

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II



TESIS DOCTORAL

Estructura poblacional de *Streptococcus pneumoniae* con resistencia a los macrólidos asociada a bombas de eflujo (genes *mef*) y mecanismos duales [genes *mef* y *erm(B)*]

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Elia Gómez García de la Pedrosa

Directores

Rafael Cantón Moreno
Fernando Baquero Mochales

Madrid, 2013



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología II

Estructura poblacional de *Streptococcus pneumoniae* con resistencia a los macrólidos asociada a bombas de eflujo (genes *mef*) y mecanismos duales [genes *mef* y *erm*(B)]

Memoria presentada por Dña. María Elia Gómez García de la Pedrosa para optar al grado de Doctor en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología II

Director: Dr. Rafael Cantón Moreno
Jefe de Servicio. Servicio de Microbiología
Hospital Universitario Ramón y Cajal
Prof. Asociado, Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología II

Director: Dr. Fernando Baquero Mochales
Servicio de Microbiología
Director Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria
Hospital Universitario Ramón y Cajal

Dr. RAFAEL CANTÓN MORENO, Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal y Profesor Asociado del Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y

Dr. FERNANDO BAQUERO MOCHALES, Servicio de Microbiología, Director del Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria

INFORMAN:

Que la Memoria presentada por Dña. María Elia Gómez García de la Pedrosa, con el título “Estructura poblacional de *Streptococcus pneumoniae* con resistencia a los macrólidos asociada a bombas de eflujo (genes *mef*) y mecanismos duales [genes *mef* y *erm*(B)]” ha sido realizada en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal bajo nuestra dirección, reuniendo a nuestro juicio los requisitos necesarios para la obtención del grado de Doctor.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente informe en Madrid, a 24 de septiembre de 2012.

Fdo. Dr. Rafael Cantón Moreno

Fdo. Dr. Fernando Baquero Mochales

A Chema

A mis padres y a mi hermana María

A todos los que habéis hecho esto posible



*“Se necesitan hombres para viaje peligroso.
Salarios bajos, frío extremo,
meses de completa oscuridad,
peligro constante, retorno ileso dudoso.
Honores y reconocimiento en caso de éxito”*

E. Shackleton
Anuncio en el NY Times, 1913

Agradecimientos

*“Si yo pudiera enumerar cuánto debo a
mis grandes antecesores y contemporáneos,
no me quedaría mucho en propiedad”*

Goethe

El esfuerzo realizado y el resultado conseguido con este trabajo no habría sido posible sin el apoyo de todos los que me han acompañado en una de las “ascensiones de montaña” más emocionantes que he vivido al llevar a cabo la finalización de mi Tesis Doctoral. Como en toda aventura, he pasado junto a vosotros por fases de entusiasmo inicial junto con la necesidad de adquirir los conocimientos técnicos que la “ascensión” ha requerido, incertidumbre al enfrentarse a las dificultades de la ruta y gran satisfacción al finalizar. No quiero cerrar este capítulo de mi trayectoria personal y profesional sin agradeceros la ayuda, el seguimiento, la comprensión, la compañía...¡hemos hecho cima!

A mi director de Tesis, el Dr. Rafael Cantón, por la aportación científica aportada a esta Tesis, por su dedicación, generosidad y apoyo constante. Entre las muchas cosas que me has enseñado, está no perder el entusiasmo por los proyectos, aún en los momentos más duros. Gracias.

A mi director de Tesis, el Dr. Fernando Baquero, por los conocimientos científicos, los enfoques novedosos y creativos aportados y el apoyo mostrado a esta Tesis. Eres un estímulo constante en mi carrera científica. Gracias.

A la Dra. Marisa Morosini por ayudarme en los inicios de esta aventura nada más llegar al mundo de la Ciencia. El estímulo inicial fue fundamental para iniciar este trabajo.

A la Dra. Rosa del Campo por contribuir con tu conocimiento y tu dedicación a que aprendiera, además de varias técnicas, a disfrutar y entusiasmarme con todas las actividades realizadas, incluido el propio aprendizaje.

Al Dr. Juan Carlos Galán por su aportación y ayuda para realizar este trabajo.

A la Dra. Teresa Coque por todos los conocimientos aportados a esta Tesis. Gracias por acogernos al neumococo y a mi en el laberinto de las ICEs.

Al Dr. Reinert por darme la oportunidad de realizar parte de este trabajo en el Centro Nacional de Estreptococos en Aquisgrán, Alemania.

A los Dres. Mark van der Linden e Irene Seegmüller por acompañarme en el periodo alemán de esta “ascensión”.

A la Dra. Elena Loza por facilitar la metodología de trabajo y por animarme, quizá sin saberlo, en momentos importantes.

A los Dres. M^a Antonia Meseguer y Enrique Gómez Mampaso por ser un ejemplo de entusiasmo y motivación para todos los que trabajamos con vosotros.

Al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal por la calidad de la formación como Microbióloga Clínica que allí he recibido, además de por las oportunidades ofrecidas y el enriquecimiento personal adquirido.

A todos los compañeros “de siempre” del Laboratorio de Investigación: Arancha, María, Carmen, Ángela, Tania, Ana Sofía, Aída, Manu... por los momentos vividos en las muchas horas que hemos pasado en el laboratorio.

A mis compañeros de residencia por las horas compartidas y las experiencias vividas.

A Ana Fernández y a Ana Moreno, por acompañarme y asesorarme en la aventura.

A mis amigas Patricia y Marta por el apoyo que me habéis prestado y por la paciencia en los momentos difíciles durante todos estos años.

A mis amigos “de toda la vida” porque habéis estado ahí, acompañando y animando durante toda la aventura.

A Pepe y a Mercedes; a Adolfo, Mercedes y Carmen, porque también habéis formado parte de esta “ascensión”.

A mis abuelos José y Pilar por su interés en la evolución de este proyecto.

A la abuela Isabel y a Lourdes por enseñarme a afrontar las dificultades.

A mi hermana María, por transmitirme siempre optimismo y alegría. Has sido un apoyo fundamental durante todo este tiempo.

A mis padres por el cariño, comprensión y apoyo durante todos estos años y por ser ejemplo de superación personal en los momentos difíciles.

Y por supuesto a Chema, por tu contribución a esta aventura tanto en aportaciones científicas como personales. Eres mi compañero de cordada, sin tu ánimo y apoyo incondicional esta ascensión no hubiera sido posible.

Y a todos los que, intencionadamente o sin saberlo, habéis contribuido a la realización y finalