PCR como herramienta diagnóstica. Numerosos estudios han valorado su utilidad y tanto el humor vítreo como el acuoso parecen ser buenas muestras para la realización de la PCR para detectar bacterias, sobre todo en muestras con cultivo negativo.<sup>23-25</sup>

#### 1.1.2.2.3. Tratamiento de la endoftalmitis bacteriana

Las alternativas tradicionales incluyen desbridamiento mecánico vía vitrectomía, y tratamiento antibiótico vía intravítrea, subconjuntival, tópica y/o sistémica, y la aplicación de esteroides. El tratamiento empírico intravítreo requiere cubrir tanto microorganismos Gram-positivos como Gram-negativos y la combinación de vancomicina junto con ceftazidima o un aminoglucósido (amikacina) es el tratamiento

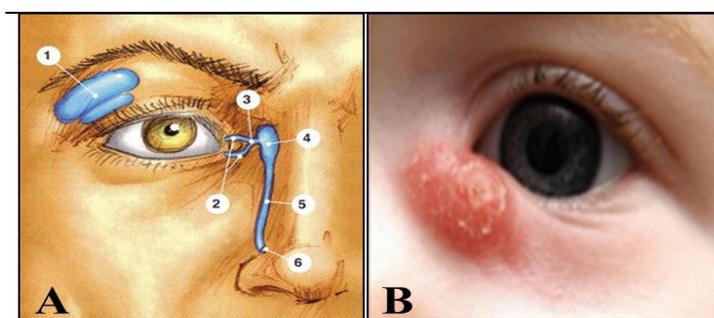
más utilizado.<sup>26</sup> En el caso de infecciones crónicas en las cuales existe una lente intraocular será necesaria el reemplazo de la misma.

La utilización de antibióticos y antisépticos antes, durante y después de la cirugía es habitual. Sin embargo y debido a la baja incidencia de endoftalmitis post quirúrgicas su eficacia no ha podido ser probada. Entre los antiséptico disponibles la povidona yodada parece ser efectiva en reducir la tasa de endoftalmitis.<sup>27 28</sup>

### 1.1.2.3. Infecciones en estructuras anexas al ojo

#### 1.1.2.3.1. Dacriocistitis

Este trastorno consiste en inflamación del sistema de drenaje lagrimal (Figura 7), que puede ocasionar epifora (lagrimeo) e hiperemia ocular. La presión suave sobre el saco lacrimal induce dolor y el reflujo de moco o pus a partir del punto lagrimal. La dacriocistitis suele aparecer cuando se obstruye el sistema lagrimal y se trata con la administración de antibióticos tópicos o de acción sistémica, seguida de sondaje o de intervención quirúrgica, para restablecer su permeabilidad.<sup>5</sup>



**Figura 7.** A) Sistema lagrimal: 1 Glándula lagrimal principal. 2 Puntos y canalículos lagrimales. 3 Canalículo común. 4 Saco lagrimal. 5 Conducto lacrimonasal. 6 Meato inferior. B) Ojo afectado de dacriocistitis.

#### 1.1.2.3.2. Blefaritis

La blefaritis se define como una inflamación crónica del párpado y típicamente se clasifica en blefaritis anterior y posterior. Normalmente tiene un curso benigno, aunque puede haber casos graves que cursan con deformación permanente del párpado y pérdida de visión asociado a queratopatía. La etiología y patofisiología de la

blefaritis es compleja y poco entendida. Parece que tiene una naturaleza multifactorial y se ha asociado con infección, enfermedades sistémicas y factores ambientales. La blefaritis anterior (inflamación de la piel del párpado y de los folículos de las pestañas) se relaciona con infección estafilocócica, sobre todo *S.aureus* y dermatitis seborreica y suele ir acompañada de costras con detritus descamados que se adhieren a las pestañas.<sup>29</sup>

## **1.2. Generalidades de la infección por *S. pneumoniae***

*S. pneumoniae* es uno de los patógenos más frecuentes para el ser humano que causa desde infecciones graves como meningitis o neumonía hasta infecciones más leves pero que conllevan una importante carga de morbilidad y gasto sanitario como son las otitis, sinusitis, o las conjuntivitis.

Los principales grupos de riesgo de enfermedad invasiva por neumococo son los niños menores de dos años de edad y adultos mayores de 65 años. Se estima que en EE.UU se producen al año 4 millones de episodios de enfermedad neumocócica, causando 445.000 hospitalizaciones y 22.000 muertes<sup>30</sup> y a nivel mundial, neumococo es responsable de cerca de un millón de fallecimientos anuales en niños menores de cinco años.<sup>31</sup>

Otro grupo de riesgo son los individuos inmunocomprometidos que posean una deficiencia inmune primaria (genética) o secundaria (adquirida).

En la Tabla 3 se resumen las enfermedades y situaciones que predisponen a la enfermedad neumocócica.<sup>7</sup>

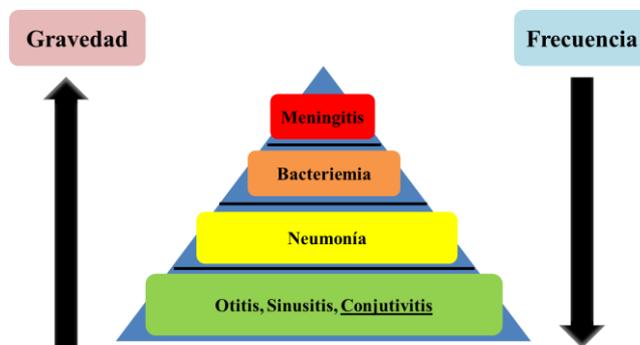
**Tabla 3.** Enfermedades y condiciones que predisponen a la infección por neumococo.

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Mayor riesgo de exposición</b></li> </ul> <p>Guarderías, cuarteles, albergues acogida...</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Infección, inflamación de las vías respiratorias</b></li> </ul> <p>Gripe y otras infecciones virales de las vías respiratorias</p> <p>Contaminación aérea</p> <p>Alergias</p> <p>Tabaquismo</p> <p>Neumopatía obstructiva crónica</p> <p>Otras causas de inflamación u obstrucción crónica pulmonar</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Lesión anatómica de las meninges (laceración de la duramadre)</b></li> <li>• <b>Formación defectuosa de anticuerpos</b></li> </ul> <p>Hipogammaglobulinemia común variable</p> <p>Deficiencia selectiva de las subclase IgG</p> <p>Mieloma múltiple</p> <p>Leucemia linfocítica crónica</p> <p>Linfoma</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Función defectuosa del complemento</b></li> <li>• <b>Depuración defectuosa de la bacteriemia neumocócica</b></li> </ul> <p>Asplenia, hiposplenia congénita</p> <p>Esplenectomía</p> <p>Drepanocitosis</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Situaciones multifactoriales</b></li> </ul> <p>Lactancia y senectud</p> <p>Enfermeades crónicas, hospitalización</p> <p>Alcoholismo</p> <p>Desnutrición</p> <p>Infección por VIH</p> <p>Neumopatía crónica</p> <p>Tratamiento con glucocorticoides</p> <p>Cirrosis hepática</p> <p>Insuficiencia renal</p> <p>Diabetes mellitus</p> <p>Anemia</p> <p>Coronariopatía</p> <p>Fatiga, tensión o exposición al frío</p>
---	---

El espectro clínico de las infecciones producidas por el neumococo es amplio y variado, causando enfermedades invasivas y no invasivas. En la Tabla 4 se relacionan algunas las enfermedades más comunes producidas por *S. pneumoniae*. Además, la prevalencia de dichas enfermedades es inversamente proporcional a la gravedad (Figura 8).

**Tabla 4.** Enfermedad neumocócica invasiva y no invasiva.

<b>Enfermedades invasivas</b>	<b>Enfermedades no invasivas</b>
Bacteriemia/sepsis	Neumonía no bacteriémica
Meningitis	Otitis media aguda
Neumonía bacteriémica	Sinusitis
Osteoartritis	Mastoiditis
Celulitis	Conjuntivitis
Endocarditis y Pericarditis	Vulvovaginitis
Peritonitis	



**Figura 8.** Tipos de enfermedad causadas por *S. pneumoniae*.

### **1.3. Neumococo. Aspectos microbiológicos**

#### **1.3.1. Antecedentes históricos de *S. pneumoniae***

*S. pneumoniae* es uno de los patógenos bacterianos más importante de la historia de la microbiología. Fue descubierto en 1881 simultáneamente en el Viejo y en el Nuevo Mundo. En Francia, Pasteur lo llamó *Microbe septicémique du salive* mientras que en los Estados Unidos de América, George Millar Sternberg lo denominó *Micrococcus pasteurii*. A finales de la década de 1880, el término *pneumococcus* se generalizó, debido a que este microorganismo se identificó como la causa más frecuente de neumonía lobar.<sup>7</sup> Debido a su morfología en la tinción de Gram de esputos, en 1926 se asignó al género *Diplococcus* y ya en 1974 se renombró como *S. pneumoniae* por su morfología (cocos en cadenas) al crecer en medios líquidos.<sup>7</sup>

El estudio del neumococo supuso la base del estudio de la inmunidad humoral. En 1880, Felix y Georg Klemperer, en un modelo animal, demostraron cómo los animales se inmunizaban (desarrollaban anticuerpos) frente al neumococo mediante la utilización de neumococos muertos y cómo además el suero obtenido de los animales inmunizados protegían a otros animales. Neufeld y Rimpau dieron explicación a este mecanismo de inmunidad que denominaron como opsonización (presencia de factores en el suero favorecían la fagocitosis de las bacterias) y asentaron las bases de lo que hoy llamamos inmunidad humoral.<sup>7</sup>

A principios del siglo XX se comenzaron a descubrir los distintos serotipos capsulares tras observar que los anticuerpos séricos aglutinaban y provocaban la expansión capsular de las cepas inmunizantes, así como de algunas, aunque no todas, las cepas del resto de neumococos. Se distinguían 3 serotipos (1, 2 y 3), y el resto de los neumococos se agrupaban en el grupo 4.<sup>7</sup>

En la era preantibiótica la única posibilidad de tratar específicamente las infecciones neumocócicas era con sueros inmunes antineumocócicos. En la primera década del siglo XX, Maynard, Lister, Wright y otros comenzaron a aplicar los conceptos de la inmunidad humoral para el tratamiento de la neumonía, consiguiendo una reducción en la mortalidad tras la inoculación de neumococos muertos. En la década de 1920, Heidelberg y Avery, demostraron que el anticuerpo que confería inmunidad reaccionaba con los polisacáridos capsulares de superficie. Los primeros polisacáridos capsulares purificados para inmunización fueron preparados por Felton, empleándose una preparación del polisacárido capsular 1 en una epidemia de neumonía en Worcester, Massachusetts en 1938. Estos estudios mostraron que podría usarse un antígeno polisacárido bacteriano específico para estimular la producción de anticuerpos que confiriesen protección frente a la infección epidémica humana.<sup>7</sup>

El descubrimiento y posterior comercialización de la penicilina en 1940, supuso un gran avance en el tratamiento de las infecciones neumocócicas, a pesar de lo cual siguieron teniendo una importante morbilidad y mortalidad y en 1977 se comercializó

la primera vacuna. Esta vacuna estaba compuesta por polisacáridos capsulares de 14 serotipos distintos de neumococo. En 1983 se fabricó una segunda generación de la misma vacuna compuesta por 23 serotipos (serotipos aislados con mayor frecuencia en enfermedad neumocócica invasiva), la cual se sigue utilizando hoy en día en adultos mayores de 65 años.<sup>32</sup>

La eficacia de esta vacuna polisacárida disminuye en individuos inmunocomprometidos y no son eficaces en niños menores de 2 años, que paradójicamente son los grupos más afectados por la infección neumocócica.<sup>33</sup>

Ya en el año 2000 se comercializó una nueva vacuna de naturaleza polisacárida conjugada a una proteína, consiguiendo así ser inmunógena para niños pequeños. La primera en comercializarse confería protección frente a 7 serotipos, y posteriormente se han ido añadiendo más serotipos, y hoy en día es la vacuna frente a 13 serotipos (13 valente) la que se utiliza en nuestro país.

Por último, hay que destacar que el neumococo tuvo un papel central en el descubrimiento de que el ADN era el material celular que portaba la información genética, gracias a su capacidad para la transformación. Griffith en la década de 1920 descubrió que cuando cepas avirulentas vivas de *S. pneumoniae* y cepas virulentas inactivadas por calor se inoculaban conjuntamente a un ratón, éste enfermaba y llegaba a morir. Griffith concluyó que las cepas avirulentas habían sido transformadas por las formas virulentas, sin saber en ese momento cuál era el mecanismo. En 1944 Oswaldo T. Avery y sus colaboradores del Rockefeller Institute de Nueva York demostraron que el material que se intercambiaba en el experimento de Griffith era el ADN.<sup>34</sup>

### **1.3.2. *S. pneumoniae*: características microbiológicas**

*S. pneumoniae* pertenece al reino *Bacteria*, filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia *Streptococcaceae* y género *Streptococcus*.

El nombre de la especie deriva de la palabra griega “streptos”, que significa que se dobla o retuerce con facilidad como una cadena; “coccus”, grano y “pneumon”; pulmones. Pertenece al grupo de *Streptococcus mitis* junto con *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus gordonii*,

---

*Streptococcus cristatus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus infantis* y *Streptococcus peroris*.<sup>34</sup>

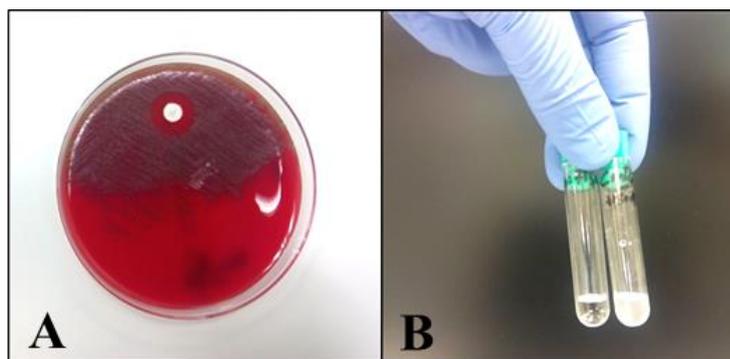
El neumococo en las muestras clínicas crece en forma de células esféricas lanceoladas de 0,6 a 1µm de diámetro, formando parejas o cadenas de longitud corta.<sup>7</sup> No forma esporas y es inmóvil. Se trata de un microorganismo anaerobio facultativo y su crecimiento se ve favorecido por la incubación en una atmósfera rica en CO<sub>2</sub> (3-5%) y al igual que otras especies del mismo género, requiere medios de crecimiento rico que se consiguen suplementando los medios con la adición de sangre o suero. Metaboliza la glucosa y otros carbohidratos por vía fermentativa, siendo el ácido láctico el mayor producto metabólico. La adición de glucosa u otros carbohidratos a un medio líquido favorece el crecimiento pero disminuye el pH, lo cual puede dar lugar a una inhibición del crecimiento a no ser que el medio esté tamponado, como en el caldo Todd-Hewitt.<sup>34</sup>

*S. pneumoniae* es catalasa-negativo, y produce una neumolisina (antes llamada alfa-hemolisina), que degrada la hemoglobina transformándola en un pigmento verde; debido a esta neumolisina las colonias están rodeadas de un halo verde cuando crecen en el medio agar sangre o amarillo-verdoso en agar chocolate.<sup>7</sup> A esta propiedad se le sigue denominando alfa-hemólisis. Generalmente las colonias de cepas capsuladas son brillante y umbilicadas de 1 a 3 mm de diámetro, y más rugosas-opacas y de menor tamaño en el caso de las no capsuladas.<sup>34</sup> Determinados serotipos como el 3, 8 y 37 suelen presentar un aspecto mucoso, debido a la composición de la cápsula, más rica en hidratos de carbono (Figura 9).



**Figura 9.** Neumococo mucoside serotipo 3 crecido en medio agar sangre.

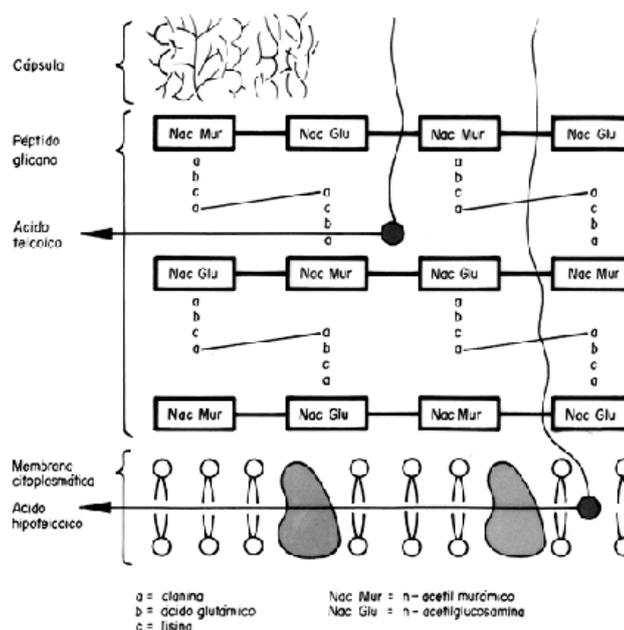
El neumococo se diferencia de los estreptococos del grupo viridans por ser sensible a la etilhidrocupreína (optoquina) y por ser soluble en sales biliares. Su identificación en los laboratorios de microbiología clínica se realiza mediante identificación morfológica tras tinción de Gram (cocos Gram positivos en cadenas) y cuatro reacciones bioquímicas: 1) alfa hemólisis en agar sangre, 2) reacción negativa a la catalasa, 3) susceptibilidad a la optoquina (Figura 10), 4) solubilidad en sales biliares (Figura 10).<sup>7</sup>



**Figura 10.** A-Prueba de la optoquina: halo de inhibición. B-Solubilidad en bilis: en el tubo de la izquierda se muestra la cepa de neumococo solubilizada con bilis y el en tubo de la derecha el tubo control sin bilis.

### 1.3.2.1. Características estructurales y factores de virulencia

La estructura externa del *S. pneumoniae* es compleja al estar compuesta, desde el exterior hacia el interior, de cápsula, pared celular y membrana citoplasmática.<sup>35</sup> En la Figura 11, se muestra la estructura de *S. pneumoniae*.



**Figura 11.** Características estructurales de *S. pneumoniae*.<sup>35</sup>

#### 1.3.2.1.1. Cápsula

Prácticamente todas las cepas de *S. pneumoniae* están recubiertas por una cápsula externa, pero hay que destacar que en la práctica clínica se pueden aislar también cepas acapsuladas las cuales están principalmente implicadas en episodios de conjuntivitis.<sup>7</sup>

Desde el punto de vista de la virulencia, la cápsula es la estructura externa más importante ya que previene la fagocitosis mediada por el complemento protegiendo así las estructuras internas del neumococo.<sup>36</sup> La cápsula es de naturaleza polisacárida (repeticiones de oligosacáridos) y se encuentra unida por enlaces covalentes a la superficie externa del peptidoglicano de la pared<sup>37</sup> y al polisacárido de la pared celular (C-), lo cual hace que sea muy difícil separar los polisacáridos de la cápsula de los que contiene la pared celular.<sup>7</sup>

En base a la diferente respuesta inmune generada por los polisacáridos capsulares, se han descrito hasta la actualidad unos 100 tipos capsulares diferentes de *S. pneumoniae*, también denominados serotipos. Para la identificación de los distintos serotipos capsulares se utiliza lo que se conoce como reacción de Quellung o Neufeld: se trata de la visualización al microscopio del hinchazón capsular debido a la reacción de aglutinación que se produce cuando el anticuerpo obtenido de conejos previamente inmunizados con la cepa de un serotipo concreto reaccionan con la cápsula del neumococo de ese mismo serotipo. Como se comentó anteriormente, en la actualidad existen unos 100 serotipos descritos (serotipos como el 6E, 6D, 6F, 11E, 19E, etc se han referido recientemente),<sup>38 39</sup> y para su clasificación es el sistema de numeración danés el más utilizado, el cual distingue grupos de serotipos de acuerdo con su similitud antigénica.<sup>7</sup>

Hoy en día, la serotipificación ya no tiene interés para el tratamiento de la enfermedad neumocócica con antisueños; sin embargo es de gran interés desde el punto de vista epidemiológico y de salud pública para el desarrollo de nuevas vacunas y para la vigilancia de los serotipos tras la introducción de las vacunas.<sup>7</sup>

La regulación genética de la síntesis de la cápsula es también compleja, interviniendo muchos genes diferentes en su formación. Además algunas cepas pueden experimentar una transformación o cambio de serotipo al incorporar genes capsulares de otros serotipos.<sup>40</sup> La transformación de los tipos capsulares no sólo ocurre en condiciones experimentales, sino que también puede suceder en la naturaleza,<sup>7</sup> y a este fenómeno de intercambio capsular *in vivo* se le conoce como “switching capsular”.

Otro hecho característico de la cápsula bacteriana es que los distintos tipos capsulares de neumococo difieren significativamente en su virulencia. Así, de los algo más de 100 serotipos conocidos actualmente, sólo un limitado número de serotipos causan la mayoría de las infecciones graves.<sup>41-43</sup>

#### 1.3.2.1.2. Pared celular

La pared celular de *S. pneumoniae* tiene la estructura general de los estreptococos, el cual es el equivalente a los polisacáridos del grupo de Lancefield de otros estreptococos, y se denomina polisacárido C;<sup>19</sup> está compuesta principalmente por el peptidoglicano y el ácido teicoico.<sup>7</sup> El péptidoclicano está constituido por subunidades alternas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetil murámico unidas entre sí por puentes peptídicos.<sup>34</sup> El ácido teicoico, es un polímero de carbohidratos que contiene fosforilcolina que se une covalentemente al petidoglicano. El ácido teicoico junto con los fragmentos adherentes del petidoglicano , forma el polisacárido C y es la región responsable de la reacción entre los neumococos y las proteínas séricas.<sup>7</sup>

#### 1.3.2.1.3. Membrana citoplasmática

La membrana de tres capas está compuesta por ácidos grasos y ácidos teicoicos. El ácido lipoteicoico de neumococo, también se denomina antígeno F (Forsman antigen). Los anticuerpos contra el antígeno F tienen reacción cruzada con los polisacáridos del grupo C de Lancefield.

La fosfocolina es un componente crucial tanto del ácido lipoteicoico como de ácido teicoico de la pared celular (polisacárido C). Los residuos de fosfocolina son necesarios para la transformación, actividad autolisina, división celular, y para el anclaje de muchas superficies de proteína que juegan un papel importante en las infecciones neumocócicas.<sup>19</sup>

#### 1.3.2.2. Principales factores de virulencia distintos a la cápsula

##### 1.3.2.2.1. Proteasa IgA1

El neumococo segrega una endopeptidasa muy específica que es capaz de unirse a la región bisagra de la IgA1, el cual es el mediador principal de la inmunidad específica del tracto respiratorio superior y es la sublcase de IgA predominante en el suero humano. Esta endopeptidasa provoca la ruptura de la región bisagra de la IgA presente en las mucosas, lo que facilitaría su adherencia y colonización inicial.<sup>34</sup> Esta IgA1 proteasa es una de las muchas zinc-metallo-proteínas producidas por el neumococo.

La función de las otras proteasas, como ZmpB y ZmpC, aún está en estudio. La ZmpC rompe e inactiva la enzima humana denominada “matriz metaloproteínasa 9” implicada en la rotura de la matriz extracelular en diferentes procesos fisiológicos; la proteasa ZmpB induce la producción del factor de necrosis tumoral alfa en el tracto respiratorio.<sup>19</sup>

#### 1.3.2.2.2. Neumolisina

Se trata de una hemolisina intracelular que se libera por autólisis. Al igual que la estreptolisina O de *Streptococcus pyogenes*, la neumolisina pertenece a la familia de las toxinas activadas por tiol, las cuales pierden actividad por oxidación. Ambas lisinas son muy parecidas en cuanto a la estructura: contienen un único residuo de cisteína, son irreversiblemente inactivadas por el colesterol y son inmunogénicas durante la infección. La neumolisina inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos, la fagocitosis, y el “burst” respiratorio, además de inhibir la proliferación de linfocitos y la síntesis de inmunoglobulinas. Esta toxina también es la responsable de la destrucción de los glóbulos rojos y de la hemólisis que se observa cuando se cultiva el neumococo en medios con sangre.<sup>44</sup>

#### 1.3.2.2.3. Neuraminidasas (NanA y NanB)

Son enzimas capaces de hidrolizar las glucoproteínas y los glucolípidos celulares y, por lo tanto, tiene un papel importante ayudando a la diseminación y multiplicación de *S. pneumoniae* en los tejidos infectados. Disminuye la viscosidad del mucus que reviste el epitelio respiratorio y altera la estructura de los oligosacáridos, exponiendo los receptores y facilitando la colonización.<sup>35</sup>

#### 1.3.2.2.4. Proteínas de superficie: PspA, PspC, PavA

El neumococo es portador de numerosas proteínas de superficie. La proteína de superficie del neumococo (PspA) presenta cierta similitud con la proteína M de *S. pyogenes*. PspA es un inhibidor de la activación del complemento y se une a la lactoferrina. Aunque la PspA presenta una diversidad antigénica importante, la inmunización de ratones con una PspA recombinante de un determinado serotipo,

confiere protección frente a distintos serotipos. Por otro lado PspC es otra proteína de superficie presente en aproximadamente el 15% de cepas clínicas. Se une a la porción secretora de la IgA, y también interacciona con las células del pulmón y endotelio, y se une al factor H del sistema de complemento. PavA es una proteína de superficie que se une a la fibronectina, como la proteína “fibronectin-binding” de *S. pyogenes* y la CshA de *S. gordonii*.<sup>19</sup>

#### 1.3.2.2.5. Autolisina (LytA)

Denominada también amidasa, es una enzima que hidroliza la capa del peptidoglicano entre el ácido N-acetil murámico y el residuo alanina del puente peptídico. Esta enzima, que se localiza en su mayoría en el medio intracelular, provoca la lisis del neumococo y la liberación de componentes de la pared celular.<sup>45</sup> También provoca la secreción de la neumolisina auto-perpetuando así la respuesta inflamatoria la cual es una parte importante de la patogénesis de la neumonía y meningitis neumocócica.<sup>19</sup>

### 1.3.3. Ecología: portación nasofaríngea

*S. pneumoniae* forma parte de la microbiota nasofaríngea de las personas sanas siendo el hombre el único reservorio conocido para el neumococo. La colonización (infección no invasiva) comienza poco después del nacimiento y se estima que entre el 30-62% de niños menores de 2 años, el 30-35% de niños entre 6 y 11 años, y el 18-19% de adultos sanos, son portadores de neumococo en la nasofaringe.<sup>46 47</sup>

La importancia de la colonización nasofaríngea se debe a que se trata del paso previo a la aparición de la enfermedad, es la fuente de transmisión a otras personas, y facilita la aparición y diseminación de resistencia a antibióticos.<sup>48 49</sup>

La colonización es el primer paso de la infección neumocócica, que en función de las características de la cepa infectante y del hospedador, puede derivar en enfermedad invasiva o no invasiva. Se conoce muy poco sobre los factores que determinan el paso del estado portador a la enfermedad invasiva o no.<sup>50</sup> Es probable que en los niños el equilibrio que supone la colonización se rompa por la llegada de un nuevo serotipo con

mayor poder patógeno, como consecuencia de una inmunodeficiencia o por factores extrínsecos (infección vírica de las vías respiratorias...).<sup>50</sup>

### **1.3.4. Tipificado y caracterización molecular**

#### 1.3.4.1. Tipificado convencional

Hoy en día, el tipificado o determinación del tipo capsular de neumococo no tiene implicaciones terapéuticas como en la era pre-antibiótica, pero sí un importante valor epidemiológico en la evaluación de la eficacia de las vacunas disponibles y vigilancia de los serotipos circulantes.

La técnica de tipificado de referencia es el test de Neufeld o Quellung (“hinchazón” en alemán), y se trata de una técnica que depende del uso de anticuerpos. Actualmente las técnicas moleculares que determinan los genes responsables de las síntesis de los diferentes tipos capsulares se han convertido en una buena alternativa. Para la caracterización molecular del genoma bacteriano se utilizan principalmente dos técnicas; electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE) y el multilocus sequence typing (MLST).<sup>34</sup>

Para realizar la técnica del Quellung se debe realizar una suspensión de la cepa a serotipificar, y mezclarla en un porta de cristal con una gota del antisuero de conejo a estudiar. La muestra se debe observar al microscopio, (para aumentar la visibilidad se puede añadir un colorante como el azul de metileno), y en el caso de reacción positiva se observará el hinchazón de la cápsula: un área clara alrededor de la bacteria.<sup>34</sup>

Los antisueros más utilizados para la realización del serotipificado convencional son los suministrados por el Statens Serum Institut de Copenhague (Dinamarca).

Existen distintas formas de clasificar o enumerar a los distintos serotipos neumocócicos; en el sistema estadounidense, los serotipos se numeran del 1 al 90 según el orden en el que fueron identificados. Sin embargo el sistema más ampliamente aceptados es el danés, que distingue grupos de serotipos de acuerdo con sus semejanzas antigénicas. Por ejemplo, el serogrupo 19 danés, incluye a los tipos 19F, 19A, 19B, y 19C. La letra F indica el primer miembro del grupo que fue

identificado (de “first” en inglés), y ya después se sigue el orden alfabético. El ejemplo descrito correspondería a los tipos 19, 57, 58 y 59 respectivamente del sistema americano.<sup>7</sup>

En el esquema de serotipificado utilizando la reacción de Quellung, los 94 serotipos descritos hasta 2009 están divididos en 25 serotipos individuales y en 21 serogrupos, que agrupan los restantes 69 serotipos (de 2 a 5 serotipos por serogrupo). Los serotipos y serogrupos son detectados con antisueros tipo y grupo específico respectivamente. Los serogrupos están formados por serotipos con fórmulas antigénicas semejantes pero que se pueden diferenciar utilizando los sueros de factor. Para los nuevos serotipos descritos como serotipo 6E, 11E, etc. aun no existen antisueros específicos y su detección se realiza mediante técnicas moleculares.<sup>38 39</sup>

Siguiendo el mismo principio, el Statens Serum Institut comercializó en 2004 un kit de serotipificado mediante aglutinación con partículas de látex, utilizando un esquema de tablero. Los anticuerpos frente a los diferentes serotipos de neumococo están unidos a partículas de látex que en presencia del serotipo correspondiente formarán unos agregados (aglutinación) capaz de observarse a simple vista, sin necesidad de utilizar microscopio. Con este sistema se pueden identificar 21 de los serotipos o serogrupos más comúnmente distribuidos en el mundo.

Una alternativa de tipificado basada en la reacción Quellung, pero que elimina la dificultad que entraña la visualización de la reacción al microscopio, es el PneumoArray<sup>®</sup>. Este “array” de antisueros se desarrolló en el año 2009 en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Donostia junto al grupo Progenika a través de su filial Proteomika. En este microarray los antisueros del Statens Serum Institute están inmovilizados en un soporte de vidrio de manera ordenada formando una cuadrícula. La muestra marcada fluorescentemente se unirá en los puntos de la cuadrícula donde se ha fijado su antisuero, leyéndose la fluorescencia emitida mediante un escáner.<sup>51</sup>

#### 1.3.4.2. Tipificado mediante técnicas moleculares

El tipificado molecular basado en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (descrita por Kary Mullis en 1983) se pudo desarrollar a partir de la obtención de la secuencia de los genes capsulares (loci capsular: región *dexB* y *aliA*) que codifican para los 94 serotipos gracias al proyecto liderado por el Instituto Sanger de Cambridge (UK). Se logró completar la secuencia de los genes capsulares de todos los serotipos en 2005, estando las secuencias disponibles en Genbank (números de acceso CR931632 al CR931722, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), lo que permite diseñar los cebadores necesarios para amplificar la región deseada.

En el año 2003 aparecieron los primeros trabajos de tipificado mediante múltiplex-PCR y permite amplificar simultáneamente en un único tubo de amplificación varias secuencias específicas.<sup>52 53</sup>

El tipificado molecular es una técnica rápida y sensible para determinar los tipos capsulares, si bien es cierto que para algunos serotipos la similitud de las secuencias de sus genes capsulares dificulta la tipificación completa, por lo que será preciso completarla mediante la reacción de *Quellung*.<sup>52</sup>

#### 1.3.4.3. Caracterización molecular: PGFE y MLST

##### 1.3.4.3.1. PFGE

La electroforesis en gel de campo pulsante o PFGE (del inglés “Pulse Field Gel Electrophoresis”) es una de las técnicas de tipificación genotípica más reproducible y altamente discriminatoria en comparación con otras técnicas.<sup>54</sup> Esta técnica permite determinar la clonalidad de las cepas y establecer las relaciones genéticas de los aislamientos causantes de un brote.

La técnica se basa en la digestión específica del genoma completo de las bacterias con enzimas de restricción cuyos fragmentos se resuelven mediante la migración en geles de agarosa sometidos a electroforesis donde la orientación de los campos eléctricos varía periódicamente (o campo pulsado). Ello proporciona un patrón electroforético específico para cada clon bacteriano que lo diferencia de los demás.<sup>55</sup>

Estos enzimas permiten la macrorrestricción y división de todo el genoma en unos pocos fragmentos que pueden variar entre 10 y 30. El enzima de restricción más ampliamente utilizado para la *S. pneumoniae* es el denominado *SmaI*<sup>56</sup>. En la PFGE el procedimiento de extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) es crítico y el ADN cromosómico debe permanecer íntegro. Para ello la extracción del ADN bacteriano se realiza dentro de una matriz de agarosa que impide la rotura del ADN extraído de las células. Tras la macrorrestricción los fragmentos de ADN obtenidos son de gran tamaño (5-500 kb-s), por lo que no pueden separarse por técnicas de electroforesis convencional y requieren técnicas en las que el campo eléctrico varía de orientación periódicamente. De todos los sistemas el más extendido ha sido el denominado CHEF (clamped homogeneous electric field electrophoresis). Este sistema dispone de 24 electrodos dispuestos periféricamente en un contorno hexagonal y genera patrones de bandas rectos lo cual facilita mucho su interpretación.

Las diferencias en los patrones de restricción establecerán la relación entre las cepas estudiadas; cuanta más relación epidemiológica mayor similitud habrá entre los patrones.<sup>57</sup> Globalmente, el número de diferencias entre los patrones clasificará los aislamientos en idénticos cuando el número y tamaño de bandas es idéntico. Cuando no sean 100% idénticos se establecen distintos grados de similitud.<sup>57</sup>

Mediante el uso de programas informáticos que objetivan el número de diferencias entre los aislamientos se determina la similitud o distancia genética entre los aislamientos estudiados y ésta puede ser representada mediante árboles filogenéticos.

#### 1.3.4.3.2. MLST

La técnica MLST es una herramienta molecular muy discriminativa desarrollada para identificar clones o líneas clonales fundamentalmente en poblaciones bacterianas vía internet.<sup>58-60</sup>

El método se propuso en 1998 y se basa en la secuenciación de 7 fragmentos internos de genes altamente conservados (“housekeeping genes”) que codifican enzimas metabólicos. Además estos genes poseen una secuencia relativamente uniforme. En el desarrollo de esta técnica se tomaron los conceptos probados de electroforesis de enzimas multilocus y se adaptó para que los alelos en cada locus se definieran

directamente, mediante su secuenciación nucleotídica, en lugar de indirectamente a partir de la movilidad electroforética de sus productos génicos.<sup>60</sup>

La secuencia interna de cada gen conservado codifica un alelo al que se le asigna un número; mediante la combinación de los 7 alelos se establecerá el secuenciotipo (ST) de la cepa estudiada.<sup>59 61</sup>

Las diferencias entre los perfiles alélicos de diferentes cepas determinarán la relación existente entre ellas y los aislamientos que comparten el mismo perfil alélico pertenecerán al mismo ST.

La principal ventaja de esta técnica molecular es que se basa en secuencias nucleotídicas por lo que los datos obtenidos son precisos, electrónicamente transmisibles y de consulta inmediata vía internet. El MLST se ha convertido en el método de elección para la caracterización de muchas bacterias además de *S. pneumoniae*, así como de hongos.

El proceso de selección de los 7 genes conservados a estudiar, así como de los fragmentos internos a analizar no es universal y en el caso de *S. pneumoniae* los 7 genes estudiados son: *aroE* (shikimato dehidrogenasa), *gdh* (glucosa-6-fosfato dehidrogenasa), *gki* (glucosa kinasa), *recP* (transketolasa), *spi* (signal peptidasa I), *xpt* (xantina fosforibosiltransferasa), *ddl* (D-alanina-D-alanina ligasa).

La base de datos de MLST neumocócica contiene actualmente más de 30.000 aislados distribuidos en más de 10.000 perfiles de MLST (a fecha 11 de febrero de 2016) obtenidos a partir de la enfermedad invasiva grave, otitis media aguda, portador nasofaríngeo etc, así como cepas resistente a la penicilina y multirresistentes.<sup>60</sup>

## **1.4. Prevalencia y mecanismos de resistencia a antibióticos**

Desde 1940 hasta muy recientemente la penicilina ha sido el tratamiento de elección de las infecciones causadas por *S. pneumoniae*. Aunque actualmente sigue siendo el tratamiento de elección de la inmensa mayoría de las infecciones neumocócicas, se pasó por una etapa donde la disminución de la sensibilidad de las cepas a este antimicrobiano influyó en que se relegara su indicación. La primera cepa resistente a penicilina no fue descrita hasta 1967; esta cepa fue aislada en un paciente de Papua Nueva Guinea.<sup>62</sup> El aumento del consumo antibiótico a nivel mundial ha contribuido a la emergencia de cepas resistentes y multiresistentes de neumococo. El evento centinela en la epidemiología de la resistencia antibiótica en neumococo fue el brote ocurrido en 1977 en Sudáfrica causado por una cepa multiresistente.<sup>63</sup> Esta cepa además de tener alto nivel de resistencia a penicilina, era también resistente a eritromicina, clindamicina, tetraciclina y cloranfenicol.

### **1.4.1. Resistencia a beta-lactámicos**

Los antibióticos betalactámicos se caracterizan químicamente por la presencia de un anillo beta-lactámico y su mecanismo de acción radica en inhibir la síntesis de la pared celular. Tienen actividad bactericida, escasa toxicidad y amplio margen terapéutico.<sup>64</sup>

Los antibióticos beta-lactámicos se unen covalentemente a las enzimas responsables de la síntesis de la pared bacteriana o *penicillin-binding proteins* (PBPs), interfiriendo así en la síntesis del péptido glicano.<sup>65</sup>

El mecanismo por el cual el neumococo se hace resistente a los betalactámicos implica la alteración en las PBPs como consecuencia de la adquisición de varias mutaciones que se traduce en una disminución de la afinidad por el antibiótico.

En neumococo existen 5 PBPs de alto peso molecular (1a, 1b, 2X, 2a y 2b) y una de bajo peso molecular.<sup>66</sup> Las alteraciones en las PBP2X y 2b son las que confieren bajo nivel de resistencia y son el prerrequisito para el alto nivel de resistencia mediada por la mutación en otras PBPs como la PBP1a.<sup>67 68</sup> En la mayoría de los aislados clínicos las mutaciones se encuentran principalmente en estas tres PBPs.

En neumococo, los genes que codifican las PBPs alteradas se denominan genes con “estructura en mosaico”. Esta característica se refiere a la inserción en los genes de las PBPs de los neumococos de “bloques” o fragmentos de nucleótidos largos y homólogos procedentes de otras especies relacionadas de estreptococos del grupo viridans resistentes a betalactámicos que sustituyen las secuencias originales. Por tanto, el origen de estos “genes mosaicos” parece estar en especies de estreptococos relacionadas como *S. sanguis*, *S. mitis* y *S. oralis*, ya que se han encontrado bloques de genes muy parecidos e incluso idénticos en estas especies.<sup>69</sup>

Según los datos del Centro Nacional de Microbiología, la resistencia a penicilina (disminución de su sensibilidad) en España de cepas de neumococo causantes de enfermedad invasiva aumentó progresivamente del 6% en 1979 hasta el 44,4% en 1989. Posteriormente, de 1990 a 1998, la prevalencia no sufrió grandes oscilaciones (de 34,5% a 43,7%) y a partir de 1990 hasta 2008, la resistencia empieza a descender, siendo en 2008 del 22,3%.<sup>70</sup>

La disminución de la sensibilidad a penicilina (CMI >0,06 µg/mL) no indica que este fármaco no pueda ser utilizado eficazmente en el tratamiento de la mayoría de estas infecciones. Con exclusión de las infecciones del Sistema Nervioso Central y excepcionalmente algunas otras, la mayoría de las cepas con sensibilidad disminuida responderán al tratamiento con penicilina G o con ampicilina parenteral a dosis adecuadas y entre ellas, algunas incluso al tratamiento oral con amoxicilina con las dosis adecuadas.

#### **1.4.2. Resistencia a fluoroquinolonas**

Existe un número muy amplio de antimicrobianos pertenecientes a esta familia pero son las denominadas quinolonas de 3<sup>a</sup> o 4<sup>a</sup> generación las que son activas frente a neumococo.<sup>64</sup> Todas ellas incorporan un átomo de flúor en su estructura y se conocen como fluoroquinolonas: levofloxacino, ciprofloxacino y moxifloxacino son las más utilizadas. El mecanismo de acción es bastante complejo y todavía sin explicación completa, aunque su acción principal es inhibir la acción de la girasa bacteriana, involucrada en el proceso de replicación, recombinación y reparación del DNA de la bacteria.

En las cepas clínicas, la resistencia a fluoroquinolonas está mediada por mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB* que codifican la girasa y en los genes *parC* y *parE* que codifican las topoisomerasa IV.<sup>71</sup> En el caso de la resistencia de neumococo a ciprofloxacino, ésta se produce gradualmente, con una primera mutación puntual inicial en la topoisomerasa *parC*, que produce una resistencia de bajo nivel y una mutación posterior en el *gyrA*, que inducirá niveles altos de resistencia.<sup>72 73</sup> Recientemente también se ha descrito un mecanismo de resistencia mediada por bombas de eflujo en cepas clínicas resistentes a fluoroquinolonas.<sup>74 75</sup>

En España por el momento las tasas de resistencia a fluoroquinolonas se mantienen bajas en cifras en torno al 2%.<sup>76-78</sup>

### 1.4.3. Resistencia a macrólidos

Los macrólidos tienen naturaleza básica y presentan un anillo lactónico macrocíclico al que se une uno o varios desoxiazúcares o aminoazúcares. Su clasificación se basa en el número de átomos de carbono del anillo macrocíclico:

- La eritromicina y la claritromicina tienen un anillo de 14 átomos y dos azúcares.
- La azitromicina tiene un anillo de 15 átomos.
- Con anillo de 16 átomos: josamicina, espiramicina....

En cuanto al mecanismo de acción, los macrólidos actúan uniéndose a la unidad 50S del ribosoma e inhibiendo la síntesis de proteínas en la fase de elongación.

Los macrólidos considerados en principio como antibióticos bacteriostáticos, pueden ser también bactericidas según el microorganismo frente al que actúen, así como de las concentraciones administradas y del tiempo de exposición.<sup>64</sup>

Existen dos mecanismos de resistencia a macrólidos descritos para neumococo. Uno de ellos es debido a la modificación de la diana o sitio de unión del macrolido al ribosoma. Este mecanismo de resistencia se debe a los genes *erm* que codifican metilasas que alteran el sitio de unión del antibiótico en el dominio V del RNAr 23S.

Esta metilación origina además resistencia cruzada a todos los macrólidos, a la clindamicina y a la estreptogramina B, denominándose a este fenotipo de resistencia  $MLS_B$  (del inglés Marolides-Lincosmides-Streptogramin B).

Otra alteración que provoca modificación en la diana son las mutaciones en las secuencias de las bases del RNAr 23S y de la proteína ribosomal L4.<sup>64</sup>

El otro gran mecanismo de resistencia se debe a una bomba de expulsión activa del antibiótico codificada por los genes *mef*, también llamado fenotipo M, que confiere resistencia a los macrólidos con anillos de 14 y 15 átomos de carbono. Además en neumococo se ha descrito que en la expulsión de macrólidos, además del gen *mef*, también está implicado el gen *mel* (codifica proteínas transportadoras del tipo ABC).<sup>64</sup>

El fenotipo MLSb suele generar mayores niveles de resistencia a macrólidos (CMI  $\geq 32$ mg/L) que el fenotipo M (CMI 1-16mg/L). En España y resto de países europeos la mayoría de los neumococos resistentes a macrólidos presentan el fenotipo MLSb mientras que en Estados Unidos el fenotipo M es el más prevalente.<sup>64 78 79</sup>

Las tasas de resistencia a macrólidos en España se mantenían por debajo del 5% hasta 1986, aumentando hasta un 28% en 2001, siendo del 21,8% en 2008 en cepas de neumococo causantes enfermedad invasiva.<sup>70</sup>

Sin embargo la tasa de resistencia de neumococo a macrólidos puede variar mucho en función de la población y tipo de infección que esté causando. Así, en un estudio realizado en nuestra región de neumococos causantes de otitis media en niños menores de 5 años, la tasa de resistencia a eritromicina fue del 49,2% en aislados obtenidos entre 1999 y 2001, disminuyendo la resistencia al 36,3% en el periodo 2008-10.<sup>80</sup> Sin embargo en la prevalencia en cepas causantes de neumonía en pacientes >65 años en la misma región en el periodo 2005-2008 fue del 12,5%.<sup>81</sup>

#### **1.4.4. Resistencia a tetraciclinas**

Las tetraciclinas tienen en su estructura un tetraciclo de naftacencarboxamida, e inhiben la síntesis proteica mediante su unión a subunidad ribosómica 30S de forma reversible. Son agentes bacteriostáticos y es necesario que la bacteria se encuentre en fase de crecimiento para que ejerzan su acción.<sup>64</sup> Las tetraciclinas se clasifican en función de su semivida; así dentro de aquellas con una semivida inferior a doce horas se encuentra por ejemplo la tetraciclina y con semivida superior a doce, la doxicilina y

la minociclina.

El mecanismo principal mediante el cual el neumococo adquiere resistencia a las tetraciclinas incluyen la protección del ribosoma mediada por los genes *tet(M)* y *tet(O)* que están asociados a elementos genéticos móviles (transposones). El mecanismo preciso por el cual las proteínas Tet M y TetO protegen al ribosoma de la acción de las tetraciclinas no ha sido todavía aclarado.<sup>64</sup>

La prevalencia de cepas resistentes en Gipuzkoa, en un estudio realizado en niños menores de 5 años en el periodo 1999-2001 fue del 43,2%, disminuyendo al 34,4% en el periodo 2008-2010.<sup>80</sup> La prevalencia en cepas causantes de neumonía en adultos mayores de 65 años fue menor, siendo del 9,2% en el periodo 2005-2008.<sup>81</sup>

#### **1.4.5. Resistencia a cloranfenicol**

El cloranfenicol, el primer antibiótico de amplio espectro usado en medicina, es un derivado del ácido dicloroacético. Es bacteriostático y actúa inhibiendo la síntesis proteica, impidiendo la elongación de la cadena peptídica al bloquear específicamente la peptidil transferasa durante la traslación.<sup>71</sup> En neumococo la resistencia al cloranfenicol se debe a la producción de un enzima (cloranfenicol acetiltransferasa) que cataliza la conversión del cloranfenicol a derivados que no se pueden unir a la subunidad 50S y que por lo tanto no pueden inactivar la peptidil transferasa. En cuanto a la tasa de resistencia del cloranfenicol en Guipuzkoa ésta se mantiene por debajo del 7% tanto en cepas causantes de otitis en niños como en cepas causantes de neumonía y exacerbación de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).<sup>80 81</sup>

#### **1.4.6. Resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol**

La combinación de trimetoprim y sulfametoxazol (cotrimoxazol) (SXT), se ha usado extensamente para el tratamiento de las infecciones del tracto respiratorio inferior.<sup>71</sup> La estructura de la sulfamida es análoga a la del ácido paraaminobenzoico (PABA), que es un factor de desarrollo necesario para la síntesis del ácido fólico en las bacterias; el sulfametoxazol compete con la enzima dihidropteroato sintetasa (DHPS) evitando la síntesis del ácido fólico, imprescindible para la supervivencia bacteriana. El

trimetoprim actúa también en la síntesis del ácido fólico pero un paso intermedio distinto a las sulfamidas, inhibiendo la dihidrofolato reductasa (DHFR). Se trata de un antibiótico con actividad bacteriostática.<sup>64</sup> En cuanto al mecanismo de resistencia en neumococo, en el caso del trimetoprim se debe a una sustitución de un único amino ácido en el gen que codifica la DHFR.<sup>71</sup> La resistencia al sulfametoxazol es debida a alteraciones en el gen que codifica para la DHPS (duplicaciones).

En un estudio realizado en pacientes adultos en Gipuzkoa, la tasa de resistencia en cepas causantes de neumonía fue del 17% en el periodo 2005-2008.<sup>81</sup>

#### **1.4.7. Resistencia a gluco péptidos**

Los gluco péptidos son un grupo de antibióticos con estructura peptídica siendo vancomicina y teicoplanina los dos antibióticos disponibles.

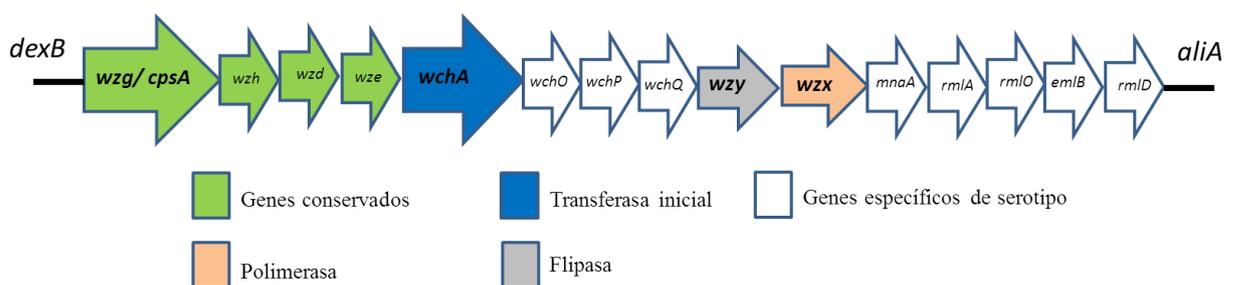
Los antibióticos gluco péptidos como vancomicina y teicoplanina, actúan a nivel de la síntesis de la pared bacteriana impidiendo la polimerización del péptidoglicano<sup>64</sup> y no son antibióticos de primera elección para el tratamiento de la enfermedad neumocócica. Se consideran como alternativa en caso de resistencia a betalactámicos y hasta la actualidad no se han descrito cepas de neumococo resistentes.<sup>71</sup>

## 1.5. Cepas acapsuladas de neumococo

En neumococo todos los genes necesarios para la producción de la cápsula polisacárida se encuentran juntos en un mismo locus, el cual se denomina como locus capsular o *cps* y cada serotipo posee una única combinación de genes capsulares o alelos.<sup>82 83</sup>

Dentro del cromosoma de neumococo, el locus *cps* se sitúa entre el gen *dexB* (gen del glucano 1,6-alfa-glucosidasa) y el gen *aliA* que codifica para el oligopéptido transportador ABC y tanto el gen *dexB* como el *aliA* no participan en la síntesis capsular (Figura 12).<sup>82 83</sup> En todos los serotipos de neumococo excepto el 3 y 37, la síntesis de los polisacáridos capsulares y su transferencia a la superficie celular está mediada por la ruta dependiente del gen *wzy*: esta ruta consiste en varias transferasas que crean una subunidad de polisacárido que es polimerizada en el interior de la bacteria y translocada a través de la membrana celular.<sup>82</sup>

Como se mencionó anteriormente los serotipos 3 y 37 tienen una ruta alternativa a la denominada como *wzy*. En estos dos serotipos hay un gen que codifica para una única sintetasa que es la responsable de la producción de la capsula en estos serotipos.<sup>83 84</sup> Curiosamente estos dos serotipos 3 y 37 son de aspecto mucoide debido a la gran cantidad de polisacárido externo producido.



**Figura 12.** Representación de los genes del locus *cps* del serotipo 19F.

Cuando se realiza el serotipado mediante la técnica de Quellung y la cepa objeto de estudio no muestra reacción frente a los antisueros capsulares (cepa “no tipable”) debemos sospechar que pueda tratarse de una cepa acapsulada. Hoy en día, gracias a

técnicas basadas en la biología molecular es posible confirmar la presencia o no de los genes capsulares utilizando una secuencia de cebadores que amplifique una zona común conservada presente en el loci capsular como es el caso de la región *cpsA*.<sup>85</sup>

A menudo en la literatura la denominación utilizada para referirse a cepas acapsuladas es la de “no tipables” y la epidemiología, filogenia y biología de las cepas no capsuladas de neumococo es todavía bastante desconocida. En el estudio realizado por Hathaway *et al*<sup>86</sup> analizaron en detalle la región capsular de cepas acapsuladas y vieron que existe un grupo de cepas acapsuladas que mantienen los típicos genes capsulares pero con una determinada mutación en el locus capsular, y por otro lado existe otra agrupación muy distinta en donde los genes capsulares han sido sustituidos por secuencias homólogas al gen *aliB*.

Las cepas de neumococos acapsuladas al estar desprovistas de la cápsula, principal factor de virulencia, son menos virulentas que las cepas capsuladas tal y como demostraron Kim *et al*<sup>87</sup> en un modelo animal. Sin embargo el aumento de su capacidad de colonización nasofaríngea por su mejor adherencia al epitelio respiratorio y su capacidad para transformarse son características importantes en este tipo de neumococos.<sup>88-90</sup>

A pesar de que las cepas acapsuladas son poco virulentas y raramente se han descrito como causantes de enfermedad neumocócica invasiva, sí pueden causar enfermedad y son considerados principalmente como agentes causantes de conjuntivitis . Fue en una publicación de 1977 en donde por primera vez se observó que cepas de neumococo “no tipables” eran mucho más prevalentes en muestras conjuntivales que en muestras de otras localizaciones.<sup>91</sup>

Además las cepas acapsuladas de neumococo son responsables de brotes de conjuntivitis que se dan frecuentemente en población institucionalizada. Existen varias publicaciones que describen brotes de conjuntivitis por neumococos acapsulados en EEUU siendo unos pocos genotipos los responsables.<sup>92 93</sup> También parece que las conjuntivitis esporádicas (no relacionado con brotes) son causadas por unos pocos genotipos.<sup>94 95</sup>

## **1.6. Vacunas antineumocócicas**

Actualmente existen dos grupos de vacunas para prevenir la enfermedad neumocócica: la vacuna polisacárida, que fue la primera en comercializarse y las vacunas conjugadas, más modernas. La vacuna de polisacáridos, disponible en USA desde 1983 y comercializada en España en Junio de 1999, previene frente a la infección por 23 serotipos de *S. pneumoniae*, que son los serotipos que con mayor frecuencia causan enfermedad neumocócica invasiva. Esta vacuna está indicada para personas mayores de 65 años e inmunodeprimidos. La principal limitación de esta vacuna polisacárida radica en la condición timo-independiente de los antígenos polisacáridos, por lo que no es inmunógena en niños menores de 2 años y no genera memoria inmunológica.<sup>33</sup> Los 23 polisacáridos capsulares incluidos en la formulación son: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F.

Las vacunas conjugadas, en las que cada uno de los polisacáridos de los diferentes serotipos se unen independientemente a una proteína transportadora o *carrier*, convierten la respuesta a los antígenos capsulares en timo-dependientes y por lo tanto son capaces de estimular el sistema inmune de los niños menores de 2 años generando una buena respuesta de anticuerpos y memoria inmunológica. Además estas vacunas conjugadas, aparte de prevenir de la enfermedad neumocócica invasiva, previenen también la colonización nasofaríngea.<sup>33</sup>

La primera vacuna conjugada frente a neumococo, la vacuna neumocócica conjugada 7-valente (VNC7) (Prevenar-7<sup>®</sup>-Pfizer), fue comercializada en Febrero del año 2000 en Estados Unidos y un año más tarde en España. Los serotipos incluidos son el 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F y los polisacáridos de estos serotipos están conjugados con la proteína transportadora CRM197 que es una variante no tóxica del toxoide diftérico. En 2009 se comercializó la vacuna 10-valente (Synflorix<sup>®</sup>-GSK), que contiene polisacáridos derivados de 10 cepas diferentes de neumococo (los de la 7-valente además del 1, 5 y 7F), ocho de ellos conjugados con una proteína transportadora

(proteína D) derivada del *H. influenzae* no tipable. Desde junio de 2010 se encuentra comercializada la vacuna neumocócica conjugada 13-valente (VNC13) (Prevenar-13<sup>®</sup>) que incluye los serotipos de la 7 valente más los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F y 19A y es la vacuna que se está utilizando actualmente en la población infantil. Desde 2013 esta vacuna 13 valente también ha sido autorizada para prevenir la enfermedad neumocócica invasiva en pacientes adultos, inicialmente en mayores de 50 años y posteriormente en adultos de 18 o más años de edad. En el caso de los adultos, solamente hace falta administrar una única dosis de la vacuna.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



*S. pneumoniae* forma parte de la microbiota nasofaríngea de las personas sanas; la colonización comienza poco después del nacimiento y se estima que la tasa de portación nasofaríngea en niños menores de 2 años está entre 30-62% disminuyendo este porcentaje a lo largo de la vida.<sup>46 47 96</sup> Neumococo, además de ser un colonizador, es un importante patógeno y produce un amplio y variado espectro clínico de infecciones entre las cuales se encuentra la infección ocular. Desde el punto de vista clínico, la infección ocular neumocócica se puede dividir en dos grandes entidades: la conjuntivitis y las infecciones internas, más invasivas y generalmente más graves.

La conjuntivitis infecciosa aguda es la infección oftálmica más frecuente y es especialmente prevalente en la edad pediátrica. Se estima que 1 de cada 8 niños sufre un episodio de conjuntivitis al año<sup>6</sup> y se trata de una de las consultas más frecuentes en atención primaria a pesar de su baja morbilidad.<sup>97</sup> *S. pneumoniae* junto con *H. influenzae*, *S. aureus* y *M. catarrhalis* es uno de los principales microorganismos causantes de conjuntivitis bacteriana. Además neumococo se ha descrito también como un agente causal de otras afecciones oftálmicas distintas a la conjuntivitis, menos frecuentes pero de mayor gravedad como la endoftalmitis y queratitis.<sup>2 98</sup>

El Hospital Universitario Donostia es el hospital de referencia de Gipuzkoa y atiende una población de unos 500.000 habitantes. El Servicio de Microbiología recibe las muestras de pacientes con sospecha de infección oftálmica atendidos tanto en el hospital (principalmente en el servicio de urgencias) como de ambulatorios, obteniéndose así una muestra no sesgada que refleja la realidad epidemiológica de nuestra región.

Actualmente existen más de 100 serotipos de *S. pneumoniae* y unos son mucho más prevalentes que otros como causa de enfermedad neumocócica: por ejemplo, en la enfermedad neumocócica invasiva, un número de serogrupos no superior a 11 causan alrededor del 75% de las infecciones.<sup>42</sup> Un 48% de las otitis en niños en nuestro entorno son causadas por 3 serotipos principalmente: 19A, 19F y 3.<sup>99</sup>

Por su cercanía anatómica y por estar estrechamente relacionados con otras estructuras del sistema respiratorio superior, los resultados de este estudio de la conjuntivitis neumocócica serán frecuentemente discutidos con los ya publicados sobre otitis media con el objetivo de encontrar semejanzas y diferencias entre ambas infecciones, en un periodo de tiempo semejante, en una misma zona geográfica, en una población estable.

La hipótesis inicial de la presente tesis fue que la epidemiología de las conjuntivitis neumocócicas y las características de los neumococos debían ser muy similares a la de los neumococos causantes de otras infecciones locales, como la otitis media aguda. La evolución epidemiológica de las conjuntivitis neumocócicas en el tiempo, en relación a prevalencia de serotipos y susceptibilidad antimicrobiana, debería seguir una dinámica paralela a la sufrida por los neumococos causantes de enfermedad invasiva o de infecciones locales que se han visto grandemente influenciadas por el efecto de las vacunas conjugadas.

Tras revisar la literatura se pudo constatar que existían muy pocas series que estudiaran las infecciones neumocócicas oculares, lo que abría el campo a una fructífera investigación, siendo novedoso y de especial interés profundizar en el estudio de las cepas carentes de cápsula causantes de episodios esporádicos de conjuntivitis.

Por todo ello los objetivos de la presente Tesis Doctoral fueron los siguientes:

### **Objetivos principales**

1. Realizar un estudio retrospectivo descriptivo de la conjuntivitis neumocócica entre los años 1999 y 2013 en Gipuzkoa, analizando aspectos epidemiológicos generales como: estacionalidad de la infección, grupos de edad,...
2. Analizar la evolución y dinámica de los serotipos causantes de conjuntivitis neumocócica y su relación con la introducción de las vacunas conjugadas.

3. Estudiar la sensibilidad antimicrobiana de las cepas, su evolución a lo largo del periodo de estudio y la influencia que ejercieron las vacunas conjugadas sobre la prevalencia de cepas resistentes causantes de conjuntivitis.
4. Caracterizar las cepas no serotificables, estudiando en mayor detalle aquellas que carecen de cápsula (acapsuladas) investigando a nivel molecular su pertenencia a clones epidémicos propios de las conjuntivitis.
5. Describir los episodios recurrentes de conjuntivitis neumocócica (recaídas y reinfecciones) y las conjuntivitis neumocócicas en coinfección con otros microorganismos.

#### **Objetivo secundario**

Realizar una breve descripción de las infecciones oftálmicas neumocócicas distintas a la conjuntivitis diagnosticadas entre 1999 y 2013.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



### **3.1 Área geográfica**

El Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Donostia está situado en la ciudad de Donostia-San Sebastián, capital de Gipuzkoa. Es el Hospital de referencia de la provincia y en los años en los que se realizó el estudio atendía a una población de 492.117 habitantes de acuerdo con el censo de 2011 elaborado por el Instituto Vasco de Estadística- EUSTAT, lo que representó el 69,8% de la población de Gipuzkoa.

El Servicio de Microbiología está ubicado en la primera planta del edificio Aranzazu y recibe para su análisis microbiológico todas las muestras de los pacientes que atienden los Servicios del Hospital y los Centros de Salud de las comarcas de Donostialdea, Urola costa y Tolosaldea (excepto Azpeitia, Azkoitia, Beizama y Errezil). En 2011 se incluyó la comarca de Bajo Bidasoa. A lo largo de los años del estudio, la población total atendida por el hospital no ha sufrido grandes variaciones (Tabla 5).

**Tabla 5.** Población atendida por el Hospital Universitario Donostia entre 1996 y 2011 distribuida por grupos de edad y población total de Gipuzkoa (fuente: EUSTAT).

<b>Grupos de edad</b>	<b>1996</b>	<b>2001</b>	<b>2006</b>	<b>2011</b>
0-4 años	13.622	17.128	19.509	23.068
5-14 años	35.369	31.995	33.810	45.837
15-19 años	27.579	19.434	16.382	20.306
20-64 años	252.280	254.877	257.562	300.870
>65 años	68.126	73.981	78.482	102.036
0-14 años	48.991	49.123	53.319	68.905
>15 años	347.985	348.292	352.426	423.212
<b>Total</b>	396.976	397.415	405.745	492.117
	(58,7%)	(59%)	(59,1%)	(69,8%)
<b>Población total Gipuzkoa</b>	<b>676.208</b>	<b>673.563</b>	<b>686.665</b>	<b>705.210</b>

### **3.2. Muestras estudiadas y diseño del estudio**

Se incluyeron todos los aislamientos de *S. pneumoniae* cultivados a partir de muestras oftálmicas de pacientes con diagnóstico de conjuntivitis y otras infecciones oculares que afectaban a la córnea y a la parte interna del ojo realizados entre los años 1999 y 2013. La disponibilidad de las cepas para su estudio completo fue criterio de inclusión necesario.

Se recogieron los siguientes datos de los pacientes: edad, sexo y diagnóstico. Además en los pacientes con infección ocular distinta a la conjuntivitis se registró el antecedente de intervención quirúrgica previa y el tratamiento antibiótico recibido. Los datos se recogieron mediante la revisión de las historias clínicas digitalizadas.

Se registró también el microorganismo acompañante a neumococo en caso de coinfecciones.

Durante todo el periodo de estudio no se produjeron modificaciones significativas ni en los procedimientos microbiológicos realizados ni en los medios de cultivo empleados.

Se consideraron del mismo episodio aquellos aislamientos realizados en muestras del mismo paciente pertenecientes al mismo serotipo y genotipo y aisladas en un intervalo de tiempo inferior a 14 días.

Se definió como episodio de conjuntivitis **recurrente** a los episodios de conjuntivitis neumocócica repetidos registrados en un mismo paciente; **recaída** cuando el episodio recurrente era producido por el mismo serotipo y genotipo y **reinfección** cuando era producido por un serotipo y/o genotipo distinto.

## PROCEDIMIENTOS

### **3.3. Detección e identificación de *S. pneumoniae***

Todas las muestras oculares recibidas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Donostia se cultivaron en placas de agar sangre comerciales compuestas de Agar Tripticasa de Soja (TSA) suplementada con un 5% de sangre de carnero y agar chocolate y se incubaron durante 24-48h a 37°C en atmósfera enriquecida al 5% de CO<sub>2</sub>. Aquellos aislamientos cuyas características morfológicas coincidían con las de *S. pneumoniae* (morfología típica de la colonia y presencia de un halo verdoso de alfa-hemólisis alrededor de las colonias) se identificaron presuntamente como *S. pneumoniae* y se sometieron al test de sensibilidad a la optoquina para confirmar su identificación.

#### **3.3.1 Prueba de sensibilidad a optoquina**

El test de sensibilidad a optoquina se realizó como prueba para la identificación de neumococo. Para este trabajo se utilizaron discos de papel de 6 mm de diámetro, conteniendo una carga de 5 µg de cupreína (Becton Dickinson and Company, BBL, referencia 231048). Se estudió mediante la técnica de difusión en disco empleando placas de agar sangre comercial.

Las colonias alfa-hemolíticas sospechosas de ser neumococo se sembraron sobre placas de agar sangre y se puso encima un disco de optoquina. La aparición de una zona de inhibición de crecimiento mayor de 14 mm de diámetro alrededor del disco de optoquina tras 24 horas de incubación a 37°C en atmósfera enriquecida al 5% de CO<sub>2</sub> se consideró como prueba definitiva para su identificación y emisión del informe positivo a neumococo por parte del Servicio de Microbiología.

### **3.4. Medio de transporte y congelación**

Los aislamientos de *S. pneumoniae* se congelaron a -80°C en un medio enriquecido compuesto por triptona-soja líquida (3g/mL) (Oxoid, Inglaterra), glucosa (5g/mL) (Merck, Alemania), leche desnatada en polvo (Oxoid, Inglaterra) y glicerol (Merck, Alemania). Cada cepa se resuspendió en 3mL del medio de congelado que se dividieron en dos alícuotas de 1,5mL en tubos de plástico estériles identificándose cada uno con el nombre del microorganismo, el número de registro y la fecha de aislamiento, antes de congelarlos a -80°C. Se fue generando una base de datos en Microsoft Access para registrar su ubicación y así facilitar su búsqueda posterior.

### **3.5 Sensibilidad antibiótica.**

#### **3.5.1 Determinación de la susceptibilidad mediante difusión en disco**

La determinación de la susceptibilidad antibiótica de cada aislamiento de *S. pneumoniae* de muestras oculares constituyó parte de la rutina de trabajo del Servicio de Microbiología y se llevó a cabo mediante la técnica de difusión en disco en placas de agar Mueller Hinton suplementadas con 5% de sangre de caballo (Becton Dickinson, Alemania). La técnica se realizó de acuerdo a las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): se debe de partir de un inóculo bacteriano que se ajuste a una turbidez equivalente de MacFarland de 0,5. Los discos de antibióticos (Oxoid hasta finales del 2005 y Neo-Sensitabs, Rosco Diagnostica, entre 2006 y 2013) incluidos en el panel para el estudio de susceptibilidad de estreptococos y sus concentraciones fueron las siguientes: ampicilina (10µg), oxacilina (10µg), clindamicina (2µg), eritromicina (15µg), tetraciclina (30µg), SXT (1,25µg/23,75µg), vancomicina (30µg), rifampicina (5µg) y levofloxacino (5µg). Todas las placas se incubaron durante 20-24 horas a 37°C en una atmósfera que contenía 5% de CO<sub>2</sub>. La interpretación de los halos se realizó según las recomendaciones del CLSI en curso. Como cepa control se utilizó *S. pneumoniae* ATCC49619.

### **3.5.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria**

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) en aquellas cepas que por difusión en disco presentaron resistencia a oxacilina, macrólidos, lincosamidas, SXT, levofloxacino o tetraciclinas. La CMI se realizó mediante microdilución en caldo en placas Sensititre (TREK Diagnostic Systems, Inglaterra, STRHAE1) utilizando el medio líquido Iso-Sensitest (Oxoid, Inglaterra) suplementado con sangre de caballo lisada (3-5%).

La interpretación de valores de CMI se realizó según las recomendaciones del CLSI en curso y las cepas con valores intermedios se consideraron como resistentes. El CLSI no establece un punto de corte para ciprofloxacino y se tomó el mismo punto de corte que dicho documento establece para levofloxacino.

Se consideraron como multirresistentes aquellas cepas que mostraron resistencia a tres o más grupos de antimicrobianos.

Todas las cepas SXT resistentes con  $CMI \geq 4/76 \mu\text{g/mL}$ , se consideraron resistentes a trimetoprim y por tanto resistentes al tratamiento tópico.

Como cepa control también se utilizó *S. pneumoniae* ATCC49619.

## **3.6. Serotipificado**

En este estudio se realizaron tres técnicas para la tipificación de *S. pneumoniae*: Quellung, multiplex-PCR y Pneumoarray<sup>®</sup>.

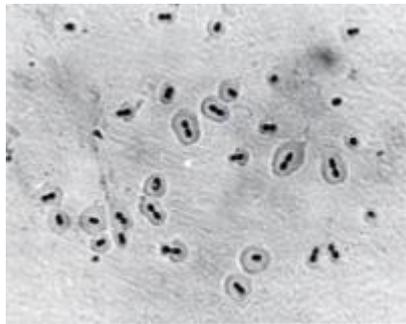
Desde el año 1999 la técnica de tipificado utilizada fue la reacción de Quellung y a partir de 2006 y 2010 se añadieron la multiplex-PCR y Pneumoarray<sup>®</sup> respectivamente. Cuando se utilizaron estos dos últimos métodos la técnica de Quellung fue utilizada para la confirmación del tipificado.

### **3.6.1. Reacción de Quellung**

La reacción de Quellung o Neufeld descrita en 1902 consiste en la visualización de la cápsula “hinchada” al precipitar los polisacáridos capsulares en presencia de anticuerpos específicos (Figura 13). Hoy en día continua siendo el “gold estándar” para el tipificado de *S. pneumoniae*.

La metodología del serotipificado mediante esta técnica brevemente consistió en:

- Se realizó una suspensión del *S. pneumoniae* en caldo Todd-Hewitt (0,5 McFarland), que se colocó en un portaobjetos de vidrio (tantas gotas de la suspensión como el número de antisueros que se pensara probar).
- Una vez seca la alícuota del antígeno, se le añadió un microlitro del antisuero (los antisueros utilizados procedían del Statens Serum Institute de Copenhague, Dinamarca, centro de referencia de la OMS para serotipificado de *S. pneumoniae*).
- Antes de que se secase se colocó sobre ellos un cubreobjetos con una gota de una suspensión acuosa de azul de metileno al 1% que sirvió como fondo de contraste.
- Se observó al microscopio a un aumento de 100x en inmersión.



**Figura 13.** Reacción de Quellung.

En el anexo I (Tablas I y I-bis) se muestran los antisueros polivalentes utilizados, cada uno de los cuales agrupa de 8 a 14 serotipos de *S. pneumoniae* y los distintos factores de diferentes serotipos de *S. pneumoniae* pertenecientes a un mismo serogrupo. En la actualidad hay disponibles 77 factores diferentes y cada antígeno puede ser tipo específico o reaccionar frente a más de un serotipo de *S. pneumoniae*.

### 3.6.2. Serotipificado mediante Pneumoarray<sup>®</sup>

El Pneumoarray<sup>®</sup> (Abyntec), desarrollado conjuntamente con el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Donostia, es una técnica de tipificado en donde los sueros anticapsulares específicos de los distintos serotipos de neumococo se encuentran inmovilizados sobre un porta de vidrio siguiendo un orden determinado en forma de celda (array). Los antisueros utilizados son los mismos que se utilizan en la técnica de referencia o reacción de Quellung (*gold standard*); por tanto son dos técnicas equivalentes siendo el Pneumoarray<sup>®</sup> mucho menos laboriosa y más fácil de interpretar. A diferencia de la reacción de Quellung en donde la lectura del resultado de la cepa a testar necesita de personal entrenado y del uso del microscopio no pudiéndose registrar el resultado, en el caso del Pneumoarray<sup>®</sup> este se realiza con un scanner que permite una lectura de la señal fluorescente sencilla de interpretar y de registrar como archivo de imagen.

En el presente trabajo se ha utilizado la versión 2.0 que sirve para identificar 83 de los 100 serotipos descritos. Concretamente 44 a nivel de serotipo, 18 a nivel de serogrupo y los restantes 21 a nivel parcial de serogrupo. En el Anexo I (Tabla II) se especifican los serogrupos y serotipos incluidos.

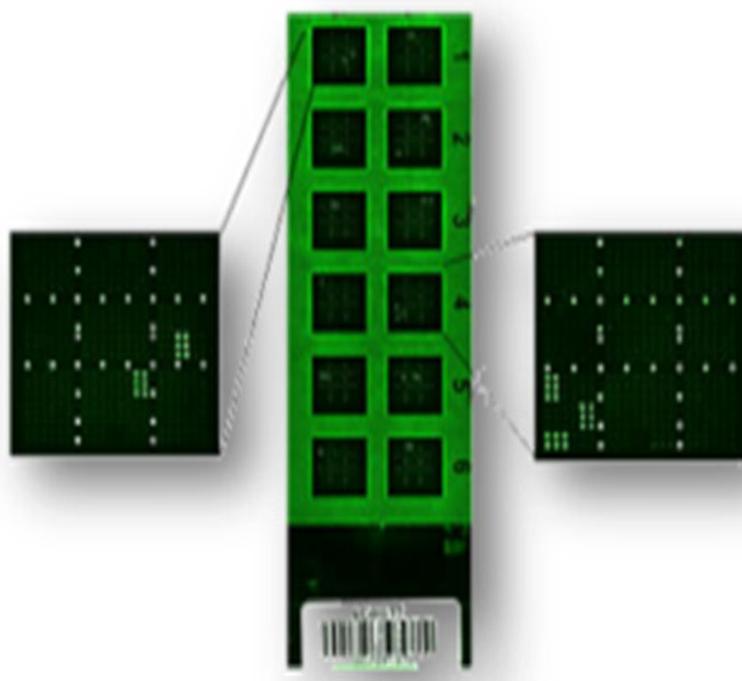
El principio de la prueba se basa en 4 pasos principales: suspensión bacteriana y marcaje de la bacteria, incubación en el array, detección de la fluorescencia y determinación del serotipo. Se han seguido las indicaciones del fabricante y se resumen a continuación:

- La suspensión bacteriana se realiza a partir de cultivo crecido durante 24h en agar sangre (medida de un asa de 1  $\mu$ L). La suspensión se realiza en el “buffer de marcaje” (*labelling buffer*) que suministra el fabricante y posteriormente se mezcla a volumen igual con el reactivo fluorescente de marcaje (*labelling reagent*) previamente diluido 1:10 con el “buffer de marcaje”.
- Esta suspensión bacteriana marcada con fluorescencia, se incuba con los anticuerpos inmovilizados en el array a temperatura ambiente durante 20 minutos.

El array contiene 12 pocillos independientes cada uno de los cuales tiene impresos los spots con 4 a 6 réplicas de cada uno de los antisueros. Por lo tanto se pueden testar a la vez 12 cepas diferentes.

Durante la incubación, el neumococo de un serotipo concreto se une a las 4 ó 6 réplicas de su antisuero específico que se encuentran en una posición concreta del array y que definirá el serotipo o serogrupo. Para retirar el exceso de bacteria que no se ha fijado al antisuero se realizan varios lavados y una vez que el array está seco se procede a la lectura en el scanner de fluorescencia.

El lector de fluorescencia que se ha utilizado es el InnoScan 700 de Innopsys (software Mapix 2.9.5) que utiliza un láser que excita al fluoróforo, en nuestro caso el “reactivo de marcaje”, fijado a la bacteria. La fluorescencia emitida es de color verde y una vez finalizado el escaneado del array se puede observar la imagen obtenida en la pantalla del ordenador (Figura 14). Con ayuda de una plantilla que indica la localización de cada antisuero se determina el serogrupo y/o serotipo de la cepa problema.



**Figura 14.** En el centro imagen del array tras ser escaneado, y a izquierda y derecha imagen ampliada de dos recuadros que corresponderían a dos cepas distintas.

### 3.6.3. Tipificado mediante Multiplex-PCR

El tipificado molecular consiste en la detección de los genes que codifican los distintos serotipos mediante PCR. Para ello es necesario el uso de primers que amplifiquen a un único serotipo, amplificado que posteriormente será detectado por electroforesis en un gel de agarosa. El equipo del Servicio de Microbiología diseñó una estrategia de tipificado basada en cuatro reacciones múltiples. El diseño de la secuencia de los primers se basó en las secuencias disponibles en GenBank utilizando el software incluido en el paquete informático BioTool Kit (BioSupplyNet, California, USA) y las secuencias de los genes capsulares disponibles en GenBank (números de acceso del CR931632 al CR931722). Para los serotipos 1, 3, 4, 6A/B, 14, 18F/A/B/C, 19A, 19F, y 23F se utilizaron los primers descritos por Brito *et al.*<sup>52</sup>

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50µL bajo las siguientes condiciones: 15 min a 95°C para una desnaturalización inicial; 30 ciclos de 30 segundos 94°C, 1 minuto y 30 segundos a 58°C, 1 minuto y 30 segundos a 72°C; y una elongación final de 10min a 72°C. En la Tabla 6 se muestran los serotipos incluidos en las 4 reacciones multiplex, así como el tamaño de los amplicones esperados. En el Anexo I (Tabla III) se detallan las secuencias de los primers utilizados.

Como se observa en la Tabla 6, en el primer pool de primers se incluyó la amplificación del gen de la autolisina de *S. pneumoniae* (gen *lytA*) como confirmación de que el aislamiento que se estaba estudiando se trataba realmente de un neumococo y que además no se producían inhibiciones en la reacción de la multiplex-PCR. En la Figura 15 se muestran los amplificadores obtenidos tras el serotipificado de varias cepas de neumococo.

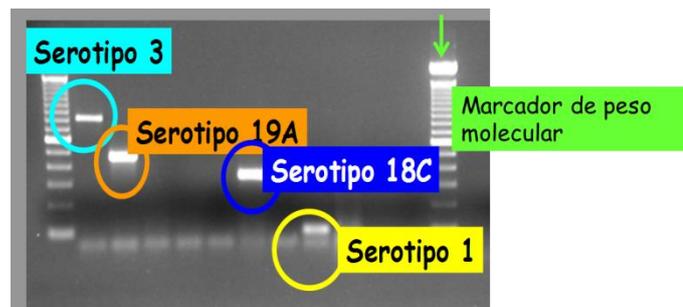
Para la realización de la multiplex-PCR se utilizó el “QIAGEN Multiplex PCR kit” (QIAGEN, ref. 206145). Se trata de un kit comercial que permite la realización de la PCR múltiple de una manera rápida y sencilla y la detección de manera simultánea hasta de un máximo de diecinueve regiones distintas de ADN.

Para la extracción del ADN a partir de las colonias aisladas de neumococo se utilizó el sistema automatizado NucliSens® easyMAG® (Biomeriueux). Este sistema está

basado en la tecnología de extracción con sílice magnetizada y fue el utilizado tanto para la reacción de serotipificado mediante multiplex-PCR como para el resto de las técnicas de amplificación (MLST, detección de genes capsulares, etc.).

**Tabla 6.** Serotipos detectados en cada una de las cuatro Multiplex-PCRs y el amplicón esperado.

PCR 1		PCR 2		PCR 3		PCR 4	
Serotipo	Amplicón	Serotipo	Amplicón	Serotipo	Amplicón	Serotipo	Amplicón
<b>Lyt A</b>	100 bp	<b>1</b>	99 bp	<b>12F/44</b>	138 bp	<b>35F/47F</b>	228 bp
<b>14</b>	268 bp	<b>7A/F</b>	177 bp	<b>6A/B</b>	220 bp	<b>36</b>	297 bp
<b>18 F/A/B/C</b>	354 bp	<b>8</b>	236 bp	<b>11F/A/C/D</b>	262 bp	<b>7B/7C/40</b>	354 bp
<b>4</b>	430 bp	<b>5</b>	344 bp	<b>9N/L</b>	326 bp	<b>21</b>	401 bp
<b>10F/A/B/C</b>	512 bp	<b>19F</b>	408 bp	<b>23F</b>	384 bp	<b>27</b>	453 bp
<b>11F/A/B/C/D</b>	568 bp	<b>19A</b>	478 bp	<b>15B/C</b>	456 bp	<b>16A</b>	502 bp
<b>9A/V</b>	591 bp	<b>33F/A/37</b>	589 bp	<b>23B</b>	512 bp	<b>28F/A</b>	564 bp
<b>3</b>	818 bp	<b>23A</b>	688 bp	<b>17F</b>	587 bp	<b>25F/A/38</b>	610 bp
		<b>22F/A</b>	755 bp	<b>2</b>	669 bp	<b>13</b>	658 bp
				<b>20</b>	874 bp	<b>31</b>	711 bp
						<b>16F</b>	778 bp

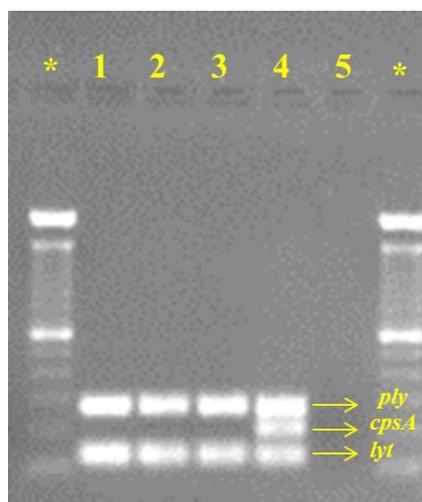


**Figura 15.** Amplificados y serotipo correspondiente obtenido mediante multiplex-PCR.

### 3.6.4. Detección del gen capsular (*cpsA*), gen de la autolisina (*lytA*) y neumolisina (*ply*) mediante PCR

Se realizó una PCR adicional para la detección de gen capsular a aquellas cepas que no tipificaron por ninguno de los tres métodos descritos anteriormente.

Se utilizaron los primers descritos por Pai *et al*,<sup>85</sup> los cuales codifican para el gen capsular *cpsA*: gen altamente conservado y presente en todos los neumococos capsulados. Además se incluyó la amplificación del gen *lytA* (autolisina) y el gen *ply* (neumolisina) como confirmación de que el aislamiento que se estaba estudiando se trataba realmente de un neumococo y que además no se producían inhibiciones en la reacción de la múltiplex-PCR. En el anexo I (Tabla III) se detalla la secuencia de los primers utilizados los cuales fueron descritos por McAvin *et al* y Toikka *et al* para los genes *lytA* y *ply* respectivamente.<sup>100 101</sup> El tamaño de los amplicones para el gen *lytA*, *cpsA* y *ply* fueron de 100pb, 160pb y 208pb respectivamente (Figura 16). Las condiciones de PCR fueron las mismas que las utilizadas para el tipificado mediante multiplex-PCR.



**Figura 16.** En los carriles del 1 al 3 se muestran 3 cepas acapsuladas: amplicones del gen *lyt* y *ply*. Carril 4 cepa capsulada: amplicones del gen *lytA*, *cpsA* y *ply*. Carriles señalados con asterístico: marcador de peso molecular.

### **3.7. Caracterización genotípica**

#### **3.7.1. PFGE**

La PFGE se realizó en base a los protocolos descritos por Lefevre *et al.*<sup>56</sup> En esta técnica, para asegurar que el ADN cromosómico permanezca íntegro y no se fracture, los microorganismos se inmovilizaron en bloques de agarosa al 2% y posteriormente se llevó a cabo la extracción y digestión del genoma completo de la bacteria.

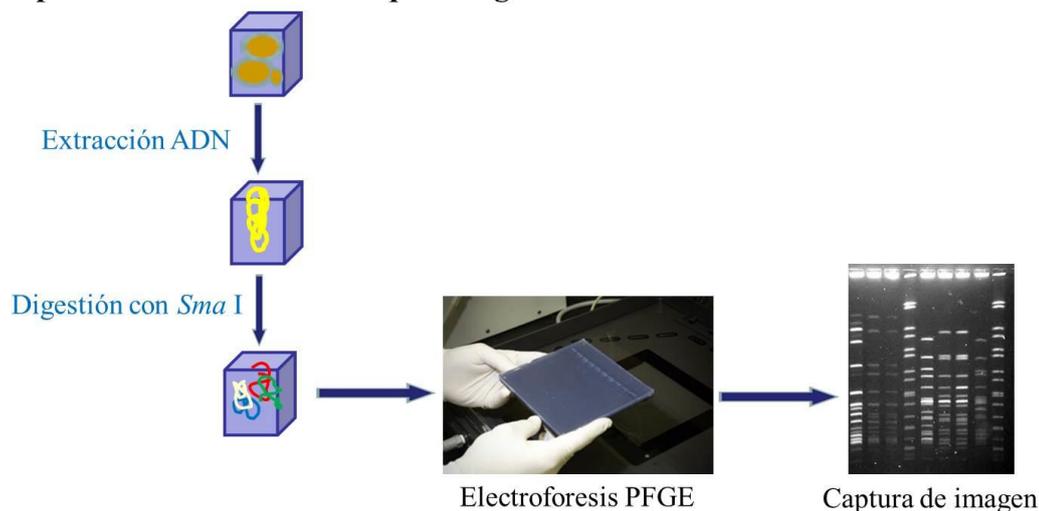
**Procedimiento** (Figura17):

- De un cultivo fresco (24h) en placas de agar sangre se realizó una suspensión con un asa de 10µL en 1000 µL de tampón Tris-EDTA 1X (TE1X: 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA).
- Se centrifugó 5 minutos a 8.000 r.p.m., se retiró el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 800 µL de TE1X. Esa suspensión se ajustó a una densidad óptica (DO) de  $DO_{600nm}=0.5$  de la cual se traspasaron 1500µL a un tubo eppendorf y se centrifugó 5 minutos a 10.000 r.p.m.
- El pellet obtenido se resuspendió en 200 µL de tampón TE1X que se mezcló con 200 µL de agarosa de bajo punto de fusión al 2,4% para formar los bloques.
- Para la extracción del ADN, los bloques se incubaron en 1ml con lisozima (250 µg/mL) 1h a 37°C [960 µL de Buffer de Lisozima + 40 µL Lisozima (6,25 mg/mL)]. A continuación se incubaron durante 4 horas en 1 ml de tampón con Proteinasa K (100 µg/ mL) [960 µl del “Buffer de Proteinasa K” + 40 µl Proteinasa K (2,5 mg/ml)].
- Finalmente los bloques se lavaron en 15 mL de buffer TE 0,1X durante 24 h y se almacenaron a 4°C en tubos con 2 mL de TE 0,1X para su posterior procesamiento.
- Digestión: un tercio del bloque fue sometido a digestión con 25 U.I. del enzima de macrorrestricción *SmaI* (New England Biolabs) durante 4 h a 25°C. La digestión se realizó en 150 µL de tampón de restricción 1X provisto por el fabricante.
- Para resolver el patrón de fragmentos obtenido el ADN digerido se migró en un gel de agarosa al 1% (Agarose D5 Pronadisa, Laboratorios Conda, España) y fue sometido a electroforesis en campo pulsado a 14°C utilizando el sistema CHEF III variable Angle System (Bio-Rad, USA) bajo las siguientes condiciones: pulsos alternantes de una duración de 5-25 segundos, ángulo de reorientación 120° a un voltaje de 200 V

con un gradiente de 6V/cm durante 23 h. En todos los geles se introdujo un marcador de peso molecular Lambda Ladder (NewEngland BioLabs, Inglaterra).

Para su visualización, el gel se tiñó con bromuro de etidio (0,5 mg/L) durante 30 minutos y se aclaró otros 30 minutos en agua. Se visualizó mediante luz UV en el lector de geles Gel Doc (Bio-Rad, USA).

#### Suspensión bacteriana en bloque de agarosa



**Figura 17.** Esquema de trabajo de PFGE.

#### . Construcción de árboles filogenéticos:

Los patrones electroforéticos obtenidos mediante PFGE se analizaron con el programa informático Diversity Database fingerprinting software versión 2 (BioRad, USA). Los dendogramas se construyeron utilizando el coeficiente Dice y una tolerancia de posición del 1% siguiendo el método de pares no ponderados, utilizando media aritmética UPGMA (del inglés “*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*”). Los aislamientos que mostraron una similitud  $\geq 85\%$  en el patrón de PFGE se consideraron como el mismo clon y los distintos perfiles se denominaron arbitrariamente de la A a la Z.

### 3.7.2. MLST

La determinación del ST se realizó siguiendo las recomendaciones descritas en “<http://spneumoniae.mlst.net>” y “<http://www.cdc.gov/streplab/alt-MLST-primers.html>”.

Mediante PCR convencional se amplificaron los fragmentos internos de siete genes conservados, (*housekeeping genes*) *aroE*, *gdh*, *gki*, *recA*, *spi*, *xpt* y *ddl* utilizando los primers descritos en el Anexo I (Tabla III). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL bajo las siguientes condiciones: 10 minutos a 94°C para una desnaturalización inicial; 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 50°C, 1 minuto a 72°C; y una elongación final de 7 minutos a 72°C. Los amplificadores obtenidos se secuenciaron en un secuenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, USA). Se utilizó la página web “blast” para depurar las secuencias hasta obtener el número de nucleótidos específico de cada gen.

Posteriormente las secuencias se introdujeron en la página web “<http://spneumoniae.mlst.net/sql/multiplelocus.asp>.” para obtener la numeración correspondiente de cada alelo. Mediante la combinación del resultado de los siete alelos, a cada cepa se le asignó un ST. A los aislamientos con el mismo perfil alélico en los siete genes secuenciados se les asignó el mismo ST. Los aislamientos que difirieron entre sí en uno de los siete alelos se consideraron variantes de un solo locus (*single locus variant*) y los que difirieron en dos de los siete alelos como variantes de dos locus (DLV o *double locus variant*). Se consideraron dentro del mismo complejo clonal (CC) aquellos incluidos en el mismo grupo según la agrupación realizada por el algoritmo eBURST (<http://ebust.mlst.net/>).

### **3.8. Análisis estadístico**

El programa estadístico utilizado fue el GraphPad InStat versión 3.05.

Se calcularon frecuencias y porcentajes en las variables cualitativas.

La comparación de las frecuencias se realizó mediante la prueba de Chi cuadrado o prueba exacta de Fisher cuando las frecuencias esperadas fueron bajas.

Las frecuencias a lo largo del periodo de estudio se analizaron mediante el test de Chi cuadrado de tendencia lineal.

Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ .

### **3.9. Soporte Informático**

#### **. Base de datos para comparación de secuencias:**

- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> utilidades nucleotide blast.
- MLST: <http://spneumoniae.mlst.net/>

#### **. Análisis de la diversidad genética eBURST:**

- <http://eburst.mlst.net/>

#### **. Búsqueda y gestión bibliográfica:**

- Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- Reference Manager vs12.0



## **4.RESULTADOS**



## Conjuntivitis neumocócica: 1999-2013

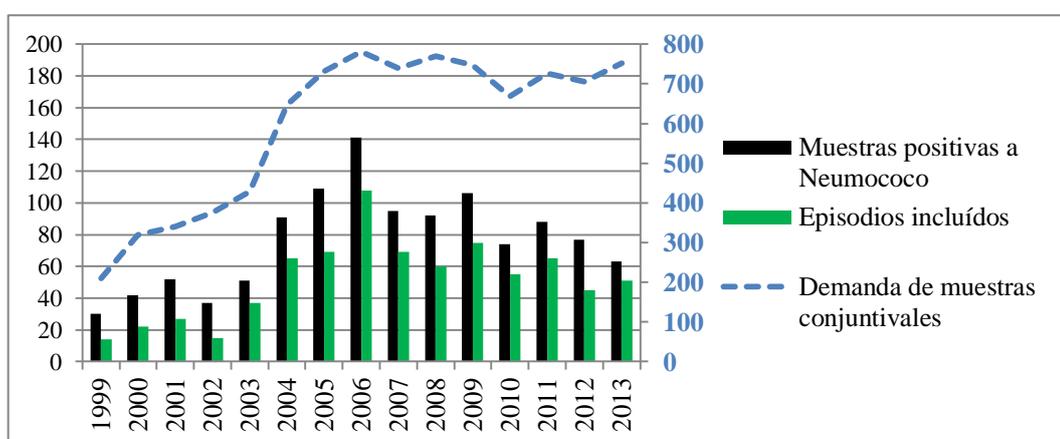
### 4.1. Características generales de la muestra original

Entre 1999 y 2013 se recibieron en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Donostia un total de 8.929 exudados conjuntivales de pacientes con sospecha de conjuntivitis bacteriana para cultivo, de los cuales el 74,4% pertenecieron a pacientes en edad pediátrica (<15 años). Durante la primera mitad del periodo de estudio (1999 a 2006) se observó un incremento llamativo de la demanda ( $p$  para tendencia <0,001) manteniéndose a partir de entonces estable (Figura 18).

Neumococo fue la segunda causa bacteriana de las conjuntivitis, solo precedida por *H. influenzae* acapsulado: en 2.591 muestras se aisló *H. influenzae*, en 1.148 *S. pneumoniae* y en 625 *S. aureus*.

La media anual de muestras positivas a neumococo fue de 76,4 (30-141) y el porcentaje de muestras conjuntivales con cultivo de neumococo se mantuvo estable a lo largo del tiempo [media y mediana similar (12,9%, IC 95% 11,53-14,17)].

El año 2006 se observó el mayor número de episodios de conjuntivitis neumocócica (Figura 18). Pese a que el 2006 coincidió con el pico del aumento de la demanda en la primera mitad del estudio, el porcentaje de positividad (muestras positivas/total muestras) fue también el más elevado (18%), sugiriendo que el aumento se debió a alguna razón epidemiológica y no al azar o a razones atribuibles al método.



**Figura 18.** Distribución anual de la demanda de muestras conjuntivales y episodios de conjuntivitis neumocócicas. Eje derecho: muestras recibidas (demanda).

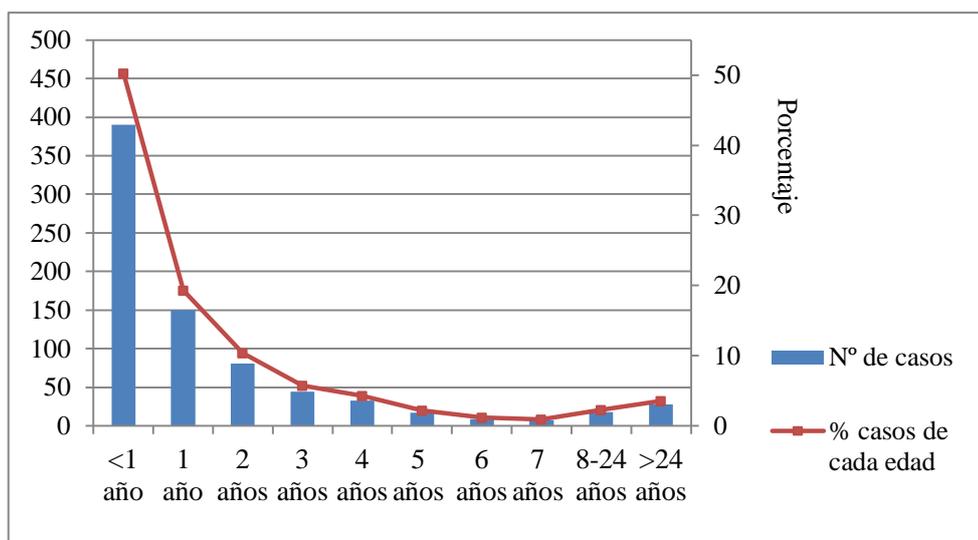
En el presente estudio se incluyeron 777 episodios de conjuntivitis neumocócica. Aunque la selección de la muestra en parte fue debida a la disponibilidad (viabilidad) del aislamiento, la relación entre el número anual de neumococos y el número anual de los seleccionados para este estudio mostró una correlación significativa entre columnas ( $r=0,9778$ ;  $p < 0,001$ ).

#### **4.2. Características generales de los episodios de conjuntivitis incluidos en el estudio**

Los 777 episodios de conjuntivitis neumocócicas se detectaron en 738 pacientes de los cuales 27 sufrieron al menos un episodio recurrente. Por episodios se incluyeron: 738 conjuntivitis agudas simples que aparentemente se resolvieron sin mayores complicaciones y 39 recurrencias (27 enfermos) de las cuales 11 fueron recaídas y 28 reinfecciones. Algo más de la mitad de los episodios se dieron en niños menores de 1 año de edad, acumulando los menores de 5 años casi el 90% (698/777; 89,8%) del total (Tabla 7 y Figura 19), siendo adultos (>14 años) tan solo el 3,8% (28/738) de los pacientes.

**Tabla 7.** Episodios de conjuntivitis neumocócica y número de pacientes por edad. En caso de recurrencias se consideró la edad que tenía el paciente en el primer episodio.

	<b>Episodios</b>	<b>Pacientes</b>
<b>&lt; 1 año</b>	390 (50,2%)	370 (50,1%)
<b>1 año</b>	150 (19,3%)	140 (19%)
<b>2 años</b>	81 (10,4%)	78 (10,6%)
<b>3 años</b>	44 (5,7%)	41 (5,6%)
<b>4 años</b>	33 (4,2%)	31 (4,2%)
<b>5 años</b>	17 (2,2%)	17 (2,3%)
<b>6 años</b>	9 (1,2%)	9 (1,2%)
<b>7 años</b>	7 (0,9%)	6 (0,8%)
<b>&gt;7 años</b>	46 (5,9%)	46 (6,2%)
<b>Total</b>	<b>777</b>	<b>738</b>



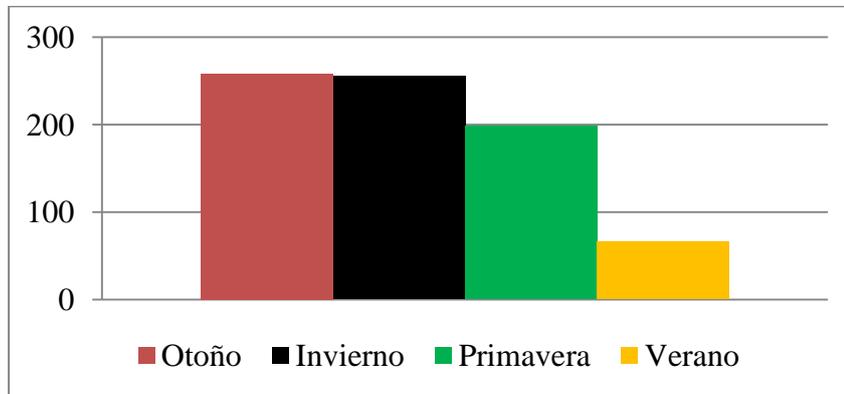
**Figura 19.** Distribución de los episodios de conjuntivitis neumocócica por edad.

De los 777 episodios incluidos la media de episodios por año fue de 52 y el número de hombres y mujeres fue muy similar con un ligero predominio de los hombres (Tabla 8).

**Tabla 8.** Características generales de los episodios de conjuntivitis incluidos en el estudio.

Periodo de estudio	1999-2013
Episodios de conjuntivitis neumocócica	777
Episodios/año	
Media (DE y rango)	51,8 ( $\pm 24,9$ ; 14-108)
Edad	
Mediana (rango intercuartílico)	11,97 meses (4,4 meses-2 años)
Hombres/mujeres	400/377

La mayoría de los episodios se dieron en época fría, contabilizando desde noviembre a febrero el 36,6% de los episodios frente a 17,9% entre julio y octubre. En la Figura 20 se representan los episodios diagnosticados en cada estación del año.



**Figura 20.** Número de episodios ocurridos por estación (Primavera: 21 marzo-20 de junio; Verano: 21 junio-20 septiembre; Otoño: 21 septiembre-20 diciembre; Invierno: 21 diciembre-20 marzo).

---

### **4.3. Caracterización de las cepas de *S. pneumoniae***

De los 777 aislamientos de *S. pneumoniae* causantes de conjuntivitis estudiados, 521 (67,1%) fueron capsulados mientras que los restantes 256 (32,9%) fueron acapsulados, razón por la que no se pudo obtener un serotipo.

#### **4.3.1. Distribución global de los serotipos**

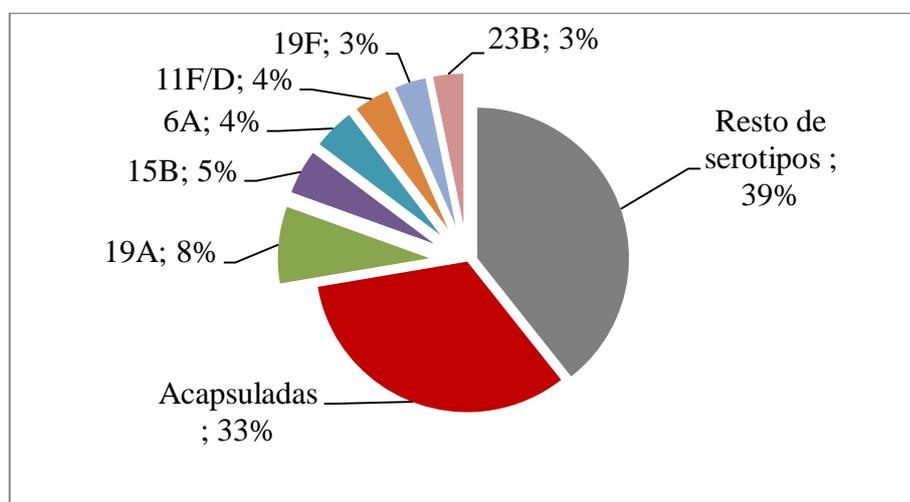
Se detectaron un total de 49 serotipos distintos entre las 521 cepas capsuladas (serotificables). En la Tabla 9 se muestran los 10 serotipos más prevalentes y su distribución anual a lo largo del periodo de estudio. En el Anexo II (Tablas I y I-bis) se especifica esta distribución por trienios y anual de cada uno de los 49 serotipos encontrados.

Por serogrupos, fue el 19 el que causó el mayor número de episodios sumando un total de 90 seguido del serogrupo 6, 23, 15 y 11 que causaron 70, 59, 49 y 43 episodios respectivamente.

**Tabla 9.** Principales serotipos de *S. pneumoniae* causantes de conjuntivitis distribuidos por año de estudio en San Sebastián, Gipuzkoa.

Serotipo	1999-2013	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
<b>19A</b>	64	1	0	2	0	4	3	8	8	8	8	8	5	4	3	2
<b>15B</b>	35	0	0	0	0	3	1	3	2	3	6	5	6	0	3	3
<b>6A</b>	34	2	1	2	1	3	5	0	4	4	2	2	3	2	2	1
<b>11F/D</b>	29	0	0	1	0	0	2	2	1	3	2	2	2	4	6	4
<b>19F</b>	26	1	4	5	1	0	6	3	2	0	1	2	0	0	0	1
<b>23B</b>	25	0	0	0	0	1	0	1	0	2	4	5	3	3	1	5
<b>23F</b>	21	0	1	3	0	4	2	2	7	1	0	1	0	0	0	0
<b>6B</b>	18	2	0	0	4	3	2	3	2	1	0	0	0	0	0	1
<b>6C</b>	18	0	0	0	1	0	2	1	5	1	3	1	1	1	1	1
<b>21</b>	18	0	0	0	0	1	2	0	6	1	1	3	0	1	2	1
<b>Otros serotipos</b>	233	4	4	7	7	5	6	17	20	23	29	19	22	10	29	21
<b>Acapsuladas</b>	256	4	9	7	3	12	23	26	48	16	14	24	25	21	6	18
<b>Total</b>	<b>777</b>	<b>14</b>	<b>22</b>	<b>27</b>	<b>15</b>	<b>37</b>	<b>65</b>	<b>69</b>	<b>108</b>	<b>69</b>	<b>60</b>	<b>75</b>	<b>55</b>	<b>65</b>	<b>45</b>	<b>51</b>

Los 6 serotipos más frecuentes fueron el 19A (n=64), 15B (n=35), 6A (n=34), 11F/D (n=29), 19F (n=26) y 23B (n=25), englobando al 27,4% (213/777) del total de episodios de conjuntivitis. En la Figura 21 se muestra el porcentaje sobre el total de neumococos que representó cada uno de estos serotipos.



**Figura 21.** Distribución de los 6 serotipos más prevalentes sobre el total de cepas.

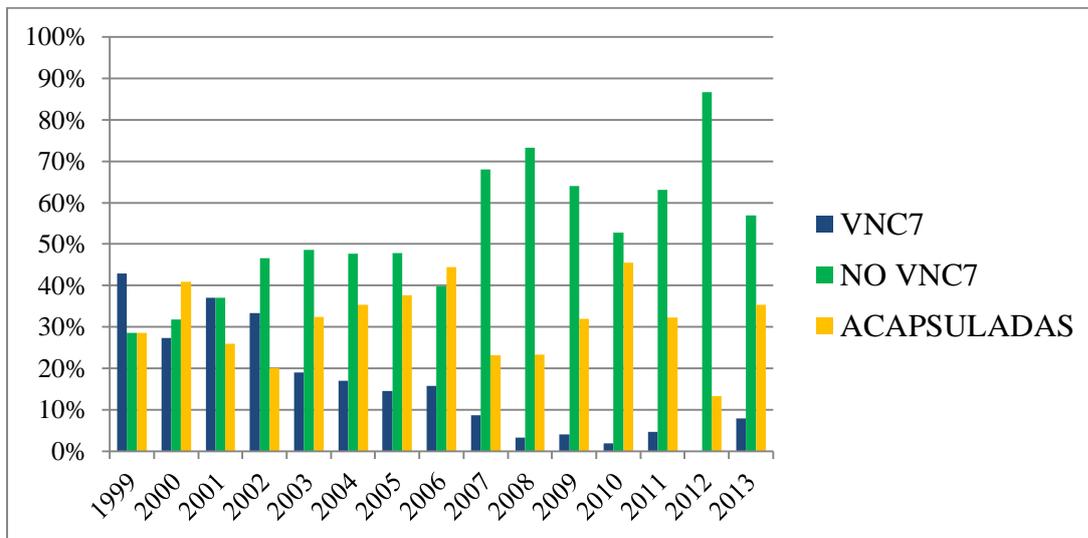
Entre los episodios causados únicamente por las cepas **capsuladas** (n=521), la prevalencia de estos seis serotipos fue la siguiente: 19A (12,3%), 15B (6,7%), 6A (6,5%), 11F/D (5,6%), 19F (5%) y 23B (4,8%).

Como puedo observarse en la Tabla I del Anexo II, en el primer trienio de estudio (1999-2001) el serotipo más frecuente fue el 19F. En el segundo los serotipos 19F y 19A causaron el mismo número de episodios siendo los más prevalente el serotipo 6 A junto con el 6B. De 2005 a 2010 el 19A fue el que causó el mayor número de episodios y el último trienio 2011-2013 fue el serotipo 11F/D el más frecuente.

4.3.1.1. Serotipos vacunales

**Serotipos incluidos en vacuna neumocócica conjugada heptavalente (VNC7)**

A lo largo del estudio, 91 de los 777 episodios de conjuntivitis aguda fueron causados por cepas capsuladas que pertenecían a lo serotipos incluidos en la VNC7 ofreciendo por tanto una cobertura global del 11,7%. Se observó un descenso progresivo (p para tendencia <0,001) en la prevalencia de conjuntivitis causadas por los serotipos cubiertos por la VNC7 a lo largo de los 15 años del estudio (Figura 22).



**Figura 22.** Porcentaje sobre el total de cepas estudiadas en cada año de serotipos incluidos en VNC7, no incluidos y cepas no capsuladas.

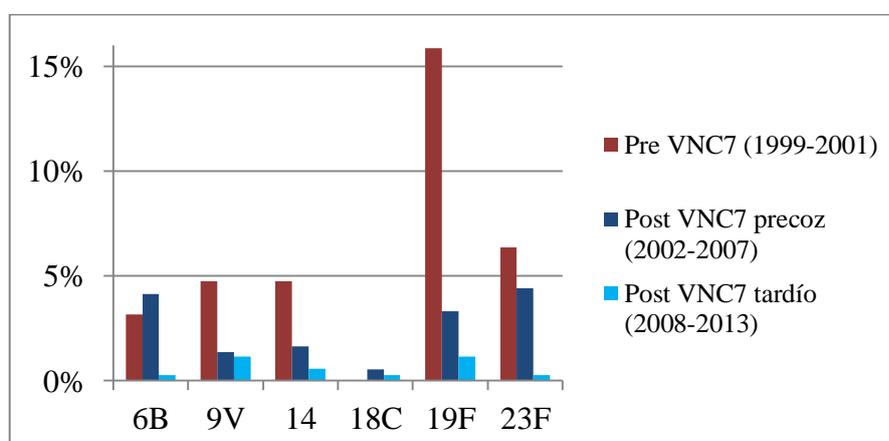
En la Tabla 10 se detalla el número total de episodios de conjuntivitis neumocócica de cada año y el porcentaje de las conjuntivitis causadas por serotipos incluidos en la VNC7. Al comparar la prevalencia de serotipos vacunales en el periodo pre-vacunal (1999-2001) frente al post-vacunal precoz (2002-2007) y tardío (2008-2013), el descenso fue significativo en ambos casos: de 34,9% a 15,4% (p <0,001) y a 3,7% (p <0,001) respectivamente. La disminución también fue estadísticamente significativa entre los dos periodos post vacunales (p <0,001).

Entre los 7 serotipos incluidos en la VNC7, el serotipo 19F (n=26) fue el más prevalente seguido del 23F (n=21), 6B (n=18), 9V (n=12), 14 (n=11) y 18C (n=3).

Ninguna de las conjuntivitis fue causada por el serotipo 4. En cuanto a la evolución a lo largo del periodo de estudio, se observó un descenso estadísticamente significativo de las conjuntivitis causadas por el serotipo 6B ( $p$  para tendencia  $< 0,001$ ), 23F ( $p < 0,05$ ) y 19F ( $p < 0,001$ ) (Figura 23).

**Tabla 10.** Número y prevalencia de conjuntivitis causadas por serotipos vacunales incluidos en la VNC7 (serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F).

Año	Serotipos incluidos en VNC7	
	Total capsuladas (n=521)	Total episodios (n=777)
1999	6/10 (60%)	6/14 (42,9%)
2000	6/13 (46,2%)	6/22 (27,3%)
2001	10/20 (50%)	10/27 (37%)
<b>Periodo pre-VNC7</b>	<b>22/43 (51,2%)</b>	<b>22/63 (34,9%)</b>
2002	5/12 (41,7%)	5/15 (33,3%)
2003	7/25 (28%)	7/37 (18,9%)
2004	11/42 (26,2%)	11/65 (16,9%)
2005	10/43 (23,3%)	10/69 (14,5%)
2006	17/60 (28,3%)	17/108 (15,7%)
2007	6/53 (11,3%)	6/69 (8,7%)
<b>Periodo post-VNC7 precoz</b>	<b>56/235 (23,8%)</b>	<b>56/363 (15,4%)</b>
2008	2/46 (4,3%)	2/60 (3,3%)
2009	3/51 (5,9%)	3/75 (4%)
2010	1/30 (3,3%)	1/55 (1,8%)
2011	3/44 (6,8%)	3/65 (4,6%)
2012	0/39	0/45
2013	4/33 (12,1%)	4/51 (7,8%)
<b>Periodo post-VNC7 tardío</b>	<b>13/243 (5,3%)</b>	<b>13/351 (3,7%)</b>



**Figura 23.** Prevalencia de los serotipos incluidos en la VNC7 en los periodos pre y post vacunales sobre el total de episodios (n=777).

### Serotipo incluidos en la VNC13

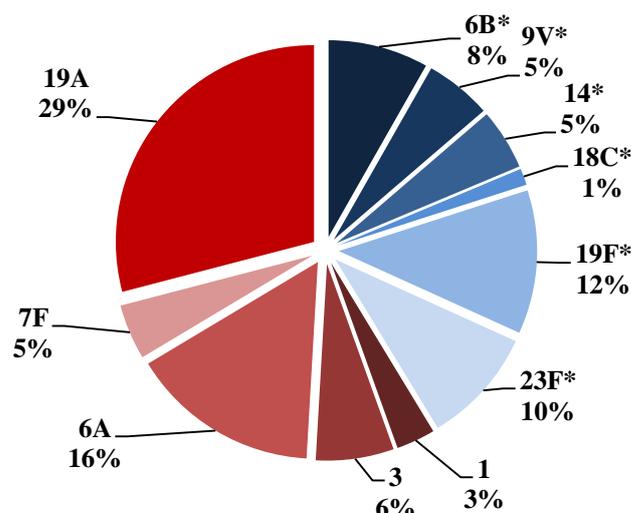
El 28,3% (220/ 777) del total de episodios de conjuntivitis neumocócicas fueron causadas por serotipos incluidos en VNC13 (vacuna comercializada a mitad de 2010). El porcentaje de episodios causados por serotipos incluidos en esta vacuna fue significativamente mayor en el periodo pre-vacunal que en el post-vacunal: 31,3% vs 16,8%,  $p < 0,001$  (Tabla 11). En cuanto a la evolución a lo largo del tiempo se observó un descenso significativo de los serotipos incluidos en VNC13 ( $p$  para tendencia  $< 0,001$ ). En la Tabla 11 se muestra el número de episodios causados por cepas incluidas en la VNC13, así como el porcentaje respecto al total de episodios y respecto a los episodios causados únicamente por cepas capsuladas. También se muestra el número y porcentaje que representaron los seis serotipos añadidos en la VNC13 los cuales no mostraron cambio a lo largo del tiempo ( $p$  para tendencia  $> 0,05$ ).

**Tabla 11.** Número y prevalencia de los serotipos incluidos en VNC13 y serotipos exclusivos de VNC13 (1, 3, 5, 6A, 7F, 19A) en azul.

	Serotipos incluidos en VNC13		Serotipos exclusivos de VNC13	
	Total capsuladas (n=521)	Total episodios (n=777)	Total capsuladas (n=521)	Total episodios (n=777)
1999	9/10 (90%)	9/14 (64,3%)	3/10 (30%)	3/14 (21,4%)
2000	8/13 (61,5%)	8/22 (36,4%)	2/13 (15,4%)	2/22 (9,1%)
2001	15/20 (75%)	15/27 (55,6%)	5/20 (25%)	5/27 (18,5%)
Periodo pre-VNC7	32/43 (74,4%)	32/63 (50,8%)	10/43 (23,3%)	10/63 (15,9%)
2002	7/12 (58,3%)	7/15 (46,7%)	2/12 (16,7%)	2/15 (13,3%)
2003	15/25 (60%)	15/37 (40,5%)	8/25 (32%)	8/37 (21,6%)
2004	20/42 (47,6%)	20/65 (30,8%)	9/42 (21,4%)	9/65 (13,8%)
2005	21/43 (48,8%)	21/69 (30,4%)	11/43 (25,6%)	11/69 (15,9%)
2006	33/60 (55%)	33/108 (30,6%)	16/60 (26,7%)	16/108 (14,8%)
2007	23/53 (43,4%)	23/69 (33,3%)	17/53 (32,1%)	17/69 (24,6%)
2008	15/46 (32,6%)	15/60 (25%)	13/46 (28,3%)	13/60 (21,7%)
2009	17/51 (33,3%)	17/75 (22,7%)	14/51 (27,5%)	14/75 (18,7%)
2010	10/30 (33,3%)	10/55 (18,2%)	9/30 (30%)	9/55 (16,4%)
Periodo pre-VNC13 1999-2010	193/405 (47,7%)	193/616 (31,3%)	99/405 (24,4%)	99/616 (16,1%)
2011	11/44 (25%)	11/65 (16,9%)	8/44 (18,2%)	8/65 (12,3%)
2012	7/39 (17,9%)	7/45 (15,6%)	7/39 (17,9%)	7/45 (15,6%)
2013	9/33 (27,3%)	9/51 (17,6%)	5/33 (15,2%)	5/51 (9,8%)
Periodo post-VNC13 2011-2013	27/116 (23,3%)	27/161 (16,8%)	20/116 (17,2%)	20/161 (12,4%)

No se detectó ningún episodio causado por el serotipo 5 a lo largo de todo el periodo de estudio y los serotipos 19A y 6A, incluidos en VNC13 pero no en VNC7, fueron dos de los serotipos más prevalentes en el conjunto de las conjuntivitis estudiadas.

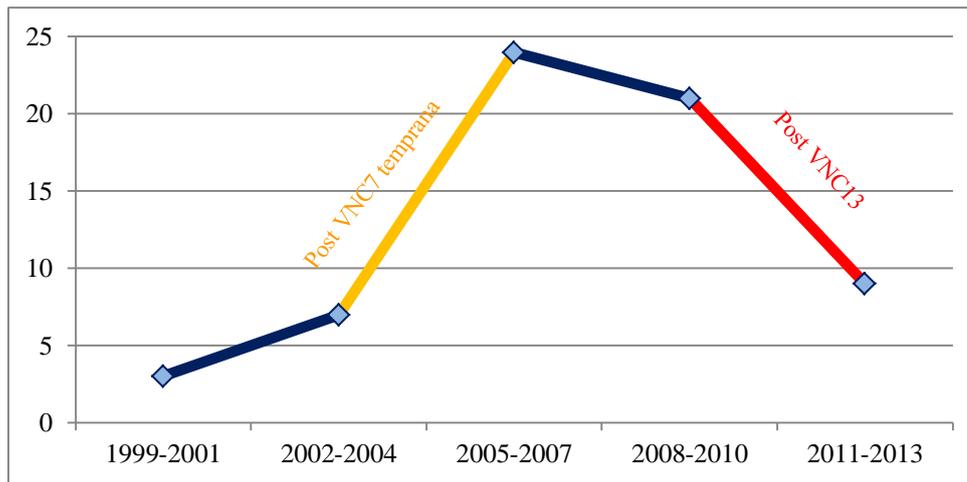
En la Figura 24 se muestra la distribución de los serotipos incluidos en la VNC13 (con el símbolo asterisco se señalan aquellos serotipos que también están incluidos en VNC7).



**Figura 24.** Distribución de los serotipos incluidos en VNC13 (\* serotipos también incluidos en VNC7).

En concreto el serotipo 19A fue el que produjo el mayor número de casos de conjuntivitis sumando un total de 64 episodios. Nueve de los episodios se detectaron en los tres años post VNC13 (2011-2013), frente a 24 y 21 episodios en los dos trienios anteriores (2005-07 y 2008-10, respectivamente) (Figura 25). Este descenso, no obstante, no mostró significación estadística.

De los 34 aislamientos del serotipo 6A, 5 se detectaron en el periodo post VNC13 y 10 y 7 durante los periodos 2005-2007 y 2008-2010, respectivamente (Tabla I del Anexo II).



**Figura 25.** Episodios causados por el serotipo 19 A.

### Resumen de la relación temporal de los serotipos causantes de conjuntivitis con los incluidos en las vacunas antineumocócicas conjugadas

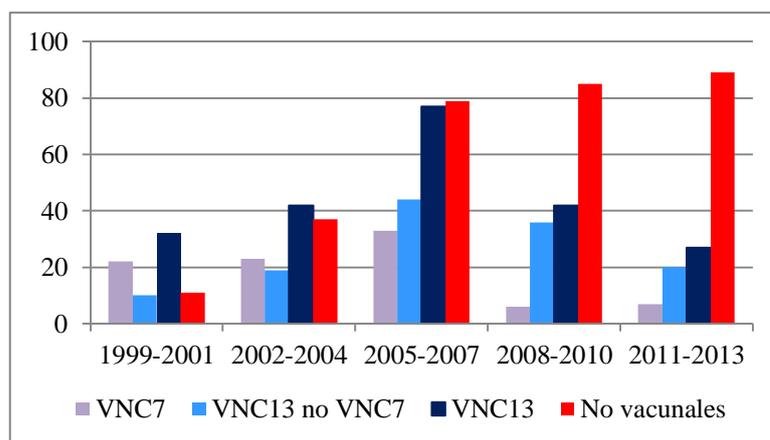
En la Tabla 12 se resume el número y porcentaje de episodios causados por los serotipos incluidos en las vacunas VNC7 y VNC13, de otros serotipos y de cepas acapsuladas en el total del estudio.

**Tabla 12.** Distribución de los serotipos vacunales (VNC7 y VNC13), no vacunales y de cepas acapsuladas causantes de conjuntivitis (1999-2013).

	Total N	Porcentaje capsuladas N=521	Porcentaje total de cepas N=777
VNC7 <sup>a</sup>	91	17,5%	11,7%
VNC13 <sup>b</sup>	220	42,2%	28,3%
No VNC13	301	57,8%	38,7%
Acapsuladas	256	/	32,9%

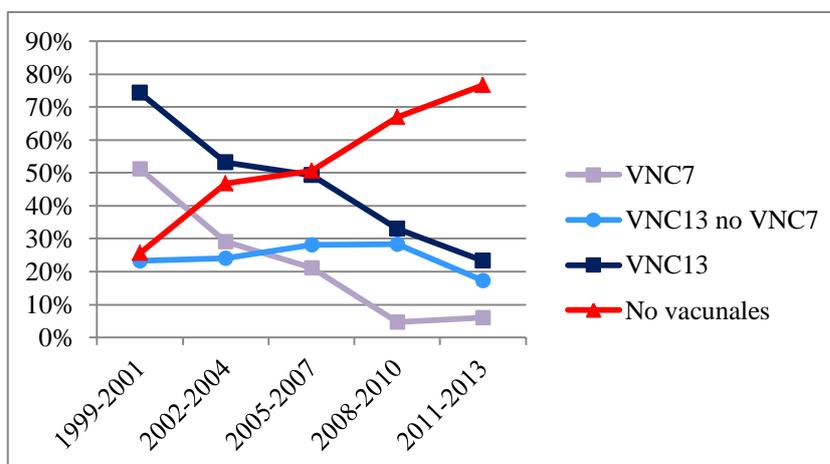
<sup>a</sup>serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F <sup>b</sup>VNC7+serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A

En cuanto a la dinámica temporal de los serotipos vacunales, en las Figuras 26 y 27 se observa la evolución por trienios de los serotipos según su inclusión o no en las vacunas VNC7 y VNC13. Los serotipos vacunales encontrados fueron: 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, (serotipos incluidos en la VNC7) y 1, 3, 6A, 7F y 19A (serotipos exclusivos de VNC13 [VNC13 no VNC7]). No hubo ningún episodio causado por los serotipos vacunales, 4 y 5 de la VNC7 y VNC13, respectivamente.



**Figura 26.** Número de cepas capsuladas según su serotipo estuviese incluido en las VNC7 y VNC13, serotipos exclusivos incluidos en VNC13 y serotipos no vacunales.

Se puede observar que los serotipos no incluidos en alguna de las vacunas fueron mucho más prevalentes en la época postvacunal (2011-2013) que en la prevacunal (1999-2001) y cómo los serotipos vacunales en su conjunto experimentaron un incremento en número de casos en mitad del periodo de estudio (Figura 26). Como puede observarse en la Figura 27, el descenso del porcentaje de serotipos incluidos en la VNC13 en los cuatro primeros trienios (1999-2010) fue paralelo y a costa de los serotipos incluidos en la VNC7. Sin embargo, en el último trienio (2011-2013), el descenso de serotipos de la VNC13 fue debido al descenso de los seis serotipos exclusivos de esta vacuna ya que durante este trienio los serotipos de la VNC7 se mantuvieron en niveles muy bajos.

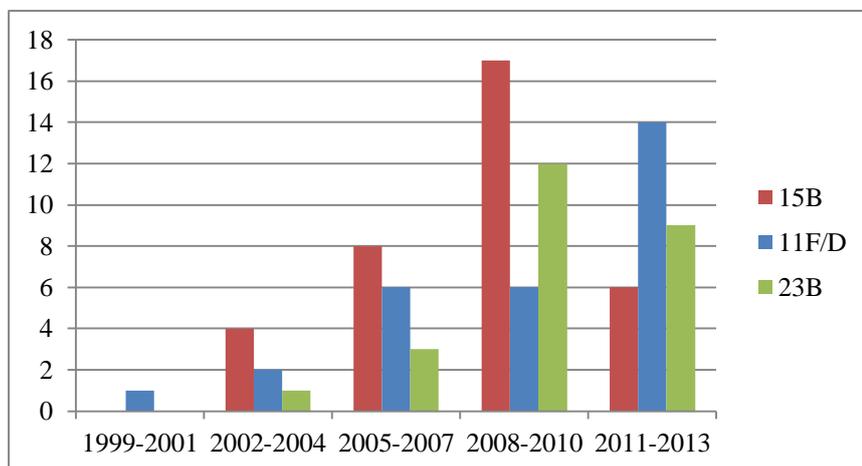


**Figura 27.** Evolución por trienios del porcentaje de cepas capsuladas por serotipo según estuvieron o no incluidos en alguna de las dos vacunas, serotipos exclusivos incluidos en VNC13 y serotipos no vacunales sobre el total de cepas capsuladas (n=521).

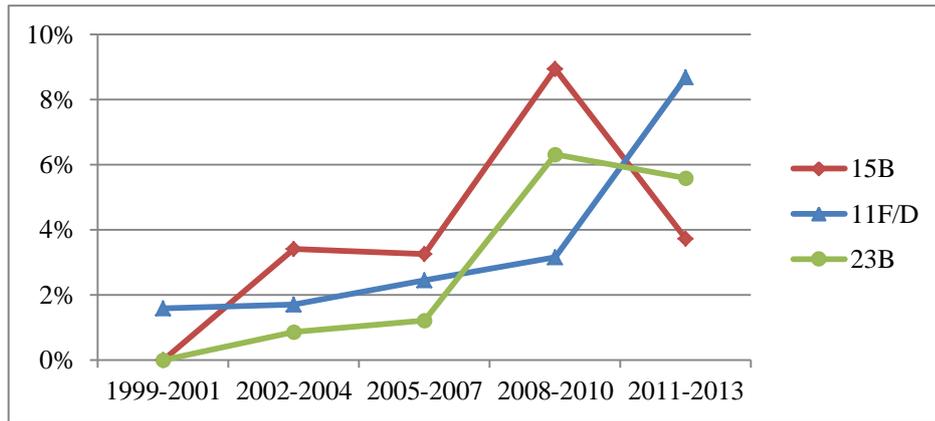
#### 4.3.1.2. Serotipos no vacunales (no incluidos en VNC13)

En total hubo 301 episodios de conjuntivitis causadas por cepas capsuladas cuyos serotipos no estaban incluidos en ninguna de las vacunas conjugadas. En porcentaje, estas cepas representaron el 57,8% (301/521) de los episodios causados por cepas capsuladas y el 38,7% (301/777) del total episodios.

A lo largo del periodo de estudio se observó un aumento estadísticamente significativo de las conjuntivitis causadas por el conjunto de serotipos no incluidos en la VNC13 ( $p$  para tendencia  $<0,001$ ). El serogrupo 15 (incluyendo serotipos 15A, 15B, 15C), el serogrupo 11 (incluyendo serotipos 11A, 11B/C y 11F/D) y el serogrupo 23 (con serotipos 23A y 23B), fueron los más prevalentes con 49, 43 y 38 cepas cada uno respectivamente. Por serotipos, los 3 serotipos no vacunales más prevalentes fueron: 15B ( $n=35$ ; 6,7% de las capsuladas y 4,5% del total episodios), 11F/D ( $n=29$ ; 5,6% de capsuladas y 3,7% total episodios), y 23B ( $n=25$ ; 4,8% de capsuladas y 3,2% total episodios). En cuanto a la evolución de estos 3 serotipos a lo largo de los 15 años de estudio, el 11F/D, y 23B aumentaron significativamente (tendencia  $p <0,05$  y  $p < 0,001$  respectivamente) (Figuras 28 y 29).



**Figura 28.** Número de episodios de conjuntivitis causados por los 3 serotipos más prevalentes no incluidos en la VNC13.

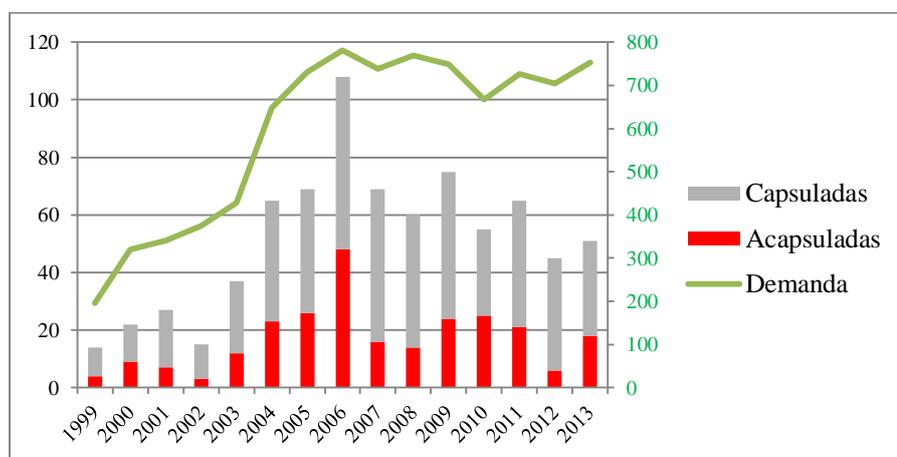


**Figura 29.** Porcentaje de episodios de conjuntivitis causados por los 3 serotipos más prevalentes no incluidos en la VNC13.

#### 4.4. Conjuntivitis causadas por cepas acapsuladas

##### 4.4.1. Prevalencia de cepas acapsuladas

Durante el periodo de estudio hubo 256 episodios de conjuntivitis causadas por cepas acapsuladas. A lo largo de este periodo la proporción de conjuntivitis causadas por cepas de neumococo sin cápsula no sufrió cambios ( $p$  para tendencia= 0,5) y como era de esperar, ninguna vacuna tuvo influencia sobre la prevalencia de cepas acapsuladas. En relación a la VNC7, la proporción acapsuladas/capsuladas en el periodo pre-vacunal fue del 31,7% y en los post vacunales precoz y tardío del 35,3% y 30,8% respectivamente. No obstante, cuando observamos el número de episodios registrados por cada año de estudio detectamos un aumento en 2006 (Figura 30), que aunque coincidió con un aumento en el número de conjuntivitis neumocócicas en su conjunto, se debió a la diseminación de un clon que tuvo su máxima difusión entre noviembre 2005 y finales de 2006 (ver más adelante, apartado 4.4.2.1).



**Figura 30.** Número de episodios de conjuntivitis neumocócicas causados por cepas acapsuladas y capsuladas en cada año de estudio y su relación con la demanda (envío de muestras para diagnóstico).

##### 4.4.1.1. Situación particular del año 2006

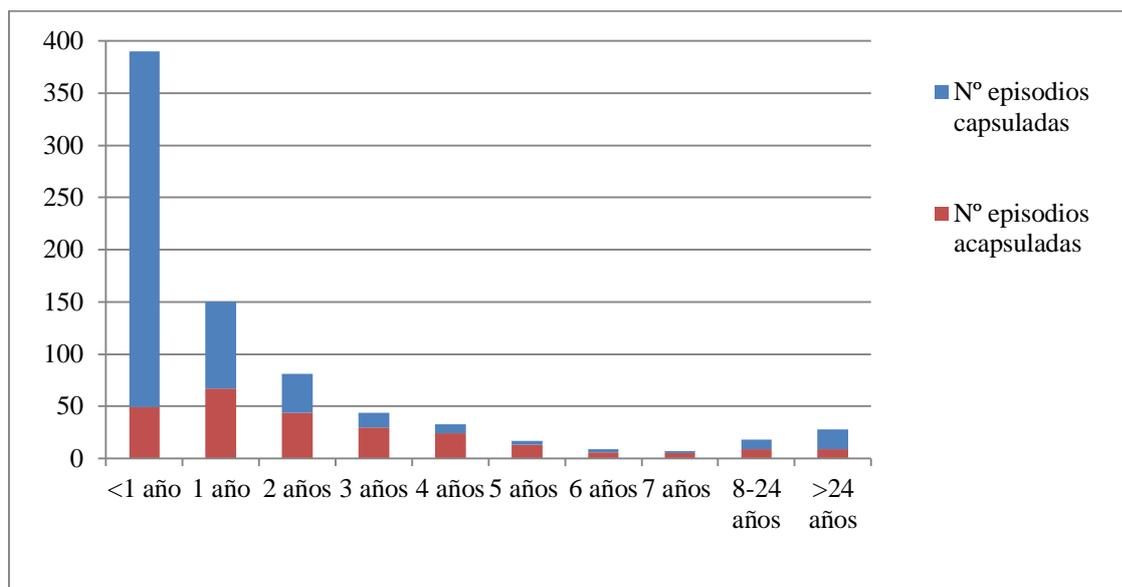
El número de muestras conjuntivales enviadas a lo largo del periodo de estudio no fue homogéneo, lo que podría justificar las grandes diferencias observadas en el número de casos diagnosticados entre algunos años. Desde 1999 a 2005 hubo un incremento progresivo de la demanda (195 muestras en 1999 a 731 en 2005), pero a partir de

2005, la demanda fue muy similar en todos los años (Figura 30). Pese a que la proporción de cepas acapsuladas/capsuladas fue similar durante el estudio, destaca el elevado número de conjuntivitis causadas por cepas acapsuladas en 2006. Ni siquiera corrigiendo el número de casos en función de la demanda se puede explicar el aumento observado en 2006, ya que, con corrección o sin ella, 2006 siguió siendo un año de alta incidencia de episodios de conjuntivitis ocasionados por cepas acapsuladas. Esta mayor incidencia de cepas acapsuladas se debió al predominio de un genotipo, el ST941, que junto con el ST448 representaron más del 75% de las cepas acapsuladas. Entre el 1 de Noviembre 2005 y el 30 de Noviembre de 2006, 33 episodios fueron causados por cepas ST941, 30 de los cuales fueron ocasionados por un clon o subclon específico dentro de este ST (ver apartado 4.4.2.1).

#### 4.4.1.2. Distribución por grupos de edad de las conjuntivitis causadas por cepas acapsuladas

Se analizó la distribución de los episodios causados por cepas acapsuladas por grupos de edad. Durante los primeros 6 años de vida (0 a 5 años de edad) se acumularon el 88,7% del total de cepas acapsuladas detectadas en el global de la población, constituyendo el 31,7% del total de cepas detectadas en este grupo de edad. No hubo ningún caso de conjuntivitis por cepas acapsuladas en pacientes con edades comprendidas entre los 12 y los 24 años de vida y fueron excepcionales en adultos de más edad. En la Figura 31 se representan los casos para los 7 primeros años de vida y agrupando las edades 8-24 años y mayores de 24 años.

En los niños menores de 12 meses se observó un número mucho más elevado de cepas capsuladas indicando una mayor susceptibilidad frente a las cepas con cápsula; de hecho, en los niños menores de 1 año el porcentaje de episodios causados por cepas acapsuladas fue tan solo del 12,6%. A partir de dicha edad el porcentaje de cepas capsuladas disminuyó drásticamente y en niños de dos o más años de edad, la mayoría de los episodios de conjuntivitis neumocócicas estuvieron causados por cepas acapsuladas (Figura 31). En mayores de 64 años, de nuevo se observó una mayor susceptibilidad a infecciones por cepas capsuladas ya que de 15 episodios, 14 fueron ocasionados por capsuladas y tan solo 1 por cepas acapsuladas.

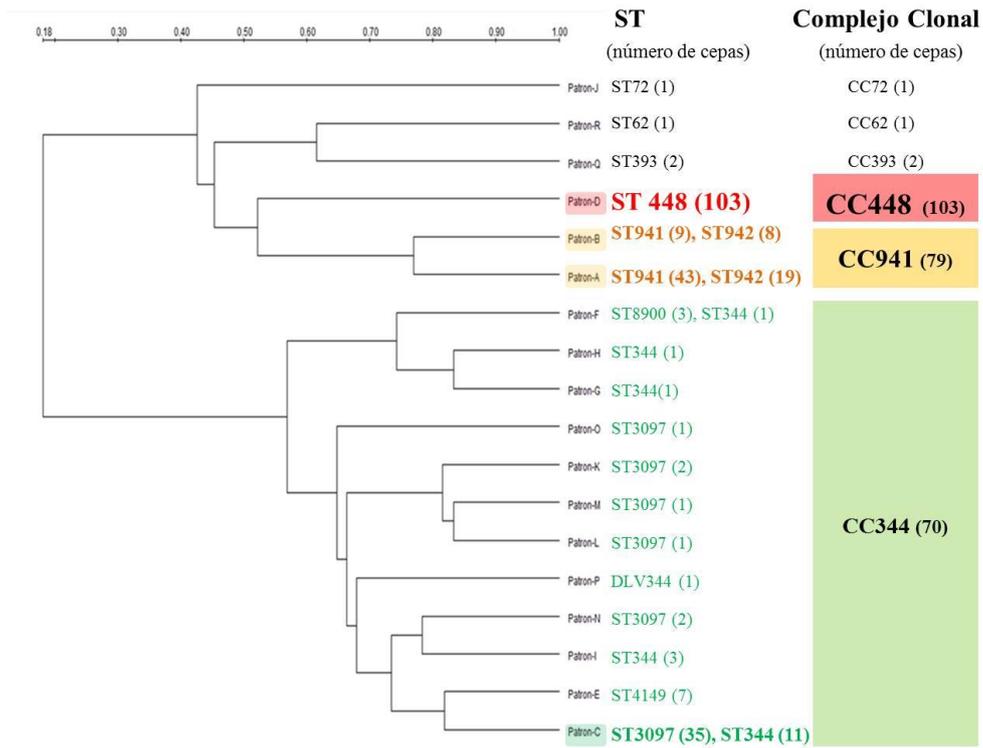


**Figura 31.** Episodios de conjuntivitis causados por cepas acapsuladas y capsuladas por edad en Gipuzkoa, 1999-2013.

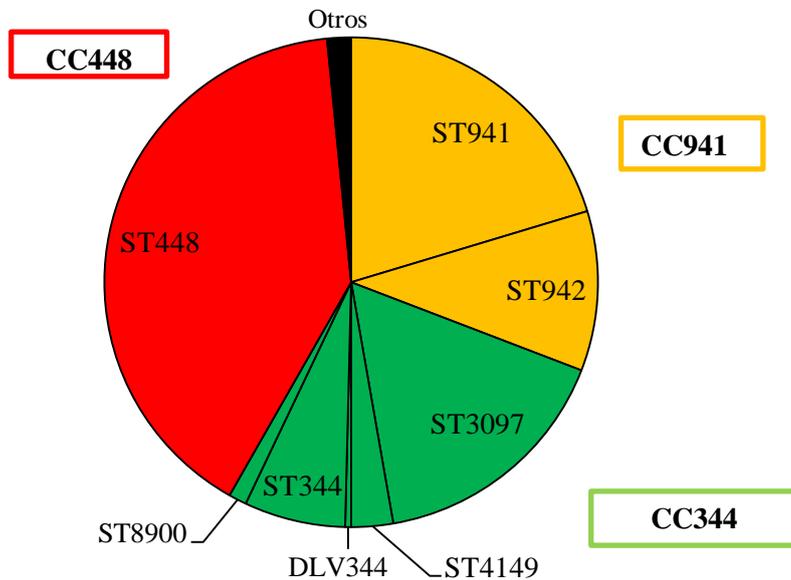
#### 4.4.2. Genotipos: PFGE y MLST de las cepas acapsuladas

Se realizó el análisis genotípico mediante PFGE a todas las cepas acapsuladas detectándose 18 patrones diferentes (Figura 32) arbitrariamente denominados de la “A” a la “R”, agrupando 4 de ellos al 89,1% de las cepas: patrón A (N=62), B (N=17), C (N=46) y D (N=103). El estudio mediante MLST demostró que las cepas con los patrones A y B pertenecían a los secuencia tipos ST941 y ST942, ambos pertenecientes al CC941; el patrón C a los ST344 y ST3097, ambos pertenecientes al CC344 y el patrón D al ST448 del CC448. En cuanto a las 28 cepas que no se agruparon en estos 4 patrones mayoritarios, 24 de ellas eran también cepas de STs pertenecientes al CC344 (ST344, 3097, 4149, 8900 y DLV344) pero con un PFGE diferente al de la mayoría (Figura 32). De las cuatro cepas restantes dos pertenecieron al ST393 y una de cada a los ST62 y ST72.

Por lo tanto, el total de las 252/256 cepas acapsuladas se agruparon en tres CC principales: CC448, CC941 y CC344. En la Figura 33 se muestran los 8 genotipos (STs y DLV) encontrados entre estas cepa.



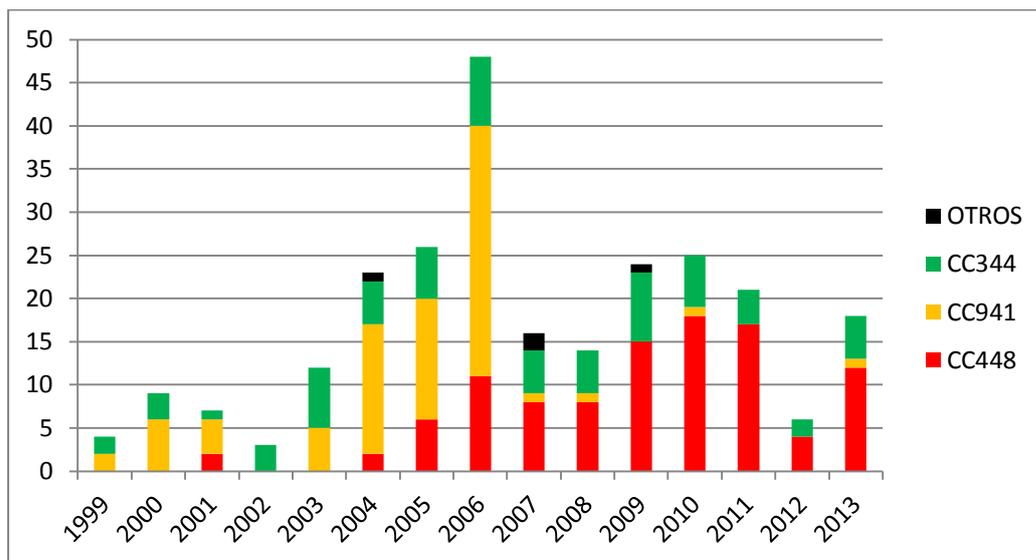
**Figura 32.** Diversidad genética encontrada entre las cepas acapsuladas. De izquierda a derecha: dendrograma según similitud genética mediante PFGE, patrones-PFGE (A-R), ST y CC.



**Figura 33.** Distribución de los genotipos encontrados en las cepas acapsuladas. El gráfico representa la proporción de episodios encontrados.

4.4.2.1. Dinámicas y características de los tres principales complejos clonales: CC448, CC941 y CC344

Considerando los agrupamientos según los CC obtenidos en el estudio molecular, las cepas del CC448 fueron aumentando a lo largo del periodo de estudio (p para tendencia < 0,001), disminuyendo el CC941 (p <0,001), manteniéndose sin cambio el restante CC344 (p= 0,4). Como se observa en las Figuras 34, es a partir del año 2007 cuando el CC448 sustituye en protagonismo al CC941.



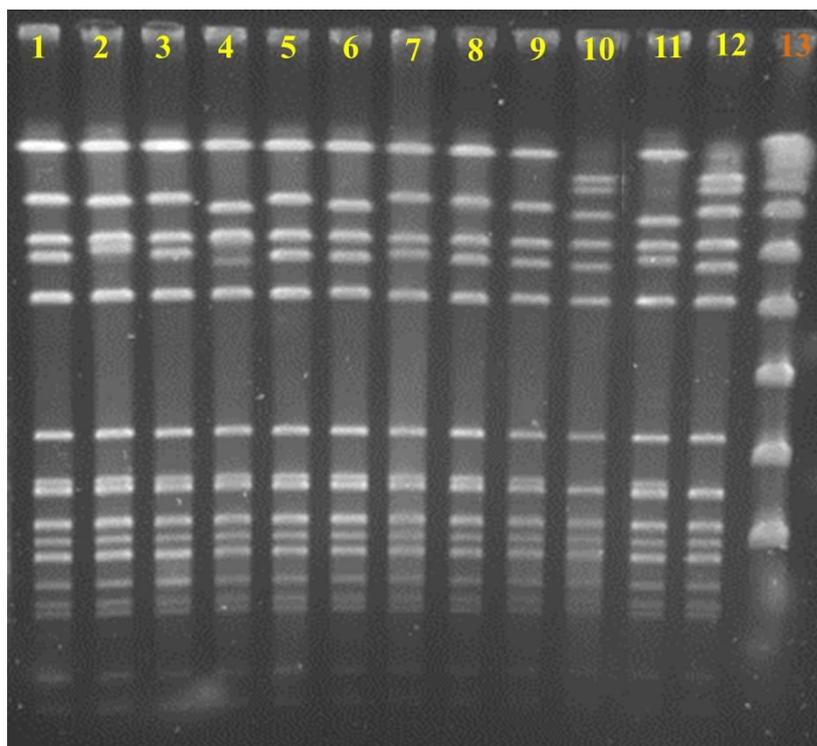
**Figura 34.** Número de episodios ocasionados por cepas acapsuladas de los tres principales complejos clonales en cada año de estudio.

El **CC448** fue el mayoritario e incluyó 103 cepas, ninguna de las cuales mostró un patrón diferente de PFGE y todas ellas pertenecían al ST448, comportándose por tanto como un único clon. Este clon se detectó por primera vez en el año 2001 y aunque no se detectó durante los años 2002 y 2003 es a partir de 2004 cuando su detección se ve incrementada, manteniéndose de forma endémica a lo largo de los años siguientes.

En el capítulo sobre resistencia antimicrobiana se describirá con mayor detalle la resistencia antimicrobiana de los distintos complejos clonales; no obstante, este clon se caracterizó por presentar muy baja resistencia antimicrobiana.

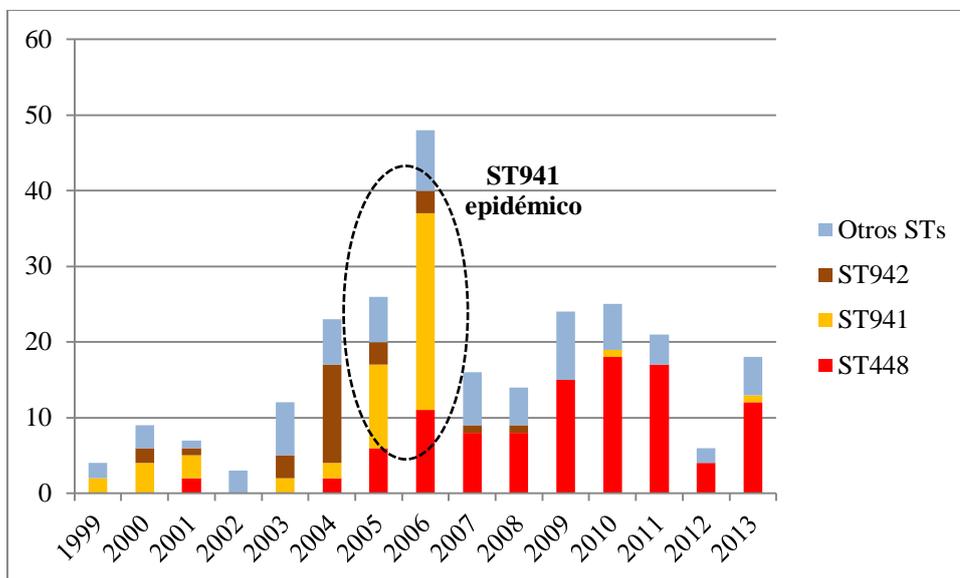
A diferencia del CC448, en el que las 103 cepas que lo constituyeron tuvieron un mismo ST y un único patrón de PFGE, dentro del **CC941** se encontraron aislamientos con dos patrones de PFGE que mostraron un 77% de similitud entre ellos. El patrón A fue el mayoritario agrupando a 62 cepas y el patrón B agrupó a 17 cepas (Figura 32). Tras el análisis del MLST se comprobó que tanto el ST941 como el ST942 podían mostrar cada uno de ambos patrones de PFGE. El ST941 y el ST942 tan solo difieren en un nucleótido del gen *ddl*.

Globalmente, el ST941 fue el mayoritario, detectándose en 52 de las 79 cepas (65,8%), y dentro de él, 43 cepas presentaron el patrón PFGE A y 9 el patrón B. En la Figura 35 donde se muestra un gel de campo pulsante realizado a aislamientos del CC941 puede observarse el patrón A en las líneas 1 a 9 y 11, y el patrón B en las líneas 10 y 12.



**Figura 35.** PFGE de 12 cepas CC941 de las cuales, las líneas 1 a 9 y línea 11 correspondieron a cepas ST941 obtenidas durante el periodo epidémico (noviembre 2005-noviembre 2006) y etiquetadas como patrón A. La cepa de la línea 10 es un ST942 y la de la línea 12, un ST941 de diferente patrón y no considerada epidémica. Línea 13 marcador de peso molecular.

Aunque el ST941 pudo detectarse ocasionalmente durante años anteriores (Figura 36), fue a partir de noviembre de 2005 cuando adquirió carácter epidémico, para casi desaparecer 13 meses después. Entre el 1 de Noviembre de 2005 al 30 de Noviembre de 2006, 33 episodios fueron causados por cepas ST941 de los cuales 30 pertenecieron al mismo clon con patrón A de PFGE. Entre los episodios causados por este clon epidémico, 29 fueron en niños (24 menores de 5 años y 5 en niños de entre 5 y 8 años) y uno en un adulto. A partir de esta fecha desapareció este clon aunque se detectaron dos ST941 uno en 2010 y otro en 2013, con el mismo patrón de PFGE (patrón B) pero diferente del patrón A.



**Figura 36.** Distribución anual de los principales STs.

Analizando la procedencia de los pacientes con este clon epidémico ST941, se encontraron dos agrupamientos en zonas geográficas concretas. No obstante al comparar la procedencia de otros pacientes con conjuntivitis ocasionadas por cepas no relacionadas con este clon (35 cepas ST448), se comprobó que la frecuencia de dichos episodios en dichas regiones no difirió de las epidémicas ST941.

Hubo una pequeña diferencia en la susceptibilidad antimicrobiana entre el ST941 y el ST942 ya que el 100% de las cepas ST942 mostraron resistencia a penicilina oral (CMI  $\geq 0,12 \mu\text{g/ml}$ ) mientras que el 25% de las cepas del ST941 mostraron una CMI a penicilina  $\leq 0,03 \mu\text{g/ml}$ .

El **CC344** agrupó 70 cepas y mediante PFGE se detectaron 12 patrones diferentes. Hubo un clon mayoritario, patrón C, que agrupó al 65,7% (46/70) de las cepas (Figura 32). Se realizó el MLST al total de cepas incluidas en este grupo clonal, y dentro del patrón mayoritario (patrón C) se detectaron tanto cepas del ST3097 como del ST344. Globalmente el ST mayoritario dentro de este CC fue el ST3097 (60%; 42/70) seguido del ST344 (24,3%; 17/70). Se detectaron 7 cepas del ST4149, 3 del 8900 y 1 cepa DLV344 (no tiene ST asignado).

En cuanto al perfil de resistencia antimicrobiana detectada en este CC, hay que destacar que a pesar de la diversidad genética, mostraron un perfil antimicrobiano similar en todas ellas, con una alta prevalencia de multirresistencia (ver más adelante).

#### **4.5. Estudio de la susceptibilidad antimicrobiana**

Aunque la mayoría de las conjuntivitis agudas se tratan con antimicrobianos tópicos, en esta tesis hemos incluido también el estudio de la susceptibilidad frente a antimicrobianos de uso sistémico, no solo por su eventual utilidad en el tratamiento, sino por el valor epidemiológico de su fenotipo antimicrobiano.

Entre los antimicrobianos de uso tópico se incluyen las quinolonas (representadas por ciprofloxacino), macrólidos (representados por eritromicina), trimetoprim, tetraciclinas, cloranfenicol y rifampicina aunque ésta última actualmente ya no está comercializada en España.

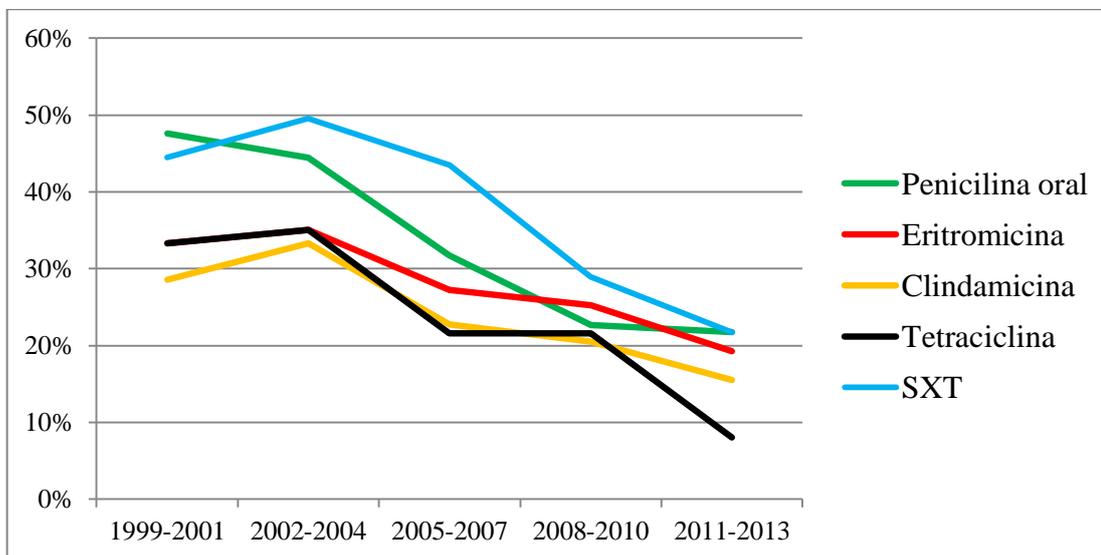
##### **4.5.1. Resistencia global**

En la Tabla 13 se muestra la prevalencia global de neumococos resistentes a los antimicrobianos analizados. El SXT fue el antimicrobiano para uso sistémico frente al cual se detectó el mayor número de cepas resistentes considerando una CMI  $\geq 1/19$   $\mu\text{g/mL}$ , seguido de la penicilina oral, eritromicina, clindamicina y tetraciclina.

**Tabla 13.** Número y porcentaje de neumococos con una CMI considerada que confiere resistencia.

	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	Total de episodios (n=777)
<b>Penicilina oral</b>	$\geq 0,12$	238 (30,6%)
<b>Penicilina</b>	$\geq 2$	33 (4,2%)
<b>Penicilina-parenteral</b>	$\geq 4$	4 (0,5%)
<b>Amoxicilina</b>	$\geq 4$	21 (2,7%)
<b>Cefotaxima</b>	$\geq 2$	13 (1,7%)
<b>Eritromicina</b>	$\geq 0,5$	208 (26,8%)
<b>Clindamicina</b>	$\geq 0,5$	177 (22,8%)
<b>Tetraciclina</b>	$\geq 2$	169 (21,8%)
<b>SXT sistémico</b>	$\geq 1/19$	283 (36,4%)
<b>Trimetoprim tópico</b>	$\geq 4$	193 (24,8%)
<b>Cloranfenicol</b>	$\geq 8$	6 (0,8%)
<b>Rifampicina</b>	$\geq 2$	16 (2,1%)
<b>Ciprofloxacino</b>	$\geq 4$	12 (1,5%)

En cuanto a la dinámica de la resistencia a lo largo del periodo de estudio, se observó un descenso significativo ( $p$  para tendencia  $<0,05$ ) de la resistencia a penicilina oral, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y SXT (Figura 37 y Tabla 14).



**Figura 37.** Disminución de la resistencia a lo largo de los años del conjunto de cepas (capsuladas y acapsuladas) a cinco antimicrobianos seleccionados.

En los periodos pre y post VNC7, la resistencia a penicilina moderada o alta ( $\text{CMI} \geq 2 \mu\text{g/mL}$ ), amoxicilina, cefotaxima y ciprofloxacino, fue menor al 10% en todos los periodos analizados (Tabla 14).

Tabla 14. Número y porcentaje de cepas resistentes en los periodos pre y post VNC7.

	Pre- vacunal	Post-VNC7 precoz		Post-VNC7 tardío		Tendencia lineal p
	1999-2001 n=63	2002-2004 n=117	2005-2007 n=246	2008-2010 n=190	2011-2013 n=161	
<b>Penicilina oral</b>	30 (47,6%)	52 (44,4%)	78 (31,7%)	43 (22,6%)	35 (21,7%)	<0,001
<b>Penicilina (<math>\geq 2\mu\text{g/mL}</math>)</b>	4 (6,3%)	6 (5,1%)	1 (0,4%)	8 (4,2%)	14 (8,7%)	NS
<b>Amoxicilina</b>	2 (3,2%)	4 (3,4%)	0	5 (2,6%)	10 (6,2%)	NS
<b>Cefotaxima</b>	4 (6,3%)	2 (1,7%)	0	4 (2,1%)	3 (1,9%)	NS
<b>Eritromicina</b>	21 (33,3%)	41 (35%)	67 (27,2%)	48 (25,3%)	31 (19,3%)	0,002
<b>Clindamicina</b>	18 (28,6%)	39 (33,3%)	56 (22,8%)	39 (20,5%)	25 (15,5%)	<0,001
<b>Tetraciclina</b>	21 (33,3%)	41 (35%)	53 (21,5%)	41 (21,6%)	13 (8,1%)	<0,001
<b>SXT sistémico</b>	28 (44,4%)	58 (49,6%)	107 (43,5%)	55 (28,9%)	35 (21,7%)	<0,001
<b>Trimetoprim tópico</b>	25 (39,7%)	53 (45,3%)	47 (19,1%)	39 (20,5%)	29 (18%)	<0,001
<b>Cloranfenicol</b>	1 (1,6%)	3 (2,6%)	1 (0,4%)	0	1 (0,6%)	NS
<b>Rifampicina</b>	4 (6,3%)	7 (6%)	2 (0,8%)	1 (0,5%)	2 (1,2%)	0,001
<b>Ciprofloxacino</b>	1 (1,6%)	1 (0,9%)	5 (2%)	4 (2,1%)	1 (0,6%)	NS

## 4.5.2. Susceptibilidad antimicrobiana de los serotipos vacunales

### 4.5.2.1. Resistencia de los serotipos incluidos en la VNC7 y VNC13

En la Tabla 15 se muestra la prevalencia de cepas resistentes encontradas en los serotipos incluidos en ambas vacunas conjugadas, no observándose diferencias significativas entre ellas.

Las cepas de serotipos incluidos en VNC7 y VNC13 fueron significativamente más resistentes a penicilina con resistencia moderada o alta, cefotaxima, eritromicina, clindamicina y tetraciclina que el resto de neumococos (serotipos no incluidos en la vacuna y cepas acapsuladas). Además los serotipos incluidos en VNC13 fueron también estadísticamente más resistentes a amoxicilina que el resto (Tabla 15). Sin embargo los serotipos no cubiertos por VNC13 fueron más resistentes a trimetoprim y a SXT ( $p < 0,001$ ).

**Tabla 15.** Porcentaje y número de cepas resistentes a antibióticos en los serotipos incluidos en la VNC7 y VNC13.

	Serotipos VNC7 (n=91)	Serotipos VNC13 (n=220)	Resto neumococos <sup>a</sup> (n=557)	p <sup>b</sup>
<b>Penicilina oral</b>	27 (29,7%)	56 (25,5%)	182 (32,7%)	
<b>Penicilina (≥2µg/mL)</b>	8 (8,8%)	15 (6,8%)	18 (3,2%)	0,026
<b>Amoxicilina</b>	4 (4,4%)	11 (5%)	10 (1,8%)	0,024
<b>Cefotaxima</b>	5 (5,5%)	9 (4,1%)	4 (0,7%)	0,002
<b>Eritromicina</b>	36 (39,6%)	84 (38,2%)	124 (22,3%)	<0,001
<b>Clindamicina</b>	34 (37,4%)	78 (35,5%)	99 (17,8%)	<0,001
<b>Tetraciclina</b>	31 (34,1%)	75 (34,1%)	94 (16,9%)	<0,001
<b>SXT sistémico</b>	26 (28,6%)	60 (27,3%)	223 (40%)	<0,001
<b>Trimetoprim tópico</b>	18 (19,8%)	34 (15,5%)	159 (28,5%)	<0,001
<b>Cloranfenicol</b>	1 (1,1%)	3 (1,4%)	3 (0,5%)	
<b>Rifampicina</b>	0	4 (1,8%)	12 (2,2%)	
<b>Ciprofloxacino</b>	1 (1,1%)	3 (1,4%)	9 (1,6%)	

<sup>a</sup>Incluye los serotipos no VNC13 (n=301) y cepas acapsuladas (n=256)

<sup>b</sup>Se muestran únicamente los valores significativos obtenidos al comparar serotipos VNC13 frente al resto de neumococos

Si se analizan los serotipos individualmente, el serotipo 14 fue el serotipo con mayor porcentaje de cepas resistentes a penicilina oral (81,8%), penicilina con resistencia moderada o alta (27,3%), trimetoprim tópico (72,7%) y SXT sistémico (81,5%) (Tabla 16).

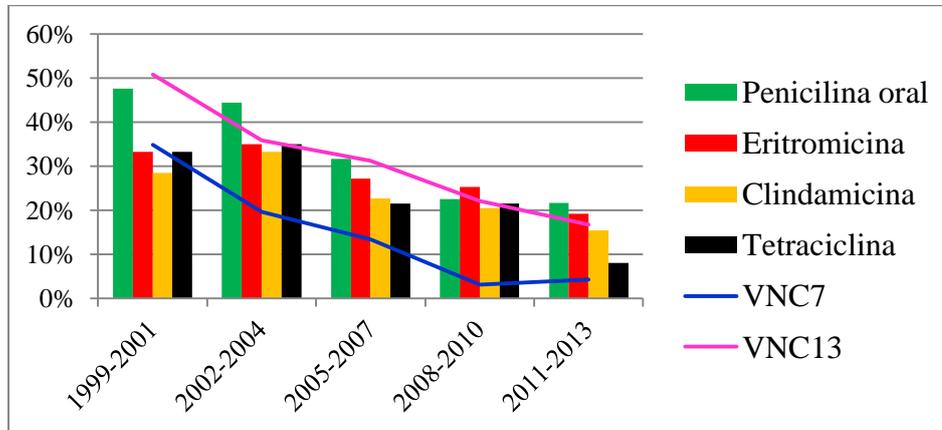
El serotipo 19A, el más prevalente del estudio, mostró un alto número de cepas multirresistentes (54,7%) y el análisis genotípico demostró la existencia de dos clones principales entre las cepas resistentes a penicilina. Todas las cepas con CMI  $\geq 2\mu\text{g/mL}$  (n=5) pertenecieron al ST320, y todas las cepas con CMI=1 $\mu\text{g/mL}$  (n=9) pertenecieron al ST276. Entre las cepas con CMI entre 0,12 y 0,5 mg/L (n=8) sólo se detectó una cepa perteneciente al ST276. Estos dos clones (ST320 y ST276) además de ser resistente a penicilina mostraron resistencia a eritromicina, clindamicina, tetraciclina y SXT. Todos los episodios causados por los ST276 y ST320 se registraron en el periodo post-VNC7. En el caso del ST276, el primero se detectó en el año 2004, sin aislarse ninguno después de 2010. En cuanto a los cinco episodios causados por cepas del ST320, tres se detectaron en 2008, uno en 2009 y otro en 2012.

Entre las cepas del serotipo 19A sensibles a penicilina se detectó un clon perteneciente al ST193 (n=12) que presentó un patrón de multirresistencia a eritromicina, clindamicina y tetraciclina .

**Tabla 16.** Número y porcentaje de cepas resistentes en los principales serotipos vacunales (3, 6A y 19A solo incluidos en VNC13).

	<b>6B</b> (n=18)	<b>9V</b> (n=12)	<b>14</b> (n=11)	<b>19F</b> (n=26)	<b>23F</b> (n=21)	<b>3</b> (n=14)	<b>6A</b> (n=34)	<b>19A</b> (n=64)
<b>Penicilina-oral</b>	5 (27,8%)	3 (25%)	9 (81,8%)	6 (23,1%)	4 (19%)	1 (7,1%)	5 (14,7%)	22 (34,4%)
<b>Penicilina (<math>\geq 2\mu\text{g/mL}</math>)</b>	3 (16,7%)	1 (8,3%)	3 (27,3%)	0	1 (20%)	0	2 (5,9%)	5 (7,8%)
<b>Amoxicilina</b>	2 (11,1%)	1 (8,3%)	1 (9,1%)	0	0	0	1 (2,9%)	6 (9,4%)
<b>Cefotaxima</b>	3 (16,7%)	0	1 (9,1%)	0	1 (4,8%)	0	1 (2,9%)	3 (4,7%)
<b>Eritromicina</b>	9 (50%)	3 (25%)	4 (36,4%)	15 (57,7%)	5 (23,8%)	1 (7,1%)	8 (23,5%)	38 (59,4%)
<b>Clindamicina</b>	9 (50%)	3 (25%)	2 (18,2%)	15 (57,7%)	5 (23,8%)	1 (7,1%)	6 (17,6%)	36 (56,3%)
<b>Tetraciclina</b>	8 (44,4%)	2 (16,7%)	1 (9,1%)	16 (61,5%)	4 (19%)	1 (7,1%)	9 (26,5%)	33 (51,6%)
<b>SXT sistémico</b>	4 (22,2%)	6 (50%)	9 (81,8%)	3 (11,5%)	4 (19%)	2 (14,3%)	7 (20,6%)	23 (35,9%)
<b>Trimetoprim tópico</b>	3 (16,7%)	3 (25%)	8 (72,7%)	2 (7,7%)	2 (9,5%)	1 (7,1%)	3 (8,8%)	11 (17,2%)
<b>Cloranfenicol</b>	0	0	0	0	1 (4,8%)	0	2 (5,9%)	0
<b>Rifampicina</b>	0	0	0	0	0	0	2 (5,9%)	1 (1,6%)
<b>Ciprofloxacino</b>	0	0	0	0	1 (4,8%)	0	0	2 (3,1%)
<b>Multirresistencia</b>	8 (44,4%)	2 (16,7%)	3 (27,3%)	15 (57,7%)	5 (23,8%)	1 (7,1%)	8 (23,5%)	35 (54,7%)

Como se muestra en la Figura 38, el descenso de la prevalencia de los aislamientos incluidos en las vacunas conjugadas vino acompañado del descenso significativo detectado en la resistencia a penicilina oral, eritromicina , clindamicina y tetraciclina.



**Figura 38.** Porcentaje de cepas resistentes y prevalencia de cepas con serotipos incluidos en VNC7 y VNC13.

#### 4.5.3. Susceptibilidad antimicrobiana del resto de neumococos

##### 4.5.3.1. Resistencia de los neumococos capsulados de serotipos no incluidos en VNC13

Los serotipos no incluidos en la VNC13 (n=301) fueron aumentando significativamente a lo largo del estudio. Presentaron baja tasa de resistencia (Tabla 17), no superando el 20% de resistencia exceptuando la correspondiente al SXT sistémico.

**Tabla 17.** Número y porcentaje de cepas no vacunales (no VNC13) resistentes a los antimicrobianos detectados.

	Serotipos no vacunales (n=301)		Serotipos vacunales (n=220)		p <sup>a</sup>
<b>Penicilina oral</b>	46	(15,3%)	56	(25,5%)	0,003
<b>Penicilina (<math>\geq 2\mu\text{g/mL}</math>)</b>	10	(3,3%)	15	(6,8%)	
<b>Amoxicilina</b>	7	(2,3%)	11	(5%)	
<b>Cefotaxima</b>	1	(0,3%)	9	(4,1%)	
<b>Eritromicina</b>	54	(17,9%)	84	(38,2%)	< 0,001
<b>Clindamicina</b>	38	(12,6%)	78	(35,5%)	< 0,001
<b>Tetraciclina</b>	34	(11,3%)	75	(34,1%)	< 0,001
<b>SXT sistémico</b>	81	(26,9%)	60	(27,3%)	
<b>Trimetoprim tópico</b>	51	(16,9%)	34	(15,5%)	
<b>Cloranfenicol</b>	3	(1%)	3	(1,4%)	
<b>Rifampicina</b>	9	(3%)	4	(1,8%)	
<b>Ciprofloxacino</b>	8	(2,7%)	3	(1,4%)	

<sup>a</sup>solo se muestran los valores significativos

Entre los 3 serotipos no vacunales más prevalentes (Tabla 18), las cepas perteneciente al serotipo 11F/D fueron las que mostraron mayor tasa de resistencia y hay que destacar que el 69% de las cepas de este serotipo fueron resistentes a SXT  $\geq 1/19 \mu\text{g/mL}$ . El serotipo 15B, el más prevalente de todos los serotipos no vacunales, mostró una resistencia superior al 10% a eritromicina, clindamicina, tetraciclinas, SXT y trimetoprim, con un 8,6% de resistencia a ciprofloxacino. Por otro lado, la resistencia entre las cepas del serotipo 23B fue prácticamente anecdótica.

**Tabla 18.** Número y porcentaje de cepas resistentes en los serotipos más frecuentes no incluidos en VNC13.

	15B (n=35)	11F/D (n=29)	23B (n=25)
<b>Penicilina oral</b>	2 (5,4%)	6 (20,7%)	5 (20%)
<b>Penicilina (<math>\geq 2\mu\text{g/mL}</math>)</b>	0	5 (17,2%)	0
<b>Amoxicilina</b>	0	4 (13,8%)	0
<b>Cefotaxima</b>	0	1 (3,4%)	0
<b>Eritromicina</b>	9 (25,7%)	10 (34,5%)	0
<b>Clindamicina</b>	78 (20%)	2 (6,9%)	0
<b>Tetraciclina</b>	7 (20%)	3 (10,3%)	0
<b>SXT sistémico</b>	9 (25,7%)	20 (69%)	4 (16%)
<b>Trimetoprim tópico</b>	5 (13,5%)	17 (58,6%)	3 (8%)
<b>Cloranfenicol</b>	0	1 (3,4%)	0
<b>Rifampicina</b>	1 (2,7%)	1 (3,4%)	0
<b>Ciprofloxacino</b>	3 (8,6%)	1 (3,4%)	0

## 4.5.3.2. Resistencia en cepas acapsuladas

Más de la mitad de las cepas acapsuladas fueron resistentes a penicilina oral y SXT sistémico (CMI  $\geq 1/19$   $\mu\text{g/mL}$ ) y aproximadamente una de cada 4 cepas presentó resistencia a eritromicina, clindamicina y tetraciclina (Tabla 19).

**Resistencia comparativa: capsuladas vs acapsuladas****Tabla 19.** Susceptibilidad antibiótica en las cepas capsuladas y acapsuladas.

	<b>Capsuladas (n=521)</b>	<b>Acapsuladas (n=256)</b>	
<b>Penicilina oral</b>	102 (19,6%)	136 (53,1%)	p < 0,001
<b>Penicilina (<math>\geq 2\mu\text{g/mL}</math>)</b>	25 (4,8%)	8 (3,1%)	
<b>Amoxicilina</b>	18 (3,5%)	3 (1,2%)	
<b>Cefotaxima</b>	10 (1,9%)	3 (1,2%)	
<b>Eritromicina</b>	139 (26,7%)	70 (27,3%)	
<b>Clindamicina</b>	116 (22,3%)	61 (23,8%)	
<b>Tetraciclina</b>	109 (20,9%)	60 (23,4%)	
<b>SXT sistémico</b>	141 (27,1%)	142 (55,5%)	p < 0,001
<b>Trimetoprim tópico</b>	85 (16,3%)	108 (42,2%)	p < 0,001
<b>Cloranfenicol</b>	6 (1,2%)	0	
<b>Rifampicina</b>	13 (2,5%)	3 (1,2%)	
<b>Ciprofloxacino</b>	11 (2,1%)	1 (0,4%)	

<sup>a</sup>Sólo se muestran los valores de p con valor significativo

Como se observa en la Tabla 19, las cepas acapsuladas fueron más resistentes que las capsuladas a penicilina oral y SXT: 53,1% vs 19,6% y 55,5% vs 27,1% respectivamente (p < 0,001).

Entre las cepas acapsuladas, las cepas pertenecientes al CC448 presentaron una gran sensibilidad antimicrobiana con solo dos cepas resistentes a rifampicina (Tabla 20). El 83,5% de las cepas del CC941 fueron resistentes a penicilina oral (CMI  $\geq 0,12$ ) y el 92,4% a SXT. Sólo se detectó una cepa resistente a eritromicina y clindamicina, y una cepa resistente a ciprofloxacino (Tabla 20). Las cepas del ST942 mostraron una prevalencia mayor de resistencia a penicilina oral que las cepas del ST941: 100% vs 75% respectivamente (p < 0,05).

En el CC344 se observó que todas las cepas fueron resistentes a penicilina oral (CMI  $\geq 0,12$   $\mu\text{g/mL}$ ) y 8 cepas mostraron resistencia de moderado o alto nivel a penicilina

(Tabla 20). Además, este genotipo mostró una alta prevalencia de multirresistencia: todas las cepas menos una mostraron resistencia a al menos 3 grupos de antimicrobianos. El patrón de multirresistencia más frecuentemente encontrado fue: penicilina + eritromicina + clindamicina + tetraciclina y SXT (78,6%).

**Tabla 20.** Porcentaje de cepas resistentes en los tres principales complejos clonales detectados en las cepas acapsuladas.

	<b>CC448 (n=103)</b>	<b>CC941 (n=79)</b>	<b>CC344 (n=70)</b>
<b>Penicilina oral</b>	0%	83,5%	100%
<b>Penicilina (<math>\geq 2\mu\text{g/mL}</math>)</b>	0%	0%	11,4%
<b>Penicilina (<math>\geq 4\mu\text{g/mL}</math>)</b>	0%	0%	2,9%
<b>Eritromicina</b>	0%	2,5%	97,1%
<b>Clindamicina</b>	0%	1,3%	85,7%
<b>Tetraciclina</b>	0%	0%	85,7%
<b>SXT sistémico</b>	0%	92,4%	97,1%
<b>Trimetoprim tópico</b>	0%	60,8%	84,3%
<b>Cloranfenicol</b>	0%	0%	0%
<b>Rifampicina</b>	1,9%	0%	0%
<b>Ciprofloxacino</b>	0%	1,3%	0%

#### **4.5. Recurrencias: reinfecciones y recaídas**

Un total de 27/738 pacientes (3,7%), todos ellos con menos de 4 años cuando tuvieron su primera conjuntivitis neumocócica, sufrieron al menos un episodio recurrente de conjuntivitis: 20 niños sufrieron una recurrencia, 5 niños dos, 1 niño tres y 1 niño seis, sumando en total 66 episodios de infección (27 infecciones primarias y 39 episodios recurrentes) que se resumen en la Tabla 21.

El padecer conjuntivitis neumocócica en edades muy tempranas de la vida fue un factor predisponente a sufrir recurrencias: el 5,9% (22/370) de los niños menores de 1 año sufrió al menos una recurrencia frente al 1,4% (5/368) de niños de un año o más de edad ( $p < 0,001$ ). Además, el 5,4% (20/370) de los niños cuyo primer episodio se produjo antes de cumplir el año presentaron una recurrencia antes de cumplir los 2 años de vida.

La mayoría de las recurrencias fueron infecciones nuevas causadas por neumococos distintos al responsable del episodio anterior (re infecciones,  $n=28$ ). En cuanto a las 11 episodios de recaídas, 10 niños sufrieron un nuevo episodio de conjuntivitis causado por el mismo neumococo (mismo serotipo y patrón de PFGE). Uno de ellos (paciente número 12) sufrió dos episodios de recaída distintos. El paciente 14, pese a tener dos episodios ocasionados por un neumococo de igual serotipo no se consideró recaída sino reinfección ya que su patrón PFGE mostró que se trataba de una cepa de neumococo diferente.

Todas las recaídas fueron causadas por cepas capsuladas y tan solo dos episodios de reinfección fueron causados por cepas acapsuladas (pacientes 3 y 4). Los otros 4 episodios que figuran en la Tabla 21 con cepas acapsuladas (pacientes 1, 6, 7 y 8) no son recurrencias ya que fueron el primer episodio y por tanto se consideran como conjuntivitis primarias. Las cepas acapsuladas ocasionaron el 7,1% (2/28) de los episodios de reinfección, en tanto que en el resto de conjuntivitis, las acapsuladas representaron el 33,9% (254 /749),  $p= 0,02$ .

De los 27 pacientes con recurrencias, 7 sufrieron más de dos episodios de conjuntivitis: 3 de ellos por obstrucción de la vía lagrimal mientras que en los otros 4 no se observó ningún factor predisponente.

Tabla 21. Pacientes con recurrencias (sombreados en gris lo pacientes con recaída).

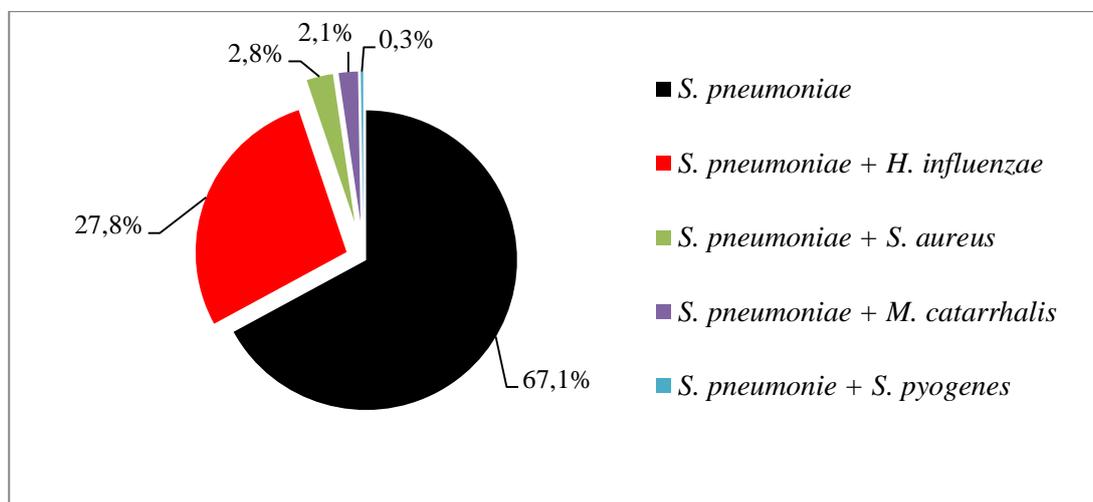
Paciente	Sexo	Edad en años	FECHA	Serogrupo/ Serotipo	PFGE
AI_1	M	1	05/12/2001	Acapsulada	-
			22/04/2002	36	-
			11/12/2003	23F	-
AI_2	M	1	28/10/2003	35F	-
			19/01/2004	36	-
EC_3	M	<1	23/12/2003	6B	-
			09/10/2006	Acapsulada	-
AA_4	H	<1	08/01/2004	11F/D	A
			11/02/2004	Acapsulada	-
			10/03/2004	24B	-
			20/08/2004	11F/D	A
EA_5	H	<1	20/03/2004	6A	B
			14/05/2004	6A	B
UM_6	H	1	01/06/2004	Acapsulada	-
			09/09/2004	7B/C	-
NG_7	M	3	07/02/2005	Acapsulada	-
			26/11/2008	19F	-
IJ_8	M	<1	24/05/2005	Acapsulada	-
			25/04/2009	9N	-
RD_9	H	<1	27/11/2005	35F	-
			07/03/2006	23F	-
NA_10	M	<1	07/06/2005	16A	C
			05/09/2005	16A	C
			03/01/2006	9V	-
FA_11	M	<1	16/05/2006	7F	-
			16/01/2007	40	-
AB_12	H	<1	04/11/2005	19A	D
			22/11/2005	19A	D
			30/06/2006	9V	-
			13/12/2006	15A	E
			10/01/2007	15A	E
			23/02/2007	8	-
TB_13	M	<1	03/04/2007	35B	-
			14/08/2007	6B	-
			06/10/2007	18C	-
VB_14	H	<1	28/09/2007	19A	F
			11/11/2007	19A	G
AA_15	H	<1	10/09/2007	23A	H
			28/09/2007	23A	H
DH_16	M	<1	14/12/2007	8	I
			07/04/2008	8	I
EI_17	H	1	15/01/2007	11F/D	J
			01/08/2007	11F/D	J
			28/11/2008	6C	-
HT_18	H	<1	16/12/2008	16F	-
			27/02/2009	21	-
NA_19	M	<1	01/04/2009	3	-
			18/03/2010	15B	-
EA_20	M	<1	25/11/2010	11F/D	-
			13/04/2011	21	-
MC_21	M	<1	05/04/2011	22F	K
			24/05/2011	22F	K
			10/06/2011	10A	-
OP_22	M	<1	30/05/2011	6A	L
			21/06/2011	6A	L
UL_23	H	<1	17/03/2011	24B	-
			03/05/2011	16F	-
IM_24	M	<1	20/07/2011	11F/D	-
			24/01/2012	15F/A	-
IJ_25	H	<1	13/11/2012	11F/D	M
			04/12/2012	11F/D	M
XA_26	H	<1	10/04/2013	19A	-
			13/06/2013	6A	-
			14/08/2013	6B	-
AF_27	H	<1	13/08/2013	33	-
			20/11/2013	23B	-

#### 4.6. Conjuntivitis neumocócicas mixtas. Coinfecciones

De los 777 episodios de conjuntivitis neumocócicas estudiados, en 256 (32,9%) episodios se aisló neumococo junto con otro patógeno. Hubo 7 pacientes con dos o más episodios de coinfección o conjuntivitis neumocócica mixta.

El microorganismo más frecuentemente encontrado en las coinfecciones fue

*H. influenzae* (n= 216; 27,8%), seguido de *S. aureus* (n= 22; 2,8%), *M. catarrhalis* (n= 16; 2,1%) y *S. pyogenes* (n= 2; 0,3%) (Figura 39).



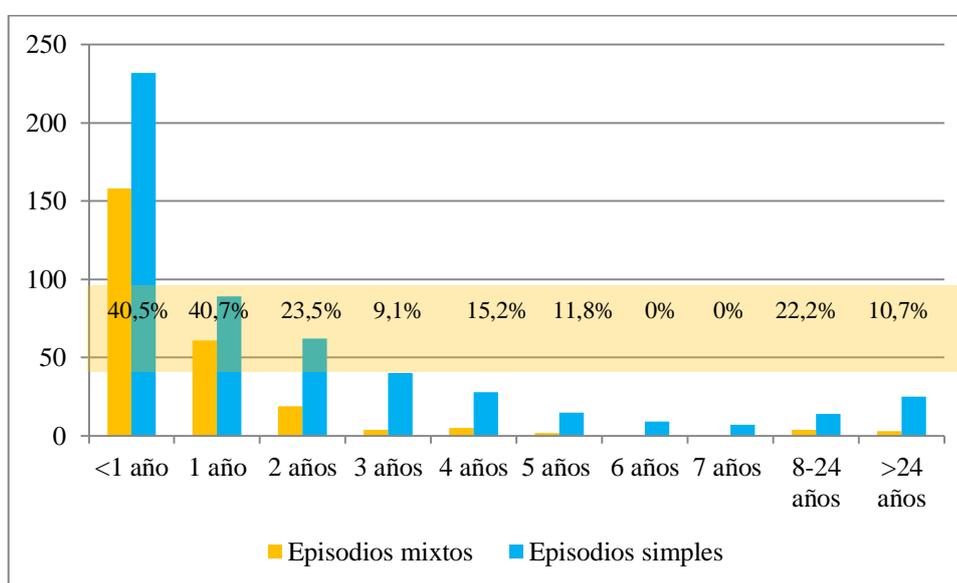
**Figura 39.** Porcentaje de conjuntivitis por neumococo como único patógeno y coinfecciones con otras especies bacterianas.

Consideradas todas las coinfecciones en su conjunto, la mayoría de ellas se dieron en niños menores de dos años: por episodios el 85,5% (219/256), o por pacientes (considerando el primer episodio) el 84,4% (200/237).

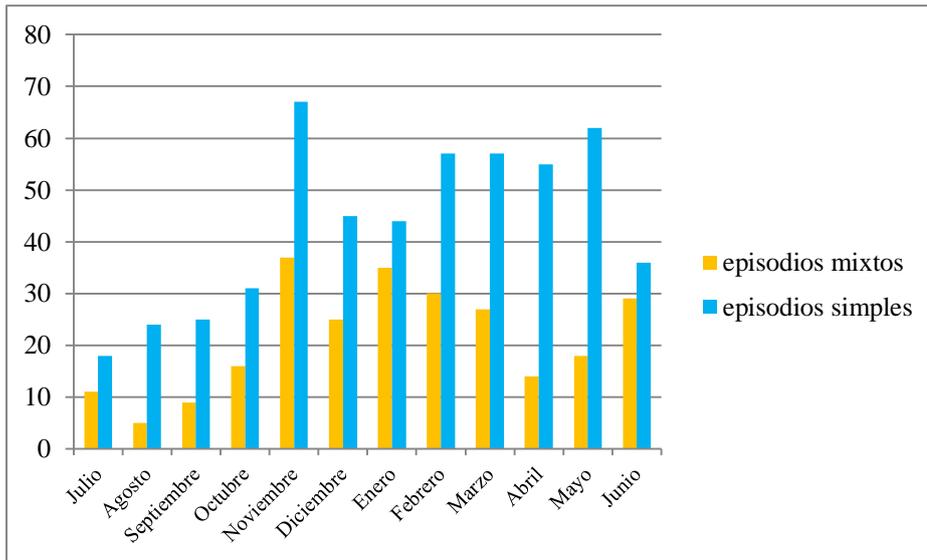
El 40,6% (219/540) de los episodios de conjuntivitis registrados en este grupo de edad, <2 años, fueron coinfecciones (Tabla 22 y Figura 40).

**Tabla 22.** Coinfecciones y conjuntivitis neumocócicas simples en niños < de 2 años y ≥2 años.

Edad	Episodios			Pacientes <sup>a</sup>		
	Infecciones mixtas	Infecciones simples	Total episodios	Infecciones mixtas	Infecciones simples	Total pacientes
<2 años	219	321	540	200	310	510
≥ 2 años	37	200	237	37	191	228
<b>Total</b>	<b>256</b>	<b>521</b>	<b>777</b>	<b>237</b>	<b>501</b>	<b>738</b>

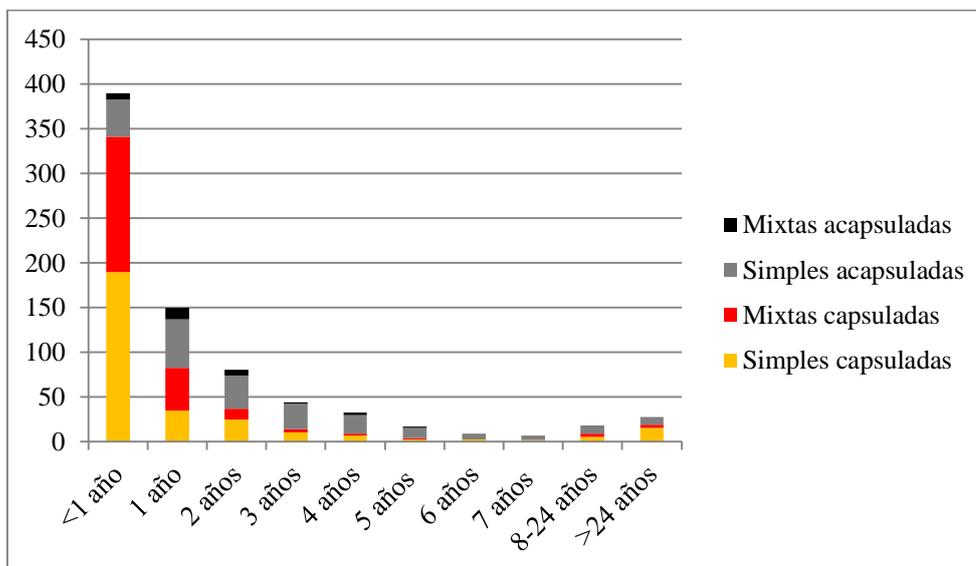
<sup>a</sup>Primer episodio**Figura 40.** Número de coinfecciones y conjuntivitis simples en enfermos según su edad y porcentaje de coinfecciones en cada edad.

Como ocurrió con el resto de conjuntivitis, las coinfecciones se dieron mayoritariamente en los meses fríos, siendo esta relación más marcada en las coinfecciones que en las conjuntivitis simples. Entre primeros de noviembre y finales de marzo se produjeron el 60,2% de las infecciones mixtas (154/256) frente al 51,8% (270/521) de las simples ( $p=0,028$ ) (Figura 41).



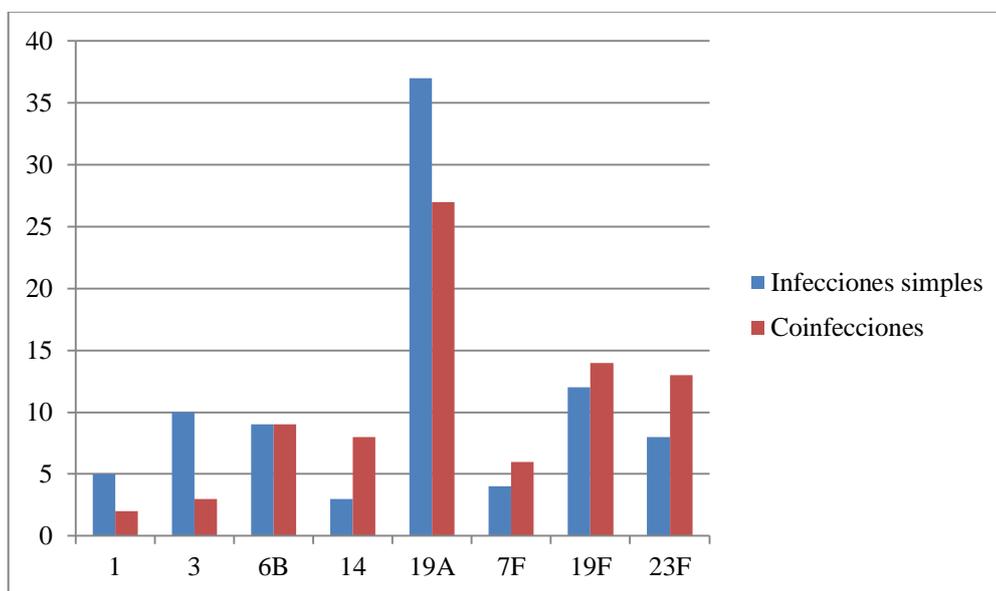
**Figura 41.** Número de episodios de conjuntivitis simples y coinfecciones detectada cada mes.

La presencia de cepas acapsuladas entre las coinfecciones fue muy escasa, como puede observarse en la Figura 42. Proporcionalmente, las cepas acapsuladas ocasionaron más episodios de conjuntivitis simples (223/521, 42,8%) que conjuntivitis mixtas (33/256, 12,9%),  $p < 0,001$ .



**Figura 42.** Distribución por edad de los episodios ocasionados por cepas acapsuladas y su relación con el tipo de conjuntivitis: simple o mixta (coinfección).

Tras analizar los episodios causados únicamente por cepas capsuladas para ver si las cepas más virulentas tendrían más posibilidades de encontrarse solas (conjuntivitis simples) que las menos virulentas que se “aprovecharían” de la contribución de otros patógenos (coinfecciones), observamos que los serotipos 1, 3, 6B, 14 y 19A (los más prevalentes en nuestro medio en formas invasivas durante época reciente), no se asociaron estadísticamente a las infecciones simples (Figura 43), aunque la mayoría (>70%) de los episodios con participación de los serotipos 1 ó 3 fueron conjuntivitis simples. De igual modo ampliando el análisis a otros serotipos frecuentemente asociados a formas invasivas como el 7F, 19F ó 23F, tampoco se observó que su frecuencia fuese mayor en las infecciones simples (Figura 43).

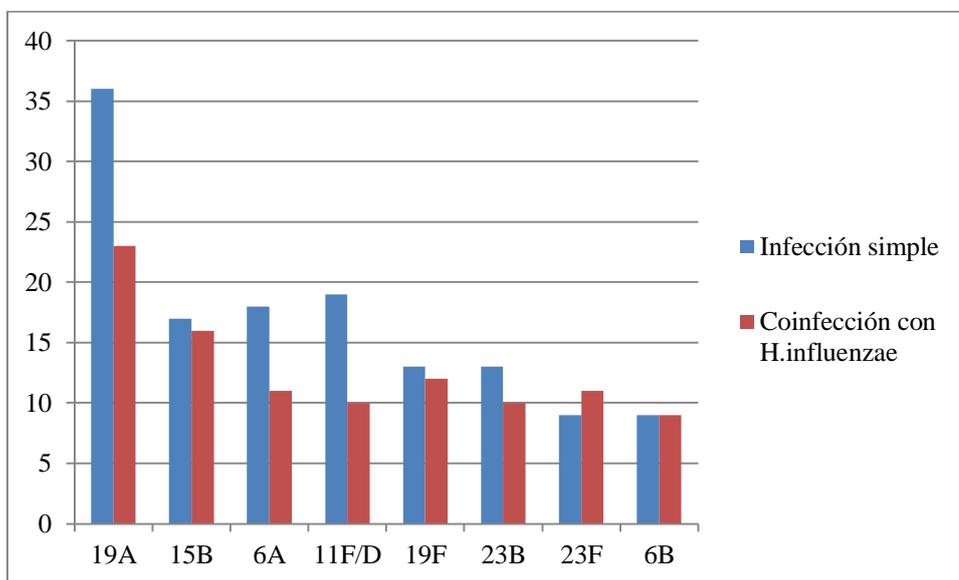


**Figura 43.** Número de episodios de infección simple o coinfección causados por serotipos virulentos.

#### 4.6.1. Infecciones mixtas (coinfecciones) con *H. influenzae*

*H. influenzae* fue el microorganismo más frecuentemente encontrado entre las infecciones mixtas (216/256, 84,4%) y teniendo en cuenta que se trata de uno de los principales patógenos causantes de conjuntivitis, se analizaron los episodios causados por este microorganismo en mayor detalle.

A lo largo del estudio la prevalencia de coinfecciones con *H. influenzae* no sufrió variaciones ( $p$  para tendencia = 0,3). Al ser tan mayoritario, los resultados para la asociación *S. pneumoniae* y *H. influenzae* fue prácticamente la misma que la referida anteriormente para la totalidad de las coinfecciones. Los resultados concretos de esta asociación solo refuerzan los obtenidos anteriormente para el conjunto de las infecciones mixtas. El 62,5% de los episodios se dieron entre noviembre y marzo y en tan solo 21 (9,7%) ocasiones, el neumococo acompañante fue una cepa acapsulada. En los dos primeros años de vida, se produjeron el 90,3% ( $n=195$ ) de las coinfecciones con *S. pneumoniae* y *H. influenzae*. Los serotipos más prevalentes en esta asociación coincidieron con los del resto de episodios (Figura 44).



**Figura 44.** Comparación de los serotipos más prevalentes que ocasionaron coinfecciones con *H. influenzae*, e infecciones simples.

## Infecciones oftálmicas neumocócicas distintas a conjuntivitis

En el presente trabajo también se analizó qué otras infecciones oftálmicas neumocócicas aparte de la conjuntivitis se dieron durante el periodo de estudio. La frecuencia de las mismas fue mucho menor detectándose durante principios de 1999 a finales de 2013: 10 endoftalmitis, 8 queratitis y 4 dacriocistitis neumocócicas. Un breve análisis de estos procesos se expone a continuación.

### 4.7. Endoftalmitis

Dentro de las infecciones oftálmicas la endoftalmitis es la que presenta mayor gravedad por afectar a las estructuras internas del ojo. En 7 casos la endoftalmitis sobrevino a una intervención oftalmológica reciente (menos de 7 días y en 4 ocasiones tras intervención de cataratas) y en tres casos no figuró antecedente quirúrgico en su historial. Todos los pacientes menos uno tuvieron 70 años o más, 5 fueron hombres y 5 mujeres. Todos ellos estuvieron causados por cepas capsuladas y tan solo se observó una infección mixta o coinfección. Mayoritariamente (7/10) estuvieron implicadas cepas incluidas en la VNC13.

**Tabla 23.** Características de los casos de endoftalmitis detectados.

Caso	Fecha	Sexo	Edad	Coinfección	Cirugía previa (tipo)	Serotipo	Resistencia
1	07/02/1999	Hombre	81	No	No	3	-
2	09/06/1999	Mujer	78	No	No	23F	Eri, Rif
3	08/05/2000	Mujer	89	No	No	6B	Pen SXT, Clor
4	17/11/2000	Hombre	80	<i>Candida parapsilosis</i>	Sí (cirugía cataratas)	9V	Pen
5	14/03/2003	Hombre	72	No	Sí (cirugía corneal)	19A	Eri
6	08/05/2003	Hombre	71	No	Sí (cirugía cataratas)	9V	Pen, SXT
7	23/03/2006	Mujer	91	No	Sí (cirugía cataratas)	23F	-
8	14/12/2007	Mujer	73	No	Sí (cirugía cataratas)	29	Pen
9	15/01/2008	Mujer	70	No	Sí (cirugía corneal)	11A	Eri, SXT
10	30/01/2012	Hombre	53	No	Sí (cirugía corneal)	11F/D	Rif

Eri (eritromicina), Rif (rifampicina), Pen (penicilina), Clor (cloranfenicol)

Todas las cepas fueron sensibles a cefotaxima, ciprofloxacino y vancomicina. Hubo una cepa resistente a cloranfenicol, dos cepas resistentes a rifampicina y tres cepas a SXT. En la Tabla 23 se observa la información básica relevante a la presente tesis de cada uno de ellos. De los diez pacientes con endoftalmitis, 5 sufrieron pérdida del ojo afectado (enucleación) y uno sufrió pérdida de visión.

#### **4.8. Queratitis y dacriocistitis**

La queratitis es una infección potencialmente grave y fue detectada en 8 ocasiones. Tan solo en una ocasión hubo una coinfección (Tabla 24) y fue ocasionada por un virus *Herpes Simplex*. En dicha ocasión se detectó la única cepa acapsulada en este tipo de infecciones, lo que sugiere que la córnea es mucho más resistente a la invasión que la conjuntiva.

Los casos de infección simple lo fueron por cepas capsuladas, 3 casos con úlceras corneales y 4 abscesos. La evolución de los abscesos corneales fue mejor que el de las úlceras. Los 4 casos de abscesos evolucionaron sin secuelas tras el tratamiento, en tanto que dos casos entre las 4 úlceras presentaron complicaciones (uno con leucoma corneal y entropión y otro con queratitis punteada residual).

Las cepas que ocasionaron abscesos corneales fueron muy sensibles a los antimicrobianos, tan solo una cepa mostró resistencia a SXT. El resto de cepas también fueron bastantes sensibles (Tabla 24).

La dacriocistitis neumocócica frecuentemente se asocia con úlcera corneal aunque entre los casos observados en esta serie no se encontró esta asociación. De las 4 dacriocistitis 3 se dieron en niños recién nacidos y evolucionaron bien. La del adulto evolucionó hacia la cronificación.

Tabla 24. Queratitis y dacriocistitis detectadas durante 1999 y 2013.

	Fecha	Sexo	Edad (años)	Coinfección	Serotipo	Resistencia
Absceso corneal 1	26/12/2001	Hombre	62	No	9N	-
Absceso corneal 2	29/04/2003	Hombre	58	No	11F/D	SXT
Absceso corneal 3	28/12/2004	Mujer	78	No	3	-
Absceso corneal 4	17/04/2005	Hombre	81	No	23B	-
Úlcera corneal 1	08/07/2011	Hombre	34	No	15B	Pen
Úlcera corneal 2	01/08/2011	Hombre	58	No	20	-
Úlcera corneal 3	27/03/2013	Hombre	87	No	19A	-
Úlcera corneal 4	10/12/2013	Hombre	69	<i>Herpes simplex</i> <i>1</i>	Acapsulada	Pen, Eri, Tet, SXT
Dacriocistitis 1	03/01/2005	Mujer	39	No	21	Rif
Dacriocistitis 2	24/05/2005	Hombre	< 1	No	16F	-
Dacriocistitis 3	08/08/2007	Mujer	< 1	<i>H. influenzae</i>	Acapsulada	-
Dacriocistitis 4	16/10/2009	Mujer	< 1	<i>H. influenzae</i>	19A	Eri

Pen (penicilina), Eri (eritromicina), Tet (tetracilina), Rif (rifampicina)



## **5. DISCUSIÓN**



Las consultas médicas en atención primaria relacionadas con el ojo representan del 2% al 6% del total de las consultas que se realizan con una tasa de 57-70 consultas /1000 personas según los diferentes estudios realizados en Inglaterra, Europa del Este y Oriente medio.<sup>6 102 104</sup> En España, las oftálmicas, se encuentran entre las 50 consultas más frecuentes.<sup>105</sup>

Dentro de las consultas relacionadas con el ojo, una de las más frecuentes es la conjuntivitis infecciosa, siendo ésta especialmente prevalente en la edad pediátrica.<sup>2 102</sup>

### **Características generales de la muestra**

La presente serie de exudados conjuntivales partió de un total de 8.929 muestras recibidas entre 1999 y 2013, y fue desde 2006 cuando el número de muestras que se recibieron en el laboratorio se estabilizó, recibándose del orden de 700 exudados cada año. Para esta tesis doctoral se seleccionó una muestra de 777 episodios de conjuntivitis neumocócicas, muestra que fue representativa entre las solicitadas año a año y constituyó el 68% de la muestra total recibida.

La mayoría de los episodios fueron conjuntivitis agudas que aparentemente se resolvieron sin mayores complicaciones.

Como cabía esperar al ser la conjuntivitis bacteriana una infección que afecta sobre todo a los niños, la mayoría de las muestras recibidas, el 74%, fueron de pacientes en edad pediátrica. También predominaron los niños entre los 777 episodios de conjuntivitis neumocócica aquí incluidos. Los episodios se observaron sobre todo en los menores de 12 meses de edad siendo muy infrecuentes en población adulta. En adultos las conjuntivitis son producidas mayoritariamente por virus, sin embargo las bacterianas son más frecuentes que las víricas en la edad pediátrica.<sup>106</sup> Neumococo es uno de los patógenos principales causantes de conjuntivitis en niños y en adultos<sup>2 8</sup> y en la presente serie la conjuntivitis neumocócica fue la segunda causa de conjuntivitis bacteriana tras la causada por *H. influenzae*. La presencia de *S. aureus* referida en algunas otras series como causa más frecuente que la neumocócica<sup>106 107</sup> debe ser tomada con precaución habida cuenta de la frecuente presencia de este microorganismo en la conjuntiva de sujetos sin conjuntivitis.<sup>8</sup>

La mayor frecuencia observada de la conjuntivitis neumocócica en niños es congruente con lo que sucede con el conjunto de la enfermedad neumocócica, sea enfermedad invasiva o no invasiva como la otitis media.<sup>7</sup>

### **Estacionalidad**

Al igual de lo que sucede con la enfermedad neumocócica invasiva,<sup>108-110</sup> los episodios de conjuntivitis en esta serie mostraron estacionalidad, concentrándose la mayoría de los episodios en otoño e invierno. Entre noviembre y febrero se observaron el 36,6% de los episodios frente a 17,9% entre julio y octubre.

El aumento de la tasa de la enfermedad neumocócica en los meses fríos se podría achacar entre otros factores, a un aumento en la transmisión del neumococo<sup>111 112</sup> y por otro lado a la mayor susceptibilidad del hospedador. La mayor susceptibilidad a la infección en hipotermia es bien conocida no solo por la disregulación de la respuesta inflamatoria,<sup>113 114</sup> sino también debido a la circulación de los virus respiratorios, como el VRS, Influenza,... que favorecerían la colonización e infección por neumococo. En el trabajo realizado por Weinberger *et al*<sup>115</sup> sobre enfermedad neumocócica, se analiza el peso de estos factores y concluyen que en el caso de la neumonía invasiva su estacionalidad se debe a una mayor susceptibilidad del sujeto favorecida por los virus respiratorios que circulan en invierno, mientras que la estacionalidad de otras enfermedades neumocócicas lo es por el aumento de la transmisibilidad nasofaríngea del neumococo. Utilizando modelos matemáticos y de inferencia estadística, Numminen *et al*,<sup>116</sup> observan que la transmisibilidad de neumococo, al igual que sucede con el virus influenza es significativamente mayor en los meses fríos y secos.

En el caso de las conjuntivitis, Normann postula que en los niños el estrechamiento del conducto lagrimal que produce la rinitis se traduce en un peor drenaje de las lágrimas del saco conjuntival, lo que favorecería el desarrollo de conjuntivitis y explicaría que las conjuntivitis estuvieran muchas veces acompañadas de rinitis.<sup>117</sup> Por tanto, en épocas frías que es cuando más circulan los virus respiratorios provocando entre otros síntomas rinitis, el huésped estaría más susceptible a padecer una conjuntivitis.

En nuestra serie fue durante la estación de verano cuando se registró el menor número de episodios. En verano no hay escolarización y hay más actividades al aire libre que en recintos cerrados, por lo que habrá menor riesgo de contagio. Por otra parte, es el

frío el que favorecería la menor defensa inmunitaria y en el verano hay menos circulación de virus respiratorios, factores que como se ha comentado anteriormente, están asociados a la colonización.

### **Serotipos encontrados**

Si bien en la literatura hay numerosos estudios sobre los serotipos implicados en la enfermedad neumocócica invasiva y en algunas enfermedades no invasivas como la otitis, hay pocos datos referentes a los serotipos implicados en las conjuntivitis no relacionadas con brotes. El presente estudio incluyó un total 777 episodios de conjuntivitis con la caracterización de todas las cepas, de las cuales 521 (67,1%) fueron cepas capsuladas, y por tanto serotificables. El resto de los episodios, un total de 256 (32,9%), fueron causados por cepas no capsuladas. La discusión sobre la frecuencia y tipo de cepas acapsuladas se hará más adelante.

Se detectó una amplia variedad de serotipos, hasta un total de 49, de los cuales seis agruparon casi un tercio del total de los episodios. El serotipo que causó el mayor número de conjuntivitis en el periodo estudiado fue el 19A (8,2%), seguido del 15B (4,5 %), 6A (4,4%), 11F/D (3,7%), 19F (3,3%) y 23B (3,2%). Dividiendo el periodo de estudio en dos periodos pre-VNC7 (1999-2001) y post-VNC7 (2002-2013), se observó que el serotipo mayoritario en el periodo pre-vacunal fue el 19F, con el 15,9% de las cepas aisladas en esa época mientras que en el periodo postvacunal el 19A fue el más frecuente, representando el 8,5% de las cepas. Además en el periodo post-vacunal hubo una mayor variabilidad de serotipos presentes.

Entre los escasos estudios existentes sobre conjuntivitis neumocócica donde se indique el serotipo o serogrupo de las cepas, tan solo hay uno realizado en España. El estudio español fue realizado por Berrón *et al*<sup>118</sup> sobre un total de 1.068 cepas de neumococo causantes de conjuntivitis recibidas en el Centro Nacional de Microbiología entre los años 1997 y 2002. El serogrupo encontrado en mayor proporción fue el 19, que fue detectado en el 14,1% de las cepas. En dicho estudio no se especificó la aportación de los distintos serotipos que engloba el serogrupo 19, pero el porcentaje obtenido (pese a la irregular procedencia de las cepas) fue muy similar al del presente estudio donde el

serogrupo 19 fue también el más numeroso agrupando al 11,6% de total de los episodios.

La circulación de los distintos serotipos puede verse influenciada por multitud de variables: años durante los que se realizó el estudio, localización geográfica, utilización de las vacunas, etc. La presente tesis doctoral se realizó con la experiencia de 15 años (1999-2013), incluyendo 3 años en los que aún no se habían introducido las vacunas conjugadas y unos 12 años durante los cuales una alta proporción de niños se encontraban vacunados, bien con la VNC7 o bien con la 10-valente o VNC13, las cuales empezaron a utilizarse alrededor de 2010. La 10-valente, introducida a mitad de 2009 fue escasamente utilizada. Por tanto, a la hora de comparar la prevalencia entre los distintos estudios es conveniente tener en cuenta este factor. El trabajo de Berrón *et al*<sup>118</sup> se realizó en época mayoritariamente pre-vacunal (periodos 1997-2002), en tanto que este estudio se realizó mayoritariamente en época post-vacunal. No obstante si se comparan los serogrupos encontrados únicamente en los periodos pre-vacunales los serogrupos más prevalentes fueron también similares. Hubiera sido muy interesante conocer si el 19F también fue el serotipo más frecuente de las cepas del estudio de Berrón *et al*.<sup>118</sup>

En cuanto al resto de estudios sobre neumococos causante de conjuntivitis esporádicas, se observaron coincidencias con un estudio realizado en Israel en población no vacunada donde el serotipo 19F fue también el más prevalente causando el 14% de los episodios,<sup>119</sup> frente al 15,9% de la presente serie para un periodo similar pre-vacunal. En un nuevo estudio realizado también en Israel, incorporando un par de años más (2000-2004) pero aún sin que la VNC7 se hubiese utilizado en esa región, se observó cómo el 19F seguía siendo muy prevalente y tan solo superado por el 6A y el 23F (8,3% 19F, 9,2% 6A y 23F). El único trabajo que analizó los episodios en un periodo posterior a la VNC7 fue el de McElligott *et al*<sup>120</sup> en Irlanda en donde entre 84 episodios el más prevalente fue el serotipo 11A, aunque el 19A (el más prevalente en nuestra región en este periodo post-vacunal) estuvo entre los 3 serotipos más prevalentes.

Para causar enfermedad neumocócica es necesaria la colonización previa, tanto en la enfermedad invasiva como en la no invasiva, por ejemplo, la otitis o sinusitis.<sup>49</sup> En el caso de las conjuntivitis esporádicas, parece razonable pensar que los neumococos que colonizan con mayor frecuencia al individuo serían los que causasen los episodios de conjuntivitis. Una característica peculiar de la conjuntivitis a diferencia de otros tipos de infecciones neumocócicas es que puede aparecer en forma de brotes. Como se discutirá más adelante los brotes se han asociado más a neumococos sin cápsula. Si analizamos los serotipos causantes de conjuntivitis obtenidos en niños con los registrados en un estudio de portación que se realizó en una guardería en nuestra misma ciudad entre 2004 y 2005, observamos que tanto el serotipo 19A como el 15B fueron serotipos frecuentemente detectados (serotipo 19A en primer lugar y 15B el tercero en frecuencia).<sup>96</sup> Sin embargo, pese a que en nuestro estudio el 32,9% de los episodios de las conjuntivitis fueron causados por cepas acapsuladas, la prevalencia en el estudio de portación de cepas en las que no se detectó capsula fue del 6%.

Una prevalencia de serotipos similar a la encontrada en las conjuntivitis se observó en un trabajo realizado sobre neumococos causantes de otitis en Gipuzkoa.<sup>99</sup> La similitud se mantuvo al desglosar los resultados por periodos pre y post-VNC7 con los serotipos 19F y 19A como más prevalentes, respectivamente. Sin embargo el serotipo 3, el segundo en prevalencia en las otitis, apenas causó unos pocos episodios de conjuntivitis (1,8%). El serotipo 19A también fue el más prevalente en la enfermedad neumocócica invasiva en niños menores de 5 años en Gipuzkoa entre 1999 y 2007 aunque el serotipo 1, que fue el segundo en frecuencia en la enfermedad neumocócica invasiva, fue encontrado muy excepcionalmente en conjuntivitis y en las infecciones oculares en su conjunto.<sup>121</sup>

### **Serotipos vacunales y no vacunales**

Una de las estrategias para prevenir la enfermedad neumocócica fue el desarrollo de vacunas que además de proteger frente a la enfermedad neumocócica invasiva disminuyeran la colonización nasofaríngea. Las que han mostrado esta capacidad son las vacunas conjugadas 7, 10 y 13 valentes. Por su mayor tasa de colonización, los niños son el principal reservorio y los mayores transmisores de la infección. Por tanto

la vacunación infantil previene la enfermedad neumocócica por los serotipos incluidos en ellas, no sólo en los niños, sino también en adultos, al ejercer una protección de rebaño.<sup>81</sup>

La VNC7 fue introducida en el País Vasco a finales del 2001 y la VNC10 y VNC13 alrededor de 2010. Aunque hasta muy recientemente la VNC13 no estaba subvencionada por la Sanidad Pública (finales de 2015), por venta privada la cobertura estimada de la VNC7 pronto alcanzó el 50% de la población infantil, estimándose que para el año 2013 la cobertura alcanzada estuvo alrededor del 70%.

Al igual que en muchos otros lugares, la vacunación con las vacunas conjugadas ha provocado una disminución de enfermedad y de la colonización por los serotipos incluidos en dichas vacunas y por tanto ha repercutido en una disminución de la incidencia de la enfermedad neumocócica invasiva y no invasiva.<sup>121-124</sup> Sin embargo, un efecto asociado es el aumento proporcional de episodios causados por serotipos no incluidos en dichas vacunas debido al hueco que dejarían en el nicho ecológico.<sup>125 126</sup>

Existen muy pocos trabajos que estudien el impacto de la vacunación neumocócica en los serotipos causantes de conjuntivitis o incluso la cobertura teórica que dichas vacunas podrían ofrecer a pesar de estar dirigidas frente a la enfermedad invasiva. En el presente estudio, incluso en la época prevacunal, los episodios causados por neumococos de serotipos incluidos en VNC7 tan solo constituyeron un tercio de los mismos (22 episodios *versus* 21 por no vacunales y 20 por cepas acapsuladas). En Israel se observaron cifras muy similares para dicho periodo prevacunal (34% fueron serotipos VNC7).<sup>127</sup> Sin embargo, tras el uso durante de al menos 7 años de la VNC7 en Gipuzkoa, observamos que menos del 4% (periodo 2008-2010) de las conjuntivitis fueron ocasionados por cepas vacunales (serotipos incluidos en la VNC7).

La comercialización de la VNC13 permitió que su uso pudiese proteger a un mayor número de niños con conjuntivitis, pese a que esta protección teórica tan solo abarcase a aproximadamente 17% del total de las cepas. En este último periodo (2011-2013), junto al 17% de los episodios ocasionados por cepas con serotipos incluidos en la VNC13, encontramos un 55% de cepas de otros serotipos y un 28% de cepas acapsuladas.

Pese a su escasa cobertura, en conjunto los serotipos incluidos en las vacunas causantes de conjuntivitis disminuyeron significativamente a lo largo del estudio al igual de lo ocurrido con la enfermedad neumocócica invasiva y no invasiva también en Gipuzkoa y otras regiones.<sup>99 121 126</sup>

El serotipo 19A, incluido solo en la VNC13, fue el más prevalente del presente trabajo. Cabe destacar cierta variabilidad en la circulación de dicho serotipo observada en los diferentes periodos de tiempo. En números absolutos observamos un incremento en los primeros años: de 7 casos en el trienio 2002-2004 a 24 y 21 casos durante 2005-2007 y 2008-2010 respectivamente, para descender de nuevo tras la introducción de la VNC13: 9 casos durante 2011-2013. Sin embargo estas diferencias no fueron significativas cuando se relacionaron con el total de episodios ocurridos en cada periodo. El serotipo 19A es uno de los serotipos que ha adquirido mayor protagonismo en los últimos años. Diversos estudios achacan el aumento de episodios causados por este serotipo al reemplazo ocasionado por la introducción de la VNC7<sup>128 129</sup>. Sin embargo, al igual que nosotros,<sup>130</sup> otros ya observaron un aumento significativo en número de casos debidos al serotipo 19A antes de la introducción de la VNC7, aumento que también se observó en países en donde no se había introducido la vacuna.<sup>131 132</sup>

En conjunto, las cepas capsuladas de serotipos no vacunales (no VNC13), además de aumentar proporcionalmente en los episodios de conjuntivitis de los últimos años también sufrieron un incremento en valores absolutos. Los episodios ocasionados por cepas no vacunales constituyeron 32% durante 2005- 2007; 45% durante 2008-2010 y 55% durante 2011-2013. En número el aumento fue menos manifiesto, con 79, 85 y 89 episodios para los tres anteriores periodos.

Los 3 serotipos no vacunales más prevalentes fueron: 15B (n=35), 11F/D (n=29) y 23B (n=25). Tanto los episodios ocasionados por cepas del serotipo 11F/D como 23B aumentaron significativamente a lo largo de los cinco trienios del estudio. La disminución de los episodios ocasionados por cepas del serotipo 15B en el último trienio (17 episodios durante 2008-2010 y 6 episodios durante 2011-2013), hizo que el descenso a lo largo de los 15 años no fuese estadísticamente significativo (p para

tendencia =0,06). En cuanto a otros estudios sobre conjuntivitis, en el trabajo de Shouval *et al*<sup>127</sup> el 15B/C también se trató de uno de los serotipos más prevalentes entre los no vacunales. El aumento del serotipo 23B tras la introducción de las vacunas conjugadas también se observó en un estudio realizado en Alemania en enfermedad neumocócica invasiva, así como en un estudio de portación realizado en el Reino Unido.<sup>133 134</sup> En el trabajo realizado en Gipuzkoa sobre cepas de neumococo causantes de otitis, al igual que en esta serie, tanto el serogrupo 11 como el 15 fueron los dos serogrupos más prevalentes dentro de los serotipos no vacunales, sin embargo, el serotipo 23B apenas causó unos pocos episodios de otitis.<sup>99</sup>

### **Neumococos acapsulados**

En la presente serie, todas aquellas cepas de neumococo, un total de 256, que no pudieron tipificarse, resultaron ser cepas acapsuladas ya que ninguna de ellas amplificó para el gen capsular *cpsA*. Además la identificación de especie de todas ellas se confirmó molecularmente al ser positivas para los genes de la autolisina y neumolisina. A menudo en la literatura las cepas de neumococo acapsuladas se denominan neumococos “no-tipificables” ya que al carecer de cápsula polisacárida no reaccionan con los antisueros en la reacción de Quellung. Sin embargo este término es confuso porque también incluye a aquellos neumococos que pese a poseer cápsula no se llega a su serotipo (fallo del método, no disponer de toda la batería de antisueros...). Además de “no-tipificables” las cepas acapsuladas también son denominadas en la literatura “neumococos atípicos” o “*S. pneumoniae-like*” aunque estas dos últimas denominaciones son incorrectas ya que también se utilizan para hacer referencia a algunos estreptococos no neumocócicos o a aquellas cepas de neumococo con alguna discordancia en alguna de las pruebas de identificación fenotípica como la optoquina o la solubilidad en bilis.<sup>135-137</sup>

Los episodios de conjuntivitis causados por cepas acapsuladas en la presente serie representaron el 32,9% del total, porcentaje superior al de la mayoría de estudios cuyo porcentaje osciló entre el 12% y 23,2%.<sup>91 118-120 127</sup> e inferior al de un estudio norteamericano publicado en 2011<sup>138</sup> sobre cepas causantes de conjuntivitis esporádica en donde la práctica totalidad de episodios (91,7%) fueron causados por neumococos

acapsulados. Este estudio americano es el único existente hasta la fecha en donde el número global de episodios causados por cepas acapsuladas superó al conjunto de cepas capsuladas.

Fue en un trabajo publicado en el año 1977 donde por primera vez se constató que las cepas presuntamente carentes de cápsula (no reacción de Quellung) se aíslan en mayor proporción en muestras conjuntivales que en otras localizaciones.<sup>91</sup> Esta asociación positiva entre cepas acapsuladas y conjuntivitis también fue referida por Shouval *et al*<sup>127</sup>. En nuestro medio esta elevada asociación con cepas acapsuladas no se observó en otras infecciones neumocócicas como sepsis, neumonías, exacerbación de EPOC u otitis medias.<sup>81 99 121</sup>

Aún no está claro el porqué de la preferencia de las cepas acapsuladas por el epitelio conjuntival. Uno de los motivos podría ser por la mayor actividad neuraminidasa (degradación de la mucina) de las cepas acapsuladas.<sup>139</sup> La capa de mucina de la superficie de la conjuntiva protege al ojo de las infecciones, desecación o erosión y actúa evitando la adherencia del neumococo.<sup>140</sup> En un modelo animal realizado en conejos observaron que las cepas acapsuladas poseen una mayor actividad neuraminidasa que las capsuladas; esta actividad neuraminidasa aportaría una ventaja en la fase inicial de adhesión de neumococo y además le proporcionaría la capacidad de utilizar la mucina como fuente de carbono para favorecer su desarrollo lo cual le daría más posibilidades de invadir la conjuntiva y por tanto causar infección.<sup>139</sup> Por otro lado y añadido a lo anterior también se ha sugerido que determinados cepas acapsuladas típicamente relacionados con conjuntivitis, poseen una serie de genes que codifican para estructuras de superficie (adhesinas) que en parte podrían explicar el tropismo ocular.<sup>95</sup>

En la presente serie la prevalencia de los episodios causado por cepas acapsuladas no varió a lo largo del tiempo y la introducción de las vacunas conjugadas tampoco afectó a dicha prevalencia. Las vacunas conjugadas no ofrecen protección frente a las cepas acapsuladas y por tanto era esperable que su prevalencia no se viera influenciada directamente. Se podría pensar en un posible aumento debido a la competición de los distintos neumococos en el nicho ecológico como ocurre con los serotipos no

vacunales, pero en la literatura no existen estudios que alerten del aumento de enfermedad neumocócica por cepas acapsuladas tras la inmunización de los niños con las vacunas conjugadas. La mayoría de los estudios de portación observan un recambio de los serotipos capsulares por otros serotipos también capsulados no incluidos en la vacuna, sin detectar un aumento de cepas acapsuladas.<sup>141-143</sup> Una excepción es un trabajo sobre portación realizado en niños en Portugal en donde observaron un aumento significativo de cepas acapsuladas tras la introducción de la VNC7.<sup>144</sup>

En la presente serie se observó una mayor incidencia de conjuntivitis causadas por cepas con cápsula en los niños menores de 1 año y conforme el niño fue teniendo más edad, su susceptibilidad a las cepas capsulares fue disminuyendo. Este hallazgo también fue descrito en el trabajo de Hass *et al*<sup>138</sup>, en donde la práctica totalidad de episodios capsulados registrados, si bien las cepas capsuladas fueron muy poco prevalentes en este trabajo, se agruparon entre los niños en sus primeros años de edad. En nuestra serie a partir de los dos o más años de edad, la mayoría de los episodios de conjuntivitis neumocócica estuvieron causados por cepas acapsuladas. Este hecho se podría explicar por la mayor contagiosidad de las cepas acapsuladas y coincidiendo con la edad de la mayor socialización de los niños (colegios, actividades extraescolares). Las cepas acapsuladas se han descrito como causa de brotes en guarderías, colegios, universidades y cuarteles, y sin embargo no hay descritos brotes de conjuntivitis por cepas capsuladas, lo cual sugiere una mayor contagiosidad del neumococo cuando está desprovisto de la cápsula polisacárida.

El presente trabajo es la serie que incluye el mayor número de aislamientos de neumococos acapsulados caracterizados molecularmente causantes de conjuntivitis esporádica de una única región. En la mayoría de los trabajos de conjuntivitis neumocócica no se ha estudiado la epidemiología molecular de las cepas acapsuladas, y hasta la fecha existen solo unos pocos trabajos además del publicado por el equipo de investigación de la presente tesis doctoral que aporten datos sobre los genotipos implicados.<sup>94 95 118 136 145</sup> En el presente trabajo, al igual que lo descrito en la literatura, se observó una alta clonalidad de las cepas acapsuladas. El análisis genotípico mediante PFGE agrupó en únicamente cuatro clones principales casi al 90% de las

cepas. Además, mediante MLST, 252 de las 256 cepas acapsuladas pertenecieron a solo 3 complejos clonales: CC448 (40,2%), CC941 (30,9%) y CC344 (27,3%), siendo los secuenciotipos mayoritarios ST448 y ST941. En el estudio español de Berrón *et al*<sup>118</sup> también se observó una distribución clonal de las 40 cepas acapsuladas causantes de conjuntivitis caracterizadas coincidiendo la mayor prevalencia de CC941 y CC344 y de cepas ST941. En dicho estudio de Berrón *et al*<sup>118</sup> no se detectaron cepas ST448, lo cual coincide con la dinámica que presentó este genotipo en Gipuzkoa, ya que en el periodo de estudio incluido en el trabajo de Berrón *et al*<sup>118</sup> que comprendió de los años 1997 a 2002, este secuenciotipo solo causó dos episodios en Gipuzkoa. Todo ello sugiere una diseminación por la península ibérica de las cepas ST448 tardía, a diferencia de lo que ocurrió en EEUU.<sup>92 93</sup>

En un estudio donde se incluyeron más de 200 neumococos aislados de pacientes que residían en diferentes estados norteamericanos<sup>95</sup>, encontraron igualmente una elevada clonalidad entre las cepas y un protagonismo destacado de los genotipos presentes en nuestra serie. El genotipo ST448 fue también el mayoritario agrupando a más de la mitad de los neumococos. ST344 fue el segundo más prevalente. En el anterior estudio estos autores sugieren que unos pocos genotipos poseen unos genes que generan las adhesinas que favorecerían el tropismo ocular, razón por la que son los más frecuentemente encontrados en las conjuntivitis.<sup>95</sup> En el trabajo israelí de Porat *et al*,<sup>136</sup> más de la mitad de las cepas acapsuladas aisladas entre 2000 y 2004 se agruparon también en los complejos clonales CC448 y CC344. Es de destacar que ni en el estudio norteamericano ni en el israelí encontraron cepas pertenecientes al CC941, en tanto que fue el segundo en prevalencia en el presente trabajo. Las cepas pertenecientes al CC941 (ST941 y ST942) pese a haberse detectado en varios lugares de la Península Ibérica<sup>60 118 144</sup> y haber mostrado un comportamiento epidémico (30 episodios de conjuntivitis en Gipuzkoa entre noviembre 2005 y noviembre 2006) no parece haberse encontrado en otros lugares, lo que sugiere que se trata de un clon o clones emergentes que podría diseminarse en un cercano futuro por el resto de regiones.

ST448, el mayoritario en la presente serie, también ha sido causante de numerosos brotes de conjuntivitis en Estados Unidos, afectando a millares de individuos. Por

ejemplo en el año 1980 hubo un brote entre estudiantes universitarios en el estado de New York con 1500 afectados y posteriormente en 2002 se registraron casi 700 casos de conjuntivitis entre estudiantes pertenecientes a una universidad de New Hampshire.<sup>93 137</sup> Además ST448 parece que tiene una gran capacidad de diseminación ya que además de producir brotes en instituciones “cerradas” se describió también como causante de un brote comunitario en Minnesota.<sup>92</sup> En este brote se vieron implicados niños y adultos que acudían a distintas guarderías, colegios y universidades, pero también personas ajenas a estos centros.

En nuestro medio ST448, sufrió una distribución desigual a lo largo de los 15 años de estudio. Se detectó por primera vez en el año 2001 pero hasta 2004 tan solo se detectaron 4 episodios. A partir de esa fecha fue incrementándose alcanzando 18 episodios en 2010 y permaneciendo endémico hasta el final del estudio. El clon ST448 se ha detectado en Europa, América, Asia y Oceanía.<sup>60 146 147</sup>

Por otro lado la incidencia de CC344, el tercero en importancia de prevalencia en Gipuzkoa, no mostró agrupamientos temporales, detectándose casos esporádicos a lo largo de los 15 años estudiados. Este CC se ha detectado en varios países de Europa así como en EEUU mayoritariamente en forma de episodios esporádicos y de forma endémica.<sup>60 92</sup> El único estudio donde pudo establecerse una cierta asociación con brotes ocasionados por cepas del CC344, fue el de Minnesota anteriormente referido y que fue principalmente ocasionado por cepas del ST448, aunque se sospechó también una parcial participación de cepas del CC344.<sup>92</sup>

Únicamente 4 cepas acapsuladas de nuestra serie no se agruparon dentro de los tres complejos clonales mencionados. Los secuenciotipos encontrados fueron ST62, ST72 y dos episodios causados por cepas del ST393. Estos secuenciotipos se han descrito principalmente en cepas capsuladas.<sup>60</sup>

En el trabajo realizado por Hathaway *et al*<sup>86</sup> sobre la filogenia y origen de las cepas acapsuladas, las agruparon en dos grupos denominado I y II en función del perfil del MLST y el análisis de los genes capsulares. Dentro del grupo I incluyeron aquellas cepas con un patrón de MLST típico de cepas capsuladas, lo cual les sugiere que estas

cepas podrían haber emergido de cepas capsuladas y haber evolucionado y sufrido después alguna mutación en la región del gen capsular. Por lo tanto las 4 cepas acapsuladas de la presente serie que no se agruparon dentro de los clones principales podrían incluirse dentro de este grupo I ya que todas ellas tenían un perfil de MLST relacionado con cepas capsuladas.

Por otro lado, en el estudio de Hathaway *et al*<sup>86</sup> en el grupo de cepas acapsuladas II observaron la presencia de una secuencia peculiar que estarían relacionada con el control de la adherencia (*aliB*-like ORF-1 y ORF-2), sugiriendo que el ORF-1 podría haberse adquirido por transferencia horizontal a partir de *S. mitis*, y el ORF-2 a partir de *S. gordonii*.

Los CC448 y CC334 se incluyeron dentro de este grupo II y en ellos se detectó la secuencia relacionada con la adherencia. Pese a no haber analizado ninguna cepa CC441, parece esperable que también formen parte de este grupo dado que presentan un perfil alélico de MLST únicamente detectado en cepas acapsuladas.

Otros genes encontrados en cepas del grupo II de secuenciotipos no encontrados en el presente trabajo de tesis, han sido relacionados con la adherencia (*pspK*, adhesina de superficie).<sup>148 149</sup>

### Susceptibilidad antimicrobiana

Aunque los casos leves de conjuntivitis son autolimitados, la revisión Cochrane de 2012 concluye que el uso de tratamiento tópico se asocia con una mejora en la tasa de remisión clínica y microbiológica.<sup>11</sup> Además, el uso de tratamiento tópico no solo mejora la pronta resolución de los síntomas sino que también evitará la diseminación del microorganismo.

En la presente serie, entre los **antimicrobianos tópicos** los que **más actividad** presentaron *in vitro* fueron **cloranfenicol**, **ciprofloxacino** y **rifampicina**, con casi la práctica totalidad de las cepas sensibles.

El **cloranfenicol** fue el primer antibiótico de amplio espectro disponible, y la formulación como colirio está disponible desde 1948. Al haberse descrito importantes

efectos secundarios hematológicos asociado al uso de cloranfenicol, hoy en día su utilización por vía sistémica está reservada para el tratamiento de infecciones potencialmente graves sin alternativa antimicrobiana. Sin embargo su uso en forma tópica, principalmente para el tratamiento de las conjuntivitis, ha sido muy extendido por su alta efectividad además de por tratarse de un antibiótico de bajo costo. Pero esta utilización tópica también ha sido controvertida. En 1995, a raíz de los casos de toxicidad hematológica descritos tras la utilización de colirios de cloranfenicol, Donna y Walsh<sup>150 151</sup>, dos médicos irlandeses, publicaron un editorial recomendando la restricción de su uso. Hubo una serie de respuestas críticas en forma de carta a esta editorial alegando que dicha recomendación no estaba suficientemente justificada<sup>152</sup> y el colirio de cloranfenicol se siguió y sigue utilizándose en muchos países. De hecho, en el año 2002, en Inglaterra pasó de ser un antibiótico de prescripción exclusiva médica a ser farmacéutica, es decir, allí se puede adquirir en la farmacia sin receta médica.

Las tasas de resistencia a cloranfenicol descritas en diferentes países para neumococo causante de conjuntivitis fueron muy bajas<sup>119 138 153</sup> y lo mismo sucede entre las cepas causantes de conjuntivitis en Gipuzkoa en donde la resistencia fue casi anecdótica (inferior al 1%).

Existen varias **fluoroquinolonas** comercializadas en forma de colirio y en el presente trabajo se analizó la resistencia a ciprofloxacino cuya actividad sería extrapolable al resto de los antimicrobianos de este grupo. Las fluoroquinolonas se comercializaron en los años ochenta y su uso ha ido en aumento; sin embargo las tasas de resistencia de neumococo a las fluoroquinolonas en España se mantienen bajas.<sup>76</sup> En un estudio nacional y multicéntrico en donde se incluyeron un total de 2.559 aislamientos de neumococo aislados entre los años 2006 y 2007 la tasa de resistencia a ciprofloxacino estuvo por debajo del 3%.<sup>78</sup> En Gipuzkoa la prevalencia global de cepas resistentes causantes de conjuntivitis también fue muy baja, tan solo del 1,5% y sin mostrar cambios a lo largo de periodo de estudio.

El tercer antimicrobiano con formulación en colirio y alta actividad frente a las cepas estudiadas a neumococo fue la **rifampicina**. Menos del 3% del total de cepas fueron

resistentes, pero este antimicrobiano dejó de comercializarse en forma tópica en el año 2005.

### Resistencia global

En esta tesis, en el estudio de la susceptibilidad antibiótica, además de los antimicrobianos con formulación tópica como colirio se incluyeron antimicrobianos de uso sistémico, tanto por su posible utilidad en el tratamiento como por el valor epidemiológico.

Desde el inicio de la era antibiótica *S. pneumoniae* se mantenía sensible a los antimicrobianos y fue a finales de la década de los 70 cuando saltó la alarma tras los brotes causados por neumococos resistentes a penicilina en Sudáfrica.<sup>154 155</sup>

Entre las cepas de neumococo causantes de conjuntivitis en Gipuzkoa, un 30,6% mostraron resistencia a **penicilina oral** ( $\text{CMI} \geq 0,12 \mu\text{g/mL}$ ) y el 4,1% a penicilina con resistencia moderada o alta ( $\text{CMI} \geq 2 \mu\text{g/mL}$ ). Estas tasas de resistencia a penicilina se asemejaron mucho a las obtenidas entre las cepas causantes de otitis también en Gipuzkoa, en un estudio en donde al igual que en la presente serie se incluyeron periodos pre y post-VNC7.<sup>80</sup>

En un estudio multicéntrico europeo (Pneumoworld) en donde se analizaron las tasas de resistencia en neumococos aislados de distintas localizaciones entre los años 2001-2003 en 8 países europeos, fue en Francia junto con España en donde se describieron las tasas resistencia a penicilina oral más altas. En este periodo de tiempo la prevalencia de resistencia a penicilina oral en Gipuzkoa fue menor que la encontrada en otras regiones españolas como Madrid, Valencia y Salamanca.<sup>156</sup>

Además, durante los 15 años que abarcó el presente estudio se observó un descenso de la resistencia a penicilina oral en las cepas causantes de conjuntivitis que fue significativa y muy relacionada con la disminución de los serotipos incluidos en las vacunas conjugadas al igual de lo observado en el estudio multicéntrico español SAUCE (incluía cepas invasivas y respiratorias) en donde participaron numerosos hospitales de distintas partes de la geografía española.<sup>78</sup>

La dinámica de la resistencia a un determinado antimicrobiano es multifactorial y está influenciada por el uso de los antibióticos, la diseminación de determinados clones y por otro lado, en el caso de neumococo, el uso de las vacunas conjugadas ha favorecido la disminución de la resistencia por incluir los serotipos con mayores tasas de resistencia.

Cuando se abordó el diseño de las vacunas conjugadas inicialmente se seleccionaron para su inclusión aquellos serotipos implicados con mayor frecuencia en la enfermedad neumocócica invasiva así como aquellos serotipos que mostraban altas tasas de resistencia.<sup>41 42</sup> En época prevacunal la resistencia a penicilina y la multiresistencia prácticamente se restringía a unos pocos serogrupos (sg6, sg14, sg19 y sg23) que fueron los que se incluyeron en las vacunas conjugadas. No es de extrañar por tanto que en la presente serie los serotipos incluidos en las vacunas conjugadas fueran más resistentes a penicilina oral que los serotipos no vacunales. Lo mismo fue observado entre cepas causantes de conjuntivitis por Buznach *et al.*<sup>119</sup>

Dentro del serotipo 19A, el más prevalente en nuestra serie, existen dos secuenciotipos asociados a resistencia a penicilina y multiresistencia como son ST320 y ST276. Entre los años 2008 y 2010 estos dos genotipos causaron un alto número de episodios de otitis media aguda en Gipuzkoa provocando un repunte de la resistencia a penicilina.<sup>80</sup> Sin embargo, entre las cepas causantes de conjuntivitis, ST320 y ST276 no fueron excesivamente prevalentes, no llegando a un cuarto de todos los serotipos 19A encontrados.

Para uso sistémico, dentro de los beta-lactámicos, cefotaxima sería el más aconsejable ya que más del 98% de las cepas fueron sensibles y debido a su buena farmacocinética y farmacodinamia se conforma como el antimicrobiano de elección para el tratamiento de la enfermedad neumocócica invasiva.<sup>12</sup>

En cuanto a la susceptibilidad a **macrólidos**, **lincosamidas** y **tetracilinas** entre las cepas causantes de conjuntivitis en Gipuzkoa, también hubo un descenso significativo de la resistencia a lo largo del periodo de estudio siendo paralelo a la reducción de cepas con serotipos vacunales. La mayoría de las cepas que fueron resistentes a

eritromicina lo fueron también a clindamicina y a tetraciclina. Este fenotipo de resistencia a macrólidos-lincosamidas-tetraciclinas, también fue el prevalente en otros neumococos como los causantes de otitis media.<sup>80</sup> Fenotipo mayoritariamente mediado por un trasposón donde se incluye el gen *ermB* (fenotipo MLSb).<sup>157</sup>

Los macrólidos no serían una buena opción terapéutica ante la sospecha de una conjuntivitis neumocócica ya que el porcentaje de resistencia es alto y la concentración mínima inhibitoria que presentan las cepas fue elevada. En otros países europeos como Alemania, Austria y la vecina Portugal, el porcentaje de neumococos con resistencia a macrólidos fue menor.<sup>156</sup>

En Gipuzkoa el porcentaje global de cepas resistentes a **tetraciclinas** causantes de conjuntivitis fue de casi del 22%, prevalencia algo menor a la observada entre las cepas causantes de otitis durante ese periodo en Gipuzkoa.<sup>80</sup> Si comparamos la resistencia a tetraciclinas en el global de cepas neumocócicas en Gipuzkoa con lo descrito en otras regiones de Europa, la prevalencia de resistentes fue menor que la registrada en Francia, pero mayor a la detectada en Alemania, Suiza e Italia.<sup>156</sup>

**Cotrimoxazol (trimetoprim-sulfametoxazol) (SXT)** se ha usado extensamente para el tratamiento de las infecciones del tracto respiratorio inferior<sup>71</sup> y existen formulaciones en colirios de trimetoprim en combinación con polimixina para el tratamiento de infecciones oftálmicas. En el presente estudio, la tasa de resistencia de trimetoprim tópico casi alcanzó el 30%, si bien nuestro criterio de resistencia fue muy estricto (CMI  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$ ). Haas *et al*<sup>138</sup> en cepas causantes de conjuntivitis encontró que un 17% de cepas conjuntivales presentaron una CMI a trimetoprim  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$ . A lo largo del estudio la prevalencia de resistencia, tanto de SXT como de trimetoprim tópico, disminuyó significativamente, pero esta disminución no se pudo atribuir al descenso de los serotipos vacunales, ya que éstos presentaron menos resistencia que el resto de neumococos. Como luego referimos, fueron las cepas acapsuladas las que fueron significativamente más resistentes que las cepas capsuladas. La prevalencia de resistencia a SXT obtenida entre las cepas capsuladas fue similar a la obtenida en nuestro medio entre otros neumococos.<sup>80</sup>

### **Neumococos acapsulados y susceptibilidad antibiótica**

Hay que destacar que los neumococos acapsulados presentaron alta prevalencia de resistencia a penicilina oral y SXT, incluso mayor que la de las cepas con serotipos vacunales, la cual estuvo asociada a cepas CC344 y CC941.

Los tres grandes complejos clonales detectados en el presente trabajo mostraron cada uno de ellos un patrón de resistencia característico. Nuestras cepas ST448, al igual que las cepas de este secuenciotipo causantes de los brotes de Minnessota<sup>92</sup> y New Hampshire,<sup>93</sup> se caracterizaron por ser muy sensibles a los antimicrobianos. Como excepciones, dos cepas del presente estudio presentaron resistencia a la rifampicina y las de New Hampshire fueron resistentes a eritromicina.<sup>93</sup> Por otro lado, cepas CC344 se caracterizaron por su alta resistencia: todas fueron resistentes a penicilina oral y mostraron multiresistencia. Esto mismo fue observado por Berrón *et al.*<sup>118</sup> En la presente serie las cepas CC941 mostraron un alto porcentaje de resistencia a penicilina oral y SXT, mientras que las cepas del trabajo de Berrón *et al.*<sup>118</sup> fueron mayoritariamente sensibles.

Chewapreecha *et al.*<sup>158</sup> sugirieron que dado el perfil altamente resistente mostrado por determinados complejos clonales de cepas acapsuladas, estas podrían ser una fuente de resistencia antimicrobiana importante para otros neumococos.

### **Recurrencias**

A lo largo de la infancia es frecuente que el niño sufra diferentes episodios de conjuntivitis, pero apenas existen trabajos que analicen las conjuntivitis neumocócicas recurrentes. Con los datos de la presente serie podemos estimar que la recurrencia causada por *S. pneumoniae*, es poco prevalente entre los niños. El porcentaje de niños que sufrieron más de un episodio de conjuntivitis neumocócica fue del 4%, una prevalencia inferior a la que hallamos en un estudio de otitis media en Gipuzkoa<sup>99</sup> y similar a la obtenida en un estudio de conjuntivitis en Israel<sup>119</sup> aunque en dicho estudio el criterio para definir la recurrencia fue peculiar (tres episodios separados al menos una semana durante el año anterior, independientemente de su etiología).

La observación que consideramos más interesante fue que el padecer conjuntivitis neumocócica en edades muy tempranas de la vida era un factor predisponente para

sufrir recurrencia. Un 5% de los niños cuyo primer episodio se produjo cuando tenían menos de 12 meses de vida presentaron una recurrencia antes de cumplir los 2 años de vida. Esta misma asociación entre recurrencia e inicio temprano de la enfermedad se observó en la otitis media aguda.<sup>99 159</sup> Una posible explicación podría ser que el sistema inmune aún es inmaduro y por tanto existe una predisposición a sufrir una recurrencia. Otra explicación sería anatómica, ya que el sistema de drenaje lagrimal es defectuoso sobre todo en los primeros meses de vida.<sup>160</sup> De hecho, entre los 7 niños con más de un episodio de recurrencia (3 o más episodios), tres presentaron una obstrucción del conducto lagrimal como factor de riesgo.

Las recaídas (mismo serotipo y patrón de PFGE) en las conjuntivitis fue poco frecuente (solo 10 niños sufrieron una recaída), e inferior a las recaídas observadas en otitis media.<sup>99</sup>

Hay que destacar que los episodios de reinfección fueron causados con mayor frecuencia por cepas capsuladas que por acapsuladas. Como se comentó anteriormente, las cepas acapsuladas se agruparon en unos poco complejos clonales por lo que una primoinfección protegería en gran parte para futuras infecciones; sin embargo la variabilidad de cepas capsuladas fue muy amplia.

### **Coinfecciones**

Un tercio de las conjuntivitis incluidas en el presente trabajo fueron coinfecciones siendo *H. influenzae* el microorganismo mayoritario al igual de lo que sucede en la serie de conjuntivitis descrita por Buznach *et al.*<sup>119</sup> El porcentaje de episodios mixtos o coinfecciones fue muy similar al detectado en el trabajo sobre otitis realizado en Gipuzkoa.<sup>99</sup>

Algunos autores han establecido una relación entre los episodios de conjuntivitis y otitis causados por *H. influenzae* o por combinaciones de *H. influenzae* con otro microorganismo denominándolo síndrome de conjuntivitis-otitis.<sup>161</sup> Por otro lado la infección mixta neumococo y *H. influenzae* en estructuras anatómicas cercanas como la otitis media parecen ser más graves que las infecciones simples.<sup>162</sup> Sin embargo en nuestra serie los episodios de conjuntivitis mixtas no se asociaron a otitis y también se resolvieron sin complicaciones.

Otro aspecto analizado fue el comprobar si un determinado serotipo se asociaba más a coinfección tal y como sucedió en el anterior referido estudio de otitis en Israel.<sup>162</sup> Sin embargo en la presente serie, ningún serotipo en particular se asoció a episodios simples o mixtos y las cepas no capsuladas en su conjunto se hallaron significativamente con mayor frecuencia en infecciones simples.

### Otras infecciones oftálmicas

En el presente trabajo se analizaron también los episodios de infecciones oftálmicas neumocócicas distintas a las conjuntivitis que se registraron durante el mismo periodo que el estudio de las conjuntivitis neumocócicas (1999-2013). Globalmente y como era lógico, el número total de episodios fue poco numeroso: 10 endoftalmitis, 8 queratitis y 4 dacriocistitis.

La endoftalmitis infecciosa es una infección grave provocada por la entrada de microorganismos al interior del globo ocular bien por una herida (traumática o quirúrgica) o, menos frecuentemente, por diseminación hematógena. La cirugía de cataratas es el factor que más frecuentemente predispone a una endoftalmitis infecciosa y se estima que su incidencia está entre el 0,015 y el 0,5%.<sup>163</sup> *S. pneumoniae* no es el principal patógeno asociado a endoftalmitis, sin embargo su importancia radica en su virulencia, provocando una clínica grave con un proceso inflamatorio que a menudo deja secuelas irreparables en el ojo que requieren evisceración o pérdida de agudeza visual.<sup>164</sup>

En la presente serie, en 7 de los 10 pacientes con endoftalmitis existió un antecedente de cirugía previa, siendo la de cataratas la más frecuente, y la mitad de ellos sufrieron enucleación. Las cepas acapsuladas no causaron ningún episodios de endoftalmitis, lo que contrasta con el elevado porcentaje de las mismas causando conjuntivitis. En el trabajo realizado por Soriano *et al*,<sup>98</sup> en donde estudiaron 36 casos de endoftalmitis neumocócica no se especificó el serotipo en 12 de los episodios. Los autores indican que 12 cepas fueron ‘no serotipadas’ sin hacer mención a si fueron perdidas antes de poder estudiar el serotipo (lo más probable) o que no serotipificaban.

De cualquier modo, la endoftalmitis requiere capacidad invasiva del microorganismo que lo causa y, que nosotros sepamos, no hay ninguna referencia publicada de casos de endoftalmitis por neumococo acapsulado. La cápsula polisacárida de neumococo es su factor principal de virulencia debido a que previene de la fagocitosis y parece que es el factor determinante para causar una enfermedad invasiva en un individuo inmunocompetente. De hecho, es muy infrecuente que las cepas acapsuladas sean capaces de producir enfermedad neumocócica invasiva.

En un modelo animal realizado en conejos observaron que la presencia de la cápsula era necesaria para la patogénesis de la endoftalmitis neumocócica.<sup>165</sup> Además de la cápsula como factor de virulencia necesario para causar endoftalmitis, en otro modelo animal realizado esta vez en ratas observaron que la neumolisina y la enzima autolisina se asocian con una clínica más agresiva en el curso de la endoftalmitis.<sup>166</sup>

En los casos descritos por Soriano *et al.*,<sup>98</sup> cuatro de los cinco serogrupos que causaron la mayoría de los episodios coincidieron con los detectados en nuestra serie (sg6, sg9, sg19, y sg23). Siete de los 10 episodios de endoftalmitis fueron causados por serotipos incluidos en VNC13, siendo todos ellos serotipos de reconocida virulencia (3, 6B, 9V, 19A y 23F).

El tratamiento empírico (sin etiología conocida) de las endoftalmitis incluye vancomicina para cubrir bacterias Gram positivas.<sup>26</sup> En la presente serie todas las cepas causantes de endoftalmitis fueron sensibles a este antibiótico.

La queratitis infecciosa es una causa importante de morbilidad ocular, siendo los principales factores de riesgo los traumatismos oculares o cirugía, el uso de lentes de contacto y las enfermedades de la superficie ocular. Los microorganismos causantes de queratitis varían según la localización geográfica de los estudios y por ejemplo en países industrializados, por el mayor uso de lentillas, la queratitis está más asociada a *Pseudomonas spp.*, mientras que en un país en vías de desarrollo como la India, neumococo es uno de los principales patógenos.<sup>167 168</sup>

De los 8 episodios, uno de ellos fue causado por una cepa acapsulada y vino precedido por una infección por Virus Herpes Simplex1, lo cual sugiere que se trató de una sobreinfección de una queratitis herpética previa. No obstante, a diferencia de lo que ocurre en las endoftalmitis, un modelo animal mostró que los neumococos acapsulados tenían la misma capacidad de producir queratitis que las cepas capsuladas.<sup>169</sup>

Los serotipos detectados en la queratitis fueron muy variados, al igual que en el trabajo de Mathews *et al.*<sup>170</sup> en donde analizaron 25 episodios de úlceras corneales y ningún serotipo en particular fue prevalente.

Como se comentó anteriormente uno de los principales factores de riesgo para desarrollar queratitis en general es el trauma ocular, pero en el caso de la queratitis neumocócica en particular parece que el factor de riesgo principal es el antecedente de

dacriocistitis crónica.<sup>171 172</sup> En nuestra serie ninguno de los pacientes tenía como factor de riesgo dacricocistitis y por el contrario, tres de ellos tenían como antecedente una intervención quirúrgica unos meses antes.

La dacriocistitis es una inflamación del saco lagrimal normalmente causada por una obstrucción del conducto lagrimal. Esta obstrucción puede ser secundaria a distintas causas, entre ellas la infecciosa, y la dacriocistitis neumocócica se asocia más a la dacriocistitis crónica que a la aguda.<sup>173</sup> En la presente serie, de los cuatro episodios registrados, el único detectado en un adulto evolucionó hacia dacriocistitis crónica. Los otros tres episodios sucedieron en lactantes con buena evolución en todos ellos.



## **6. CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES PRINCIPALES

1. La media anual de episodios de conjuntivitis neumocócica fue de 76, siendo neumococo el responsable de aproximadamente el 13% de las conjuntivitis investigadas. La selección para el estudio fue representativa, ya que constituyó el 68% de la muestra original, con una media de 52 episodios/año.
2. La mayoría de los episodios de infección ocular neumocócica fueron conjuntivitis agudas que aparentemente se resolvieron sin complicaciones, detectándose aproximadamente un 4% de infecciones recurrentes (un tercio recaídas y dos tercios reinfecciones).
3. Algo más de la mitad de los pacientes fueron niños menores de 1 año de edad, representando los adultos tan solo el 3,8% de los pacientes.
4. La mayoría de los episodios se dieron en época fría, contabilizando desde noviembre a febrero el 36,6% de los episodios frente a 17,9% entre julio y octubre.
5. Un tercio de los episodios fueron causados por cepas que no poseían cápsula, un tipo de neumococo que preferentemente se observa en esta localización.
6. La proporción de conjuntivitis causadas por cepas acapsuladas fue similar a lo largo del estudio y como era de esperar, ninguna vacuna tuvo influencia sobre su prevalencia. Se observó un brote epidémico ocasionado por un clon acapsulado (ST941) entre noviembre 2005 y finales de 2006.
7. Las cepas sin cápsula se observaron mayoritariamente en niños con edades comprendidas entre 1 y 6 años. Por el contrario, los niños menores de 1 año y los adultos mayores de 64 años se infectaron mayoritariamente por cepas capsuladas.
8. Las cepas sin cápsula mostraron homogeneidad genética, perteneciendo prácticamente todas ellas a tres complejos clonales, siendo mayoritarias las pertenecientes a los secuenciotipos ST448 y ST941. Por el contrario, las cepas capsuladas mostraron gran heterogeneidad, con 49 serotipos diferentes. Entre los serotipos vacunales destacó el 19A y entre los no vacunales el 15B que causaron el 8% y 5% del total de los episodios, respectivamente.
9. Los episodios ocasionados por cepas de neumococo cuyo serotipo estuvo incluido en una de las dos vacunas conjugadas disminuyeron durante la segunda mitad del periodo de estudio, tanto en números absolutos como en proporción al número de cepas detectadas cada año.

10. Entre los antimicrobianos tópicos los que más actividad presentaron fueron: cloranfenicol, ciprofloxacino y rifampicina. Para uso sistémico, cefotaxima fue el más activo con más del 98% de las cepas sensibles.
11. A lo largo del periodo de estudio la resistencia antimicrobiana fue descendiendo, lo que se asoció a la disminución de las cepas con serotipos vacunales, que fueron las más resistentes dentro de las capsuladas. Las cepas sin cápsula fueron tanto o más resistentes que las capsuladas.
12. El padecer conjuntivitis neumocócica en edades muy tempranas de la vida fue un factor predisponente para sufrir recurrencias. Un 5% de los niños cuyo primer episodio se produjo cuando tenían menos de 12 meses de vida presentaron una recurrencia antes de cumplir los 2 años de vida.
13. Un tercio de las conjuntivitis neumocócicas fueron infecciones mixtas, siendo la asociación *Streptococcus pneumoniae* más *Haemophilus influenzae* la combinación más frecuente.
14. Pese a la elevada prevalencia de cepas acapsuladas causantes de conjuntivitis neumocócica, los procesos graves, como las endoftalmitis, fueron mayoritariamente causadas por cepas capsuladas siendo mala la evolución en más de la mitad de estos pacientes.

## **7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## Bibliografía

1. Schieck, Leydhecker, Sampaolesi. Aparato visual. Bases de la oftalmología. 18 ed. Buenos Aires: Panamericana, 1981:11-20.
2. Sharp SE and Driks MR. Bacterial infections of the eye. In: Borrielo SP, Murray SP, Funke G, editors. Microbiology and Microbial infections. ASM, Hodden Arnold; 2005: 598-604.
3. Arntz Bustos A, Durán de la Colina JA. Anatomía funcional de la superficie ocular. In: Benítez del Castillo Sánchez M, Durán de la Colina JA, Rodríguez Ares MA, editors. Superficie Ocular. Sociedad Española de Oftalmología. Mc Line SL.; 2004. 1-12.
4. Azari AA, Barney NP. Conjunctivitis: a systematic review of diagnosis and treatment. JAMA 2013;**310**(16):1721-29.
5. Horton JC. Trastornos oculares. In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL et al. editors. Harrison. Principios de Medicina Interna. 16 ed. Chile: Mc Graw Hill; 2006: 185-201.
6. Dart JK. Eye disease at a community health centre. Br Med J (Clin Res Ed) 1986;**293**(6560):1477-80.
7. Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Enfermedades Infecciosas Principios y Práctica. 6 ed. Madrid: Elsevier; 2006. 2392-2411.
8. Gigliotti F, Williams WT, Hayden FG, et al. Etiology of acute conjunctivitis in children. J Pediatr 1981;**98**(4):531-36.
9. Weiss A, Brinser JH, Nazar-Stewart V. Acute conjunctivitis in childhood. J Pediatr 1993;**122**(1):10-14.
10. Seal DV, Barrett SP, McGill JI. Aetiology and treatment of acute bacterial infection of the external eye. Br J Ophthalmol 1982;**66**(6):357-60.
11. Sheikh A, Hurwitz B, van Schayck CP, et al. Antibiotics versus placebo for acute bacterial conjunctivitis. Cochrane Database Syst Rev 2012;**9**:CD001211.
12. Gilbert ND, Chambers FH, Eliopoulos MG, et al. *The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy*. 2014. 44 ed.
13. *INFAC*: Información farmacoterapéutica de la comarca. Servicio central de publicaciones del Gobierno Vasco. Problemas oculares en atención primaria, 2009;17 (1).
14. Gower EW, Keay LJ, Oechsler RA, et al. Trends in fungal keratitis in the United States, 2001 to 2007. Ophthalmology 2010;**117**(12):2263-67.
15. Keay LJ, Gower EW, Iovieno A, et al. Clinical and microbiological characteristics of fungal keratitis in the United States, 2001-2007: a multicenter study. Ophthalmology 2011;**118**(5):920-26.
16. Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on Acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. Parasite 2015;**22**:10.
17. Newman H, Gooding C. Viral ocular manifestations: a broad overview. Rev Med Virol 2013;**23**(5):281-94.

18. Sharma S, Kunimoto DY, Gopinathan U, et al. Evaluation of corneal scraping smear examination methods in the diagnosis of bacterial and fungal keratitis: a survey of eight years of laboratory experience. *Cornea* 2002;**21**(7):643-47.
19. Kilian M. *Streptococcus* and *Lactobacillus*. In: Borrielo SP, Murray SP, Funke G, editors. *Microbiology and Microbial infections*. ASM, Hodden Arnold; 2005. 833-867.
20. Duch-Samper AM, Menezo JL, Hurtado-Sarrio M. Endophthalmitis following penetrating eye injuries. *Acta Ophthalmol Scand* 1997;**75**(1):104-06.
21. Fox GM, Joondeph BC, Flynn HW, Jr., et al. Delayed-onset pseudophakic endophthalmitis. *Am J Ophthalmol* 1991;**111**(2):163-73.
22. Vaziri K, Schwartz SG, Kishor K, et al. Endophthalmitis: state of the art. *Clin Ophthalmol*. 2015;**9**(1):95-108.
23. Lohmann CP, Heeb M, Linde HJ, et al. Diagnosis of infectious endophthalmitis after cataract surgery by polymerase chain reaction. *J Cataract Refract Surg* 1998;**24**(6):821-26.
24. Okhravi N, Adamson P, Lightman S. Use of PCR in endophthalmitis. *Ocul Immunol Inflamm* 2000;**8**(3):189-200.
25. Therese KL, Anand AR, Madhavan HN. Polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial endophthalmitis. *Br J Ophthalmol* 1998;**82**(9):1078-82.
26. Guías de práctica clínica de la SERV. Endoftalmitis infecciosa. Sociedad española de retina y vítreo 2011; 3.
27. Schwartz SG, Flynn HW, Jr. Update on the prevention and treatment of endophthalmitis. *Expert Rev Ophthalmol* 2014;**9**(5):425-30.
28. Speaker MG, Menikoff JA. Prophylaxis of endophthalmitis with topical povidone-iodine. *Ophthalmology* 1991;**98**(12):1769-75.
29. Duncan K, Jeng BH. Medical management of blepharitis. *Curr Opin Ophthalmol* 2015;**26**(4):289-94.
30. Huang SS, Johnson KM, Ray GT, et al. Healthcare utilization and cost of pneumococcal disease in the United States. *Vaccine* 2011;**29**(18):3398-412.
31. WHO. "www who int/vaccines/en/pneumococcus" .
32. Robbins JB, Austrian R, Lee CJ, 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.
33. Musher DM. How effective is vaccination in preventing pneumococcal disease? *Infect Dis Clin North Am* 2013;**27**(1):229-41.
34. Spellerberg B, Brandt C. *Streptococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9 ed. Washington DC: ASM; 2007. 412-429.
35. Prado VJ. Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Chil Infec* 2001;**18**:6-9.
36. Nielsen SV, Sorensen UB, Henrichsen J. Antibodies against pneumococcal C-polysaccharide are not protective. *Microb Pathog* 1993;**14**(4):299-305.

37. Sorensen UB, Henrichsen J, Chen HC, et al. Covalent linkage between the capsular polysaccharide and the cell wall peptidoglycan of *Streptococcus pneumoniae* revealed by immunochemical methods. *Microb Pathog* 1990;**8**(5):325-34.
38. Ko KS, Baek JY, Song JH. Capsular gene sequences and genotypes of "serotype 6E" *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol* 2013;**51**(10):3395-99.
39. Calix JJ, Nahm MH. A new pneumococcal serotype, 11E, has a variably inactivated wcjE gene. *J Infect Dis* 2010;**202**(1):29-38.
40. Claverys JP, Prudhomme M, Mortier-Barriere I, et al. Adaptation to the environment: *Streptococcus pneumoniae*, a paradigm for recombination-mediated genetic plasticity? *Mol Microbiol* 2000;**35**(2):251-59.
41. Hausdorff WP, Bryant J, Kloek C, et al. The contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations: implications for conjugate vaccine formulation and use, part II. *Clin Infect Dis* 2000;**30**(1):122-40.
42. Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, et al. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000;**30**(1):100-21.
43. Fenoll A, Jado I, Vicioso D, et al. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain: update (1990 to 1996). *J Clin Microbiol* 1998;**36**(12):3447-54.
44. Rubins JB, Duane PG, Charboneau D, et al. Toxicity of pneumolysin to pulmonary endothelial cells in vitro. *Infect Immun* 1992;**60**(5):1740-46.
45. Mellroth P, Daniels R, Eberhardt A, et al. LytA, major autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, requires access to nascent peptidoglycan. *J Biol Chem* 2012;**287**(14):11018-29.
46. Obaro S, Adegbola R. The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines. *J Med Microbiol* 2002;**51**(2):98-104.
47. Gray BM, Converse GM, III, Dillon HC, Jr. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J Infect Dis* 1980;**142**(6):923-33.
48. Villo SN, Blanco Gonzalez JE, Sevilla RP, et al. *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* serotype B invasive disease. A 12-year retrospective study. *An Pediatr (Barc)* 2004;**61**(2):150-55.
49. Bogaert D, De GR, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 2004;**4**(3):144-54.
50. Mulholland K. Strategies for the control of pneumococcal diseases. *Vaccine* 1999;**17 Suppl 1**:S79-S84.
51. Marimon JM, Monasterio A, Ercibengoa M, et al. Antibody microarray typing, a novel technique for *Streptococcus pneumoniae* serotyping. *J Microbiol Methods* 2010;**80**(3):274-80.
52. Brito DA, Ramirez M, de LH. Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2003;**41**(6):2378-84.
53. Lawrence ER, Griffiths DB, Martin SA, et al. Evaluation of semiautomated multiplex PCR assay for determination of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and serogroups. *J Clin Microbiol* 2003;**41**(2):601-07.

54. Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis* 1993;**17**(2):153-62.
55. Arbeit RD. Laboratory Procedures for the Epidemiologic Analysis of Microorganisms. *Manual of Clinical Microbiology*. 7 ed, 2013:116-37.
56. Lefevre JC, Faucon G, Sicard AM, et al. DNA fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1993;**31**(10):2724-28.
57. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;**33**(9):2233-39.
58. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;**95**(6):3140-45.
59. Spratt BG. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Curr Opin Microbiol* 1999;**2**(3):312-16.
60. MLST. "www. mlst. net" .
61. Aanensen DM, Spratt BG. The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res* 2005;**33**(Web Server issue):W728-W33.
62. Hansman D, Glasgow H, Sturt J, et al. Increased resistance to penicillin of pneumococci isolated from man. *N Engl J Med* 1971;**284**(4):175-77.
63. Klugman KP, Koornhof HJ. Drug resistance patterns and serogroups or serotypes of pneumococcal isolates from cerebrospinal fluid or blood, 1979-1986. *J Infect Dis* 1988;**158**(5):956-64.
64. García Rodríguez JA. *Antimicrobianos en medicina*. 2ed. Barcelona. 2006. Sociedad Española de Quimioterapia.
65. Goffin C, Ghuysen JM. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;**62**(4):1079-93.
66. Hakenbeck R, Balmelle N, Weber B, et al. Mosaic genes and mosaic chromosomes: intra- and interspecies genomic variation of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 2001;**69**(4):2477-86.
67. Grebe T, Hakenbeck R. Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;**40**(4):829-34.
68. Hakenbeck R, Grebe T, Zahner D, et al. beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Mol Microbiol* 1999;**33**(4):673-78.
69. Coffey TJ, Dowson CG, Daniels M, et al. Horizontal spread of an altered penicillin-binding protein 2B gene between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis*. *FEMS Microbiol Lett* 1993;**110**(3):335-39.
70. Linares J, Ardanuy C, Pallares R, et al. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin Microbiol Infect* 2010;**16**(5):402-10.

71. Charpentier E, Tuomanen E. Mechanisms of antibiotic resistance and tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbes Infect* 2000;**2**(15):1855-64.
72. Janoir C, Zeller V, Kitzis MD, et al. High-level fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires mutations in parC and gyrA. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;**40**(12):2760-64.
73. Tankovic J, Perichon B, Duval J, et al. 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.
74. Brenwald NP, Gill MJ, Wise R. Prevalence of a putative efflux mechanism among fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;**42**(8):2032-35.
75. Piddock LJ, Johnson M, Ricci V, et al. Activities of new fluoroquinolones against fluoroquinolone-resistant pathogens of the lower respiratory tract. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;**42**(11):2956-60.
76. De la Campa AG, Balsalobre L, Ardanuy C, et al. Fluoroquinolone resistance in penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clones, Spain. *Emerg Infect Dis* 2004;**10**(10):1751-59.
77. De la Campa AG, Ardanuy C, Balsalobre L, et al. Changes in fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* after 7-valent conjugate vaccination, Spain. *Emerg Infect Dis* 2009;**15**(6):905-11.
78. Perez-Trallero E, Martin-Herrero JE, Mazon A, et al. Antimicrobial resistance among respiratory pathogens in Spain: latest data and changes over 11 years (1996-1997 to 2006-2007). *Antimicrob Agents Chemother* 2010;**54**(7):2953-59.
79. Jenkins SG, Brown SD, Farrell DJ. Trends in antibacterial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA: update from PROTEKT US Years 1-4. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2008;**7**:1.
80. Perez-Trallero E, Marimon JM, Alonso M, et al. Decline and rise of the antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated from middle ear fluid in children: influence of changes in circulating serotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;**56**(7):3989-91.
81. Perez-Trallero E, Marimon JM, Larruskain J, et al. Antimicrobial susceptibilities and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates from elderly patients with pneumonia and acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;**55**(6):2729-34.
82. Bentley SD, Aanensen DM, Mavroidi A, et al. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet* 2006;**2**(3):e31.
83. Yother J. Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. *Annu Rev Microbiol* 2011;**65**:563-81.
84. Llull D, Munoz R, Lopez R, et al. A single gene (tts) located outside the cap locus directs the formation of *Streptococcus pneumoniae* type 37 capsular polysaccharide. Type 37 pneumococci are natural, genetically binary strains. *J Exp Med* 1999;**190**(2):241-51.
85. 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.

86. Hathaway LJ, Stutzmann MP, Battig P, et al. A homologue of aliB is found in the capsule region of nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol 2004;**186**(12):3721-29.
87. Kim JO, Weiser JN. Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis 1998;**177**(2):368-77.
88. Adamou JE, Wizemann TM, Barren P, et al. Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). Infect Immun 1998;**66**(2):820-22.
89. Cundell DR, Weiser JN, Shen J, et al. Relationship between colonial morphology and adherence of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun 1995;**63**(3):757-61.
90. Weiser JN, Austrian R, Sreenivasan PK, et al. Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. Infect Immun 1994;**62**(6):2582-89.
91. Finland M, Barnes MW. Changes in occurrence of capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* at Boston City Hospital during selected years between 1935 and 1974. J Clin Microbiol 1977;**5**(2):154-66.
92. Buck JM, Lexau C, Shapiro M, et al. A community outbreak of conjunctivitis caused by nontypeable *Streptococcus pneumoniae* in Minnesota. Pediatr Infect Dis J 2006;**25**(10):906-11.
93. Martin M, Turco JH, Zegans ME, et al. An outbreak of conjunctivitis due to atypical *Streptococcus pneumoniae*. N Engl J Med 2003;**348**(12):1112-21.
94. Marimon JM, Ercibengoa M, Garcia-Arenzana JM, et al. *Streptococcus pneumoniae* ocular infections, prominent role of unencapsulated isolates in conjunctivitis. Clin Microbiol Infect 2013;**19**(7):E298-E305.
95. Valentino MD, McGuire AM, Rosch JW, et al. Unencapsulated *Streptococcus pneumoniae* from conjunctivitis encode variant traits and belong to a distinct phylogenetic cluster. Nat Commun 2014;**5**:5411.
96. Ercibengoa M, Arostegi N, Marimon JM, et al. Dynamics of pneumococcal nasopharyngeal carriage in healthy children attending a day care center in northern Spain. Influence of detection techniques on the results. BMC Infect Dis 2012;**12**:69.
97. Rose PW, Harnden A, Brueggemann AB, et al. Chloramphenicol treatment for acute infective conjunctivitis in children in primary care: a randomised double-blind placebo-controlled trial. Lancet 2005;**366**(9479):37-43.
98. Soriano F, Perez-Trallero E, Pallares R, et al. *Streptococcus pneumoniae* endophthalmitis: a study of 36 cases with special reference to antibiotic resistance and treatment options. Clin Microbiol Infect 2006;**12**(6):519-26.
99. Alonso M, Marimon JM, Ercibengoa M, et al. Dynamics of *Streptococcus pneumoniae* serotypes causing acute otitis media isolated from children with spontaneous middle-ear drainage over a 12-year period (1999-2010) in a region of northern Spain. PLoS One 2013;**8**(1):e54333.
100. McAvin JC, Reilly PA, Roudabush RM, et al. Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence PCR. J Clin Microbiol 2001;**39**(10):3446-51.
101. Toikka P, Nikkari S, Ruuskanen O, et al. Pneumolysin PCR-based diagnosis of invasive pneumococcal infection in children. J Clin Microbiol 1999;**37**(3):633-37.

102. McDonnell PJ. How do general practitioners manage eye disease in the community? *Br J Ophthalmol* 1988;**72**(10):733-36.
103. Petricek I, Prost M, Popova A. The differential diagnosis of red eye: a survey of medical practitioners from Eastern Europe and the Middle East. *Ophthalmologica* 2006;**220**(4):229-37.
104. Royal College of General Practitioners. Morbidity statistics from general practice 1981-82. London: HMSO;1986.
105. Gómez Ocaña JM, Revilla Pascual E, Fernández-Cuesta MA et al. Las 50 principales consultas en medicina de familia: 2011.
106. Epling J, Smucny J. Bacterial conjunctivitis. *Clin Evid* 2005(14):756-61.
107. Cavuoto K, Zutshi D, Karp CL, et al. Update on bacterial conjunctivitis in South Florida. *Ophthalmology* 2008;**115**(1):51-56.
108. Dowell SF, Whitney CG, Wright C, et al. Seasonal patterns of invasive pneumococcal disease. *Emerg Infect Dis* 2003;**9**(5):573-79.
109. De Neeling AJ, van PW, Hol C, et al. Temporary increase in incidence of invasive infection due to *Streptococcus pneumoniae* in The Netherlands. *Clin Infect Dis* 1999;**29**(6):1579-80.
110. Kim PE, Musher DM, Glezen WP, et al. Association of invasive pneumococcal disease with season, atmospheric conditions, air pollution, and the isolation of respiratory viruses. *Clin Infect Dis* 1996;**22**(1):100-06.
111. Abdullahi O, Nyiro J, Lewa P, et al. The descriptive epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* nasopharyngeal carriage in children and adults in Kilifi district, Kenya. *Pediatr Infect Dis J* 2008;**27**(1):59-64.
112. Yagupsky P, Porat N, Fraser D, et al. Acquisition, carriage, and transmission of pneumococci with decreased antibiotic susceptibility in young children attending a day care facility in southern Israel. *J Infect Dis* 1998;**177**(4):1003-12.
113. Billeter AT, Hellmann J, Roberts H, et al. MicroRNA-155 potentiates the inflammatory response in hypothermia by suppressing IL-10 production. *FASEB J* 2014;**28**(12):5322-36.
114. Shephard RJ, Shek PN. Cold exposure and immune function. *Can J Physiol Pharmacol* 1998;**76**(9):828-36.
115. Weinberger DM, Grant LR, Steiner CA, et al. Seasonal drivers of pneumococcal disease incidence: impact of bacterial carriage and viral activity. *Clin Infect Dis* 2014;**58**(2):188-94.
116. Numminen E, Chewapreecha C, Turner C, et al. Climate induces seasonality in pneumococcal transmission. *Sci Rep* 2015;**5**:11344.
117. Normann EK. Conjunctivitis in children. *Lancet* 2005;**366**(9479):6-7.
118. Berron S, Fenoll A, Ortega M, et al. Analysis of the genetic structure of nontypeable pneumococcal strains isolated from conjunctiva. *J Clin Microbiol* 2005;**43**(4):1694-98.
119. Buznach N, Dagan R, Greenberg D. Clinical and bacterial characteristics of acute bacterial conjunctivitis in children in the antibiotic resistance era. *Pediatr Infect Dis J* 2005;**24**(9):823-28.
120. McElligott M, Vickers I, Cafferkey M, et al. Non-invasive pneumococcal serotypes and antimicrobial susceptibilities in a paediatric hospital in the era of conjugate vaccines. *Vaccine* 2014;**32**(28):3495-500.

121. Perez-Trallero E, Marimon JM, Ercibengoa M, et al. 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):731-38.
122. Eskola J, Kilpi T, Palmu A, et al. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med* 2001;**344**(6):403-09.
123. Ruckinger S, van der Linden M, Reinert RR, et al. Reduction in the incidence of invasive pneumococcal disease after general vaccination with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in Germany. *Vaccine* 2009;**27**(31):4136-41.
124. Weiss S, Falkenhorst G, van der Linden M, et al. Impact of 10- and 13-valent pneumococcal conjugate vaccines on incidence of invasive pneumococcal disease in children aged under 16 years in Germany, 2009 to 2012. *Euro Surveill* 2015;**20**(10):21057.
125. Sa-Leao R, Nunes S, Brito-Avo A, et al. Changes in pneumococcal serotypes and antibiotypes carried by vaccinated and unvaccinated day-care centre attendees in Portugal, a country with widespread use of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Microbiol Infect* 2009;**15**(11):1002-07.
126. 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-e209.
127. Shouval DS, Greenberg D, Givon-Lavi N, et al. Site-specific disease potential of individual *Streptococcus pneumoniae* serotypes in pediatric invasive disease, acute otitis media and acute conjunctivitis. *Pediatr Infect Dis J* 2006;**25**(7):602-07.
128. Invasive pneumococcal disease in children 5 years after conjugate vaccine introduction--eight states, 1998-2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008;**57**(6):144-48.
129. Muñoz-Almagro C, Jordan I, Gene A, et al. 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.
130. Marimon JM, Alonso M, Rolo D, et al. Molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* invasive serotype 19A isolates from adults in two Spanish regions (1994-2009). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;**31**(6):1009-13.
131. Choi EH, Kim SH, Eun BW, et al. *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in children, South Korea. *Emerg Infect Dis* 2008;**14**(2):275-81.
132. Harboe ZB, Benfield TL, Valentiner-Branth P, et al. Temporal trends in invasive pneumococcal disease and pneumococcal serotypes over 7 decades. *Clin Infect Dis* 2010;**50**(3):329-37.
133. Van der Linden M, Falkenhorst G, Perniciaro S, et al. Effects of Infant Pneumococcal Conjugate Vaccination on Serotype Distribution in Invasive Pneumococcal Disease among Children and Adults in Germany. *PLoS One* 2015;**10**(7):e0131494.
134. Gladstone RA, Jefferies JM, Faust SN, et al. Pneumococcal 13-valent conjugate vaccine for the prevention of invasive pneumococcal disease in children and adults. *Expert Rev Vaccines* 2012;**11**(8):889-902.
135. Carvalho MG, Steigerwalt AG, Thompson T, et al. Confirmation of nontypeable *Streptococcus pneumoniae*-like organisms isolated from outbreaks of epidemic conjunctivitis as *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2003;**41**(9):4415-17.

136. Porat N, Greenberg D, Givon-Lavi N, et al. The important role of nontypable *Streptococcus pneumoniae* international clones in acute conjunctivitis. *J Infect Dis* 2006;**194**(5):689-96.
137. Shayegani M, Parsons LM, Gibbons WE, Jr., et al. Characterization of nontypable *Streptococcus pneumoniae*-like organisms isolated from outbreaks of conjunctivitis. *J Clin Microbiol* 1982;**16**(1):8-14.
138. Haas W, Hesje CK, Sanfilippo CM, et al. High proportion of nontypeable *Streptococcus pneumoniae* isolates among sporadic, nonoutbreak cases of bacterial conjunctivitis. *Curr Eye Res* 2011;**36**(12):1078-85.
139. Norcross EW, Tullos NA, Taylor SD, et al. Assessment of *Streptococcus pneumoniae* capsule in conjunctivitis and keratitis in vivo neuraminidase activity increases in nonencapsulated pneumococci following conjunctival infection. *Curr Eye Res* 2010;**35**(9):787-98.
140. Williamson YM, Gowrisankar R, Longo DL, et al. Adherence of nontypeable *Streptococcus pneumoniae* to human conjunctival epithelial cells. *Microb Pathog* 2008;**44**(3):175-85.
141. Esposito S, Principi N. Direct and indirect effects of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine administered to infants and young children. *Future Microbiol* 2015;**10**:1599-607.
142. Grivea IN, Priftis KN, Giotas A, et al. Dynamics of pneumococcal carriage among day-care center attendees during the transition from the 7-valent to the higher-valent pneumococcal conjugate vaccines in Greece. *Vaccine* 2014;**32**(48):6513-20.
143. Steens A, Caugant DA, Aaberge IS, et al. Decreased Carriage and Genetic Shifts in the *Streptococcus pneumoniae* Population After Changing the Seven-valent to the Thirteen-valent Pneumococcal Vaccine in Norway. *Pediatr Infect Dis J* 2015;**34**(8):875-83.
144. Sa-Leao R, Simoes AS, Nunes S, et al. Identification, prevalence and population structure of nontypable *Streptococcus pneumoniae* in carriage samples isolated from preschoolers attending day-care centres. *Microbiology* 2006;**152**(Pt 2):367-76.
145. Barker JH, Musher DM, Silberman R, et al. Genetic relatedness among nontypeable pneumococci implicated in sporadic cases of conjunctivitis. *J Clin Microbiol* 1999;**37**(12):4039-41.
146. Marsh R, Smith-Vaughan H, Hare KM, et al. The nonserotypeable pneumococcus: phenotypic dynamics in the era of anticapsular vaccines. *J Clin Microbiol* 2010;**48**(3):831-35.
147. Turner P, Turner C, Jankhot A, et al. A longitudinal study of *Streptococcus pneumoniae* carriage in a cohort of infants and their mothers on the Thailand-Myanmar border. *PLoS One* 2012;**7**(5):e38271.
148. Keller LE, Jones CV, Thornton JA, et al. PspK of *Streptococcus pneumoniae* increases adherence to epithelial cells and enhances nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* 2013;**81**(1):173-81.
149. Park IH, Kim KH, Andrade AL, et al. Nontypeable pneumococci can be divided into multiple cps types, including one type expressing the novel gene pspK. *MBio* 2012;**3**(3).
150. Doona M, Walsh JB. Use of chloramphenicol as topical eye medication: time to cry halt?. *BMJ* 1995;**310**(6989):1217-18.
151. Doona M, Walsh JB. Topical chloramphenicol is an outmoded treatment. *BMJ* 1998;**316**(7148):1903.
152. Buckley RJ, Kirkness CM, Kanski JJ, et al. Is it time to stop using chloramphenicol on the eye? Safe in patients with no history of blood dyscrasia. *BMJ* 1995;**311**(7002):450.

153. Mantadakis E, Maraki S, Michailidis L, et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive cocci isolated from patients with conjunctivitis and keratitis in Crete, Greece. *J Microbiol Immunol Infect* 2013;**46**(1):41-47.
154. Appelbaum PC, Bhamjee A, Scragg JN, et al. *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. *Lancet* 1977;**2**(8046):995-97.
155. Jacobs MR, Koornhof HJ, Robins-Browne RM, et al. Emergence of multiply resistant pneumococci. *N Engl J Med* 1978;**299**(14):735-40.
156. Reinert RR, Reinert S, van der Linden M, et al. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in eight European countries from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;**49**(7):2903-13.
157. Korona-Glowniak I, Siwiec R, Malm A. Resistance determinants and their association with different transposons in the antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Biomed Res Int* 2015;**2015**:836496.
158. Chewapreecha C, Harris SR, Croucher NJ, et al. Dense genomic sampling identifies highways of pneumococcal recombination. *Nat Genet* 2014;**46**(3):305-09.
159. Pelton SI, Leibovitz E. Recent advances in otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 2009;**28**(10 Suppl):S133-S37.
160. MacEwen CJ, Young JD. Epiphora during the first year of life. *Eye (Lond)* 1991;**5** ( Pt 5):596-600.
161. Bodor FF, Marchant CD, Shurin PA, et al. Bacterial etiology of conjunctivitis-otitis media syndrome. *Pediatrics* 1985;**76**(1):26-28.
162. Dagan R, Leibovitz E, Greenberg D, et al. Mixed pneumococcal-nontypeable *Haemophilus influenzae* otitis media is a distinct clinical entity with unique epidemiologic characteristics and pneumococcal serotype distribution. *J Infect Dis* 2013;**208**(7):1152-60.
163. Barry P, Behrens-Baumann W, Pleyer U et al. Guidelines on prevention, investigation and management of post-operative endophthalmitis. Version 2. ESCRS 2007. www.es CRS.org.
164. Miller JJ, Scott IU, Flynn HW, Jr., et al. Endophthalmitis caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Am J Ophthalmol* 2004;**138**(2):231-36.
165. Sanders ME, Norcross EW, Robertson ZM, et al. The *Streptococcus pneumoniae* capsule is required for full virulence in pneumococcal endophthalmitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;**52**(2):865-72.
166. Ng EW, Costa JR, Samiy N, et al. Contribution of pneumolysin and autolysin to the pathogenesis of experimental pneumococcal endophthalmitis. *Retina* 2002;**22**(5):622-32.
167. Bharathi MJ, Ramakrishnan R, Vasu S, et al. In-vitro efficacy of antibacterials against bacterial isolates from corneal ulcers. *Indian J Ophthalmol* 2002;**50**(2):109-14.
168. Srinivasan M, Gonzales CA, George C, et al. Epidemiology and aetiological diagnosis of corneal ulceration in Madurai, south India. *Br J Ophthalmol* 1997;**81**(11):965-71.
169. Reed JM, O'Callaghan RJ, Girgis DO, et al. Ocular virulence of capsule-deficient *Streptococcus pneumoniae* in a rabbit keratitis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;**46**(2):604-08.
170. Mathews MS, Sivanandan A, Manoharan A, et al. *Streptococcus pneumoniae* from ophthalmic infections: serotype distribution and penicillin susceptibility. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;**36**(2):81-84.

171. Aasuri MK, Reddy MK, Sharma S, et al. Co-occurrence of pneumococcal keratitis and dacryocystitis. *Cornea* 1999;**18**(3):273-76.
172. Parmar P, Salman A, Kalavathy CM, et al. Pneumococcal keratitis: a clinical profile. *Clin Experiment Ophthalmol* 2003;**31**(1):44-47.
173. Bharathi MJ, Ramakrishnan R, Maneksha V, et al. Comparative bacteriology of acute and chronic dacryocystitis. *Eye (Lond)* 2008;**22**(7):953-60.



## **8. ANEXOS**



**Anexo I.****Tabla I y I-bis.** Antisueros polivalentes y factores para la serotipificación de *S. pneumoniae*.

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

<b>Factores</b>	<b>Serotipos</b>	<b>Factores</b>	<b>Serotipos</b>	<b>Factores</b>	<b>Serotipos</b>	<b>Factores</b>	<b>Serotipos</b>
<b>6a</b>	33D	<b>12c</b>	12A, 12B	<b>18c</b>	18F, 18C	<b>32a</b>	32F, 32A
<b>6b</b>	6A,6C	<b>12e</b>	12B	<b>18d</b>	18A	<b>32b</b>	32A
<b>6c</b>	6B	<b>15b</b>	15F, 15B	<b>18e</b>	18F, 18B, 18C	<b>33b</b>	33F, 33A
<b>6d</b>	6C,6D	<b>15c</b>	15F, 15A	<b>18f</b>	18F	<b>33e</b>	33F, 33A, 33C
<b>7b</b>	7F, 7A	<b>15e</b>	15B, 15C	<b>19b</b>	19F	<b>33f</b>	33B, 33C, 33D
<b>7c</b>	7A	<b>15h</b>	15B	<b>19c</b>	19A	<b>35a</b>	35F, 35A, 35B, 35C
<b>7e</b>	7B	<b>16b</b>	16F	<b>19f</b>	19C	<b>35b</b>	35F
<b>7f</b>	7C	<b>16c</b>	16A	<b>20b</b>	33A	<b>35c</b>	35A, 35B, 35C
<b>7h</b>	19B, 19C	<b>17b</b>	17F	<b>22b</b>	22F	<b>41a</b>	41F, 41A
<b>9b</b>	9L, 9N	<b>17c</b>	17A	<b>22c</b>	22A	<b>41b</b>	41F
<b>9d</b>	9A, 9V	<b>18c</b>	18F, 18C	<b>23b</b>	23F	<b>42a</b>	35C
<b>9e</b>	9N	<b>18d</b>	18A	<b>23c</b>	23A	<b>43b</b>	47A
<b>9g</b>	9V	<b>12e</b>	12B	<b>23d</b>	23B	<b>42a</b>	35C
<b>10b</b>	10F, 10B, 10C	<b>15b</b>	15F, 15B	<b>24c</b>	24A	<b>43b</b>	47A
<b>10d</b>	10A, 10B	<b>15c</b>	15F, 15A	<b>24d</b>	24F, 24A		
<b>10f</b>	10C	<b>15e</b>	15B, 15C	<b>24e</b>	24B		
<b>11b</b>	11F, 11B, 11C, 11D	<b>15h</b>	15B	<b>25b</b>	25F		
<b>11c</b>	11A, 11C, 11D	<b>16b</b>	16F	<b>25c</b>	25A		
<b>11f</b>	11B, 11C	<b>16c</b>	16A	<b>28b</b>	28F		
<b>11g</b>	11F, 11B	<b>17b</b>	17F	<b>28c</b>	28A		
<b>12b</b>	12F, 12B	<b>17c</b>	17A	<b>29b</b>	35B		

**Tabla II.** Serogrupos y serotipos incluidos en el Pneumoarray ®.

<b>Nivel de tipo</b>	1, 2, 3, 4, 5, 8, 13, 14, 20, 21, 27, 31, 34, 36, 38, 39
<b>Nivel de grupo</b>	24, 25, 28, 32, 29/35, 41 y 47
<b>Nivel de grupo parcial</b>	7B/C o 7C/40, 9 A/V, 10B/C/F, 11C/D/F, 15B/C/F, 18A/B, 19B/C y 33B/C/D
<b>Nivel de factor</b>	6A, 6B, 7A, 7F, 9N, 9L, 10A, 11A, 11B, 12A, 12B, 12F, 15A, 16A, 16F, 17A, 17F, 18C, 18F, 19A, 19F, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 33A, 33F

**Tabla III.** Primers y enzimas de restricción.

<b>Función</b>	<b>Diana</b>	<b>Amplicón</b>	<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
<b>Serotificado Multiplex-PCR-1</b>				
	Autolisina	100 bp	<i>lyt A</i> -Forward	acgcaatctagcagatgaagc
			<i>lyt A</i> -Reverse	tgtttggtggtattcgtgc
	Sg 10	512 bp	Cap-10-Forward	ctgacaattcatcctattccc
			Cap-10-Rervese	gatagtcccatataatcctcc
	St 14	268 bp	14-cpsH-Forward	gtctgtttattctatatacaaaaggctcc
			14-cpsH-Rervese	gcattgctacaatcgtatactagatatgc
	St 18F/A/B/C	354 bp	18C-wciY-Forward	gcactgtfacaggtgctaattggattgaag
			18-Cgct-Rervese	ctttaacatctgactttttctgtccaac
	St 4	430 bp	4- wzy-Forward	ctgttactgttctggactctcgttaattgg
			4- wzy-Rervese	gcccactcctgtaaaaactaccgccattg
	St 11F/A/B/C/D	568 bp	Cap-11-Forward	taagctgattcgttagttcc
			Cap-11-Rervese	ctacaacaatgagataatcctcc
	St 9A/V	591 bp	9V-cpsI-Forward	aagtcagacagtgaatcttaac
			9V-cpsI-Rervese	aaatacgaatcgtactgccc
	St 3	818 bp	3-capB-Forward	ttgtttttgtctttattcgttg
			3-capB-Rervese	tactgagaacctctgcccacttagttgc
<b>Serotificado Multiplex-PCR-2</b>				
	St 1	99 bp	1 wyz-Forward	ggagactactaaattgtaactaacacagc g
			1 wyz-Rervese	caaggatgaataaagtaaacatataatctc
	St 7A/F	177 bp	Cps-AC7-Forward	ttgcgacaattgttggcgag
			Cps-AC7-Rervese	cccacccttattcaaccaag
	St 8	236 bp	Cap-8-Forward	ttcacgcagactagaacag
			Cap-8-Rervese	tactgagaaccttctgcccacttagttgc
	St 5	344 bp	Cap-5-Forward	tcctgttgggagtagtgc
			Cap-5-Rervese	gccgctgaattcttagctc
	St 19F	408 bp	19F-cpsI-Forward	cacctaatttaataactgaggttaagattgc
			19F-cpsI-Rervese	cataggctatcagaatttaataatattctgc
	St 19A	478 bp	19A-cpsK-Forward	gttagtctgttttagatttttgggtgagt
			19A-cpsK-Rervese	gagcagtaataagatgagacgatagttag
	St 23A	688 bp	Cps-23A-Forward	tctagcaagtgaacgaagatg
			Cps-23A-Rervese	ctgagtacaaaagaagcgag
	St 33F/A/37	589 bp	Cap-33AF-Forward	cgtatggctacttttagctcc
			Cap-33AF-Rervese	catcctttgtcgaagccaac
	St 22F/A	755 bp	Cap-22AF-Forward	cagatttctttctcactgg
			Cap-22AF-Rervese	caaaaggcaccatataagaagg

<b>Serotificado Multiplex-PCR-3</b>				
	St 12F/44	138 bp	Cap-12A-Forward	acatctttggacgaactgcc
			Cap-12A-Reverse	ggtaagacatcattcgcacc
	St 6A/B	220 bp	6B wzy-Forward	gacgtaacaagaactaggtgctgaaac
			6B wzy-Reverse	aagtataataaccacgctgtaaaactctgac
	St 11F/A/C/D	262 bp	C11FACD-Forward	ccctttagcttgagggatag
			C11FACD-Reverse	gccattgatgatgcttctgg
	St 9N/L	326 bp	Cap-9LN-Forward	agataactgtctcgaactgg
			Cap-9LN-Reverse	ttagcctttcaccaagatg
	St 23F	384 bp	23F cpsG-Forward	gtaacagttgctgtagagggaattggctttc
			23F cpsG-Reverse	cacaacacctaacacacgatggctatatgattc
	St 15B/C	456 bp	Cap-15BC-Forward	agcttattaggtgggacgg
			Cap-15BC-Reverse	gttctgattcctgctccaag
	St 23B	512 bp	Cps-23B-Forward	tgcatatggattaatgggtg
			Cps-23B-Reverse	tatcataacacttagcaacgg
	St 17F	587 bp	Cps-17F-Forward	gctgtttacaggctttgtatc
			Cps-17F-Reverse	gaacatcatcattccgtaacc
	St 2	669 bp	Cap-2-Forward	acaggaaatggtgttactcc
			Cap-2-Reverse	tataggcagagagagactac
	St 20	874 bp	Cap-20-Forward	ataccggctgtattagctgg
			Cap-20-Reverse	gattgtgtggtacggtagtg
<b>Serotificado Multiplex-PCR-4</b>				
	St 35A/B/C/42	136 bp	Cap-35A/B/C/42-Forward	ttatgtacatggagagagtgg
			Cap-35A/B/C/42-Reverse	tctggcagtgataacctttg
	St 35F/47F	228 bp	Cap-35F/47F-Forward	ggagggtgagtactcttaac
			Cap-35F/47F-Reverse	agatgggaatagtgcgtagc
	St 36	297 bp	Cap-36-Forward	tccggatctattcaatttccc
			Cap-36-Reverse	cagtacaagagggtataacacc
	St 7B/7C/40	354 bp	Cap- 7B/7C/40-Forward	tttgccggatatttagcgg
			Cap-7B/7C/40-Reverse	atgaatcacttctctactctg
	St 21	401 bp	Cps-GT21-Forward	gaatgacctgtatggaaag
			Cps-GT21-Reverse	tttgggtaaacctcctctg
	St 27	453 bp	Cap-27-Forward	ttgttcttccatacttctgg
			Cap-27-Reverse	agtaacacaagggaaggatagg
	St 16A	502 bp	Cap-16A-Forward	ttatgataatggaacgcctc
			Cap -16A-Reverse	gtcagccaataagtcatatac
	St 28F/A	564 bp	Cap-28F/A-Forward	ggtcgaggttctctatatacc
			Cap-28F/A-Reverse	agtatgaccccactaacacc
	St 13	658 bp	Cps-13-Forward	gaaaatacगतatgctctagg
			Cps-13-Reverse	atcgctggattatacactatg
	St 25F/A/38	610 bp	Cap-25F/A/38-Forward	acacaatgtcttattgcagcc
			Cap-25F/A/38-Reverse	gagtgggaaaaactaaaccc
	St 31	711 bp	Cap-31-Forward	gacaaccttgcggttttac
			Cap-31-Reverse	aaatatcgaacactcgc
	St 16F	778 bp	Cap-16F-Forward	cccaataattgttatgggagg
			Cap-16F-Reverse	tagagtgcagagaacaattggg
<b>Multiplex: Autolisina+Cápsula+Neumolisina</b>				
	Autolisina- <i>lytA</i>	100pb	<i>lyt A</i> -Forward	acgcaatctagcagatgaagc
			<i>lyt A</i> -Reverse	tgtttgggtggtattcgtgc
	Cápsula- <i>CpsA</i>	160pb	<i>cpsA</i> -Forward	gcagtacagcagttgttgactgacc
			<i>cpsA</i> -Reverse	gaatatttcattatcagcccagtc
	Neumolisina- <i>ply</i>	208pb	<i>ply</i> -Forward	cccacttcttctgcggttga
			<i>ply</i> -Reverse	tgagccgttatttttcatactg

<b>MLST</b>			
	<i>aroE</i> (shikimate dehydrogenase)	<i>aroE</i> -Forward	gcctttgaggcgacg
		<i>aroE</i> -Reverse	tgc agt tca (g/a)aaaca t(a/t)t tct aa
	<i>gdh</i> (glucose-6-phosphate dehydrogenase)	<i>gdh</i> -Forward	atg gac aaa cca gc(g/a/t/c)ag(c/t)ta
		<i>gdh</i> -Reverse	gct tga ggtcccat(g/a)ct(g/a/t/c)cc
	<i>gki</i> (glucose kinase)	<i>gki</i> -Forward	ggcattggaatg ggatccc
		<i>gki</i> -Reverse	tctcccgcagctgcac
	<i>recP</i> (transketolase)	<i>recP</i> -Forward	gccaactcaggtcatcca gg
		<i>recP</i> -Reverse	tgcaaccgtagcatgtaac
	<i>spi</i> (signal peptidase I)	<i>spi</i> -Forward	ttattcctctgattctg tc
		<i>spi</i> -Reverse	gtgatt ggccagaag cgga
	<i>xpt</i> (xanthine phosphoribosyltransferase)	<i>xpt</i> -Forward	ttattagagagcgcacatct
		<i>xpt</i> -Reverse	agatcgctccttaataac
	<i>ddl</i> (D-alanine-D-alanine ligase)	<i>ddl</i> -Forward	tgc(c/t)caagttccttatgtgg
		<i>ddl</i> -Reverse	cac tgggt(g/a)aaacc(a/t) ggcat
<b>Primers alternativos CDC para MLST</b>			
	<i>aroE</i> (shikimate dehydrogenase)	<i>aroE</i> -Forward	tcctattaagcattctatttcccttc
		<i>aroE</i> -Reverse	acaggagaggattggccatccatgccac actg
	<i>recP</i> (transketolase)	<i>recP</i> -Forward	gaatgtgtgattcaataacacctcaataga agg
		<i>recP</i> -Reverse	tgctgttcgatagcagcatggatggcttc
	<i>spi</i> (signal peptidase I)	<i>spi</i> -Forward	cgcttagaaagtgtaattgaattt
		<i>spi</i> -Reverse	gaagaggctgagattggtgattctcgcc
	<i>xpt</i> (xanthine phosphoribosyltransferase)	<i>xpt</i> -Forward	ttaacttttagactttaggaggtctatg
		<i>xpt</i> -Reverse	cggtgcttgcgagtgtttcttgag
	<i>ddl</i> (D-alanine-D-alanine ligase)	<i>ddl</i> -Forward	taaaatcagcactaagcgtgttctgg
		<i>ddl</i> -Reverse	aagtagtgggtacatagaccactggg
<b>Enzima de restricción PFGE</b>			
	<i>SmaI</i>	CCC <sup>^</sup> GGG Temperatura de incubación 25°C New England Biolabs. Ref. R011S.	

**Anexo II. Tabla I y I-bis. Serotipos encontrados por trienios y por cada año de estudio.**

Serotipo	1999-2001 (n=63)	2002-2004 (n=117)	2005-2007 (n=246)	2008-2010 (n=190)	2011-2013 (n=161)	1999-2013 (n=777)	p
<b>6B</b>	2 (3,2%)	9 (7,7%)	6 (2,4%)	0	1 (0,6%)	<b>18 (2,3%)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>9V</b>	3 (4,8%)	0	5 (2%)	1 (0,5%)	3 (1,9%)	<b>12 (1,5%)</b>	
<b>14</b>	3 (4,8%)	1 (0,9%)	5 (2%)	1 (0,5%)	1 (0,6%)	<b>11 (1,4%)</b>	
<b>18C</b>	0	0	2 (0,8%)	0	1 (0,6%)	<b>3 (0,4%)</b>	
<b>19F</b>	10 (15,9%)	7 (6%)	5 (2%)	3 (1,6%)	1 (0,6%)	<b>26 (3,3%)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>23F</b>	4 (6,3%)	6 (5,1%)	10 (4,1%)	1 (0,5%)	0	<b>21 (2,7%)</b>	<b>&lt;0,05</b>
<b>VNC7</b>	<b>22 (34,9%)</b>	<b>23 (19,7%)</b>	<b>33 (13,4%)</b>	<b>6 (3,2%)</b>	<b>7 (4,3%)</b>	<b>91 (11,7%)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>1</b>	0	1 (0,9%)	4 (1,6%)	2 (1,1%)	0	<b>7 (0,9%)</b>	
<b>3</b>	1 (1,6%)	2 (1,7%)	4 (1,6%)	4 (2,1%)	3 (1,9%)	<b>14 (1,8%)</b>	
<b>6A</b>	5 (7,9%)	9 (7,7%)	8 (3,3%)	7 (3,7%)	5 (3,1%)	<b>34 (4,4%)</b>	
<b>7F</b>	1 (1,6%)	0	4 (1,6%)	2 (1,1%)	3 (1,9%)	<b>10 (1,3%)</b>	
<b>19A</b>	3 (4,8%)	7 (6%)	24 (9,8%)	21 (11,1%)	9 (5,6%)	<b>64 (8,2%)</b>	
<b>VNC13</b>	<b>32 (50,8%)</b>	<b>42 (35,9%)</b>	<b>77 (31,3%)</b>	<b>42 (22,1%)</b>	<b>27 (16,8%)</b>	<b>220 (28,3%)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>6C</b>	0	3 (2,6%)	7 (2,8%)	5 (2,6%)	3 (1,9%)	<b>18 (2,3%)</b>	
<b>7A</b>	0	0	0	1 (0,5%)	0	<b>1 (0,1%)</b>	
<b>7B/C</b>	0	1 (0,9%)	0	0	2 (1,2%)	<b>3 (0,4%)</b>	
<b>8</b>	0	2 (1,7%)	2 (0,8%)	1 (0,5%)	0	<b>5 (0,6%)</b>	
<b>9L</b>	1 (1,6%)	0	0	0	0	<b>1 (0,1%)</b>	
<b>9N</b>	1 (1,6%)	1 (0,9%)	1 (0,4%)	2 (1,1%)	2 (1,2%)	<b>7 (0,9%)</b>	
<b>10F</b>	0	0	0	0	1 (0,6%)	<b>1 (0,1%)</b>	
<b>10A</b>	0	3 (2,6%)	4 (1,6%)	4 (2,1%)	5 (3,1%)	<b>16 (2,1%)</b>	
<b>11A</b>	1 (1,6%)	2 (1,7%)	6 (2,4%)	0	2 (1,2%)	<b>11 (1,4%)</b>	
<b>11B/C</b>	0	1 (0,9%)	0	0	2 (1,2%)	<b>3 (0,4%)</b>	
<b>11F/D</b>	1 (1,6%)	2 (1,7%)	6 (2,4%)	6 (3,2%)	14 (8,7%)	<b>29 (3,7%)</b>	<b>&lt;0,05</b>
<b>12A</b>	0	0	0	0	1 (0,6%)	<b>1 (0,1%)</b>	
<b>15A</b>	1 (1,6%)	0	3 (1,2%)	5 (2,6%)	2 (1,2%)	<b>11 (1,4%)</b>	
<b>15B</b>	0	4 (3,4%)	8 (3,3%)	17 (8,9%)	6 (3,7%)	<b>35 (4,5%)</b>	
<b>15C</b>	1 (1,6%)	0	0	1 (0,5%)	1 (0,6%)	<b>3 (0,4%)</b>	
<b>16A</b>	0	0	0	0	1 (0,6%)	<b>1 (0,1%)</b>	
<b>16F</b>	0	2 (1,7%)	3 (1,2%)	3 (1,6%)	6 (3,7%)	<b>14 (1,8%)</b>	
<b>17F</b>	0	0	2 (0,8%)	4 (2,1%)	1 (0,6%)	<b>7 (0,9%)</b>	
<b>20</b>	0	0	2 (0,8%)	1 (0,5%)	10 (6,2%)	<b>13 (1,7%)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>21</b>	0	3 (2,6%)	7 (2,8%)	4 (2,1%)	4 (2,5%)	<b>18 (2,3%)</b>	
<b>22F</b>	1 (1,6%)	1 (0,9%)	3 (1,2%)	2 (1,1%)	2 (1,2%)	<b>9 (1,2%)</b>	
<b>23A</b>	1 (1,6%)	3 (2,6%)	5 (2%)	1 (0,5%)	3 (1,9%)	<b>13 (1,7%)</b>	
<b>23B</b>	0	1 (0,9%)	3 (1,2%)	12 (6,3%)	9 (5,6%)	<b>25 (3,2%)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>24B</b>	0	1 (0,9%)	2 (0,8%)	1 (0,5%)	2 (1,2%)	<b>6 (0,8%)</b>	
<b>27</b>	0	0	3 (1,2%)	0	0	<b>3 (0,4%)</b>	
<b>29</b>	0	0	1 (0,4%)	2 (1,1%)	1 (0,6%)	<b>4 (0,5%)</b>	
<b>31</b>	0	0	0	5 (2,6%)	0	<b>5 (0,6%)</b>	
<b>32F</b>	0	0	0	1 (0,5%)	0	<b>1 (0,1%)</b>	
<b>33F</b>	1 (1,6%)	0	1 (0,4%)	3 (1,6%)	4 (2,5%)	<b>9 (1,2%)</b>	
<b>34</b>	0	1 (0,9%)	0	0	0	<b>1 (0,1%)</b>	
<b>35A</b>	0	1 (0,9%)	0	0	1 (0,6%)	<b>2 (0,3%)</b>	
<b>35B</b>	1 (1,6%)	1 (0,9%)	2 (0,8%)	2 (1,1%)	1 (0,6%)	<b>7 (0,9%)</b>	
<b>35F</b>	1 (1,6%)	2 (1,7%)	4 (1,6%)	1 (0,5%)	1 (0,6%)	<b>9 (1,2%)</b>	
<b>36</b>	0	2 (1,7%)	0	0	0	<b>2 (0,3%)</b>	
<b>37</b>	0	0	2 (0,8%)	0	1 (0,6%)	<b>3 (0,4%)</b>	
<b>38</b>	0	0	0	0	1 (0,6%)	<b>1 (0,1%)</b>	
<b>39</b>	0	0	1 (0,4%)	1 (0,5%)	0	<b>2 (0,3%)</b>	
<b>40</b>	0	0	1 (0,4%)	0	0	<b>1 (0,1%)</b>	
<b>No VNC13</b>	<b>11 (17,5%)</b>	<b>37 (31,6%)</b>	<b>79 (32,1%)</b>	<b>85 (44,7%)</b>	<b>89 (55,3%)</b>	<b>301 (38,7%)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Acapsulada</b>	<b>20 (31,7%)</b>	<b>38 (32,5%)</b>	<b>90 (36,6%)</b>	<b>63 (33,2%)</b>	<b>45 (28%)</b>	<b>256 (32,9%)</b>	

## Anexos

Serotipo	1999 (n=14)	2000 (n=22)	2001 (n=27)	2002 (n=15)	2003 (n=37)	2004 (n=65)	2005 (n=69)	2006 (n=108)	2007 (n=69)	2008 (n=60)	2009 (n=75)	2010 (n=55)	2011 (n=65)	2012 (n=45)	2013 (n=51)	1999-2013 (n=777)
1	0	0	0	0	0	1	1	0	3	2	0	0	0	0	0	7
3	0	0	1	1	1	0	0	2	2	2	1	1	1	1	1	14
6A	2	1	2	1	3	5	0	4	4	2	2	3	2	2	1	34
6B	2	0	0	4	3	2	3	2	1	0	0	0	0	0	1	18
6C	0	0	0	1	0	2	1	5	1	1	3	1	1	1	1	18
7A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
7B/C	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	3
7F	0	1	0	0	0	0	2	2	0	0	2	0	1	1	1	10
8	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	1	0	0	0	0	5
9L	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
9N	0	1	0	0	1	0	0	0	1	2	0	0	0	1	1	7
9V	1	1	1	0	0	0	0	5	0	0	1	0	1	0	2	12
10F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
10A	0	0	0	0	1	2	1	2	1	2	0	2	3	1	1	16
11A	0	0	1	1	0	1	5	0	1	0	0	0	0	1	1	11
11B/C	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3
11F/D	0	0	1	0	0	2	2	1	3	2	2	2	4	6	4	29
12A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
14	2	0	1	0	0	1	1	1	3	0	0	1	1	0	0	11
15A	1	0	0	0	0	0	0	1	2	4	1	0	0	2	0	11
15B	0	0	0	0	3	1	3	2	3	5	6	6	0	3	3	35
15C	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	3
16A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
16F	0	0	0	1	0	1	2	0	1	0	2	1	3	1	2	14
17F	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	1	1	0	0	7
18C	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	3
19F	1	4	5	1	0	6	3	2	0	2	1	0	0	0	1	26
19A	1	0	2	0	4	3	8	8	8	8	8	5	4	3	2	64
20	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	4	5	1	13
21	0	0	0	0	1	2	0	6	1	3	1	0	1	2	1	18
22F	0	0	1	0	0	1	1	0	2	1	1	0	2	0	0	9
23A	0	1	0	1	1	1	1	1	3	0	1	0	2	1	0	13
23B	0	0	0	0	1	0	1	0	2	5	4	3	3	1	5	25
23F	0	1	3	0	4	2	2	7	1	1	0	0	0	0	0	21
24B	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	2	0	0	6
27	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3
29	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	1	0	4
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	0	0	0	5
32F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
33F	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	3	0	1	9
34	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
35A	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
35B	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	7
35F	0	1	0	0	1	1	2	1	1	1	0	0	0	0	1	9
36	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
37	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	3
38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
39	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2
40	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Acapsu- lada	4	9	7	3	12	23	26	48	16	24	14	25	21	6	18	256

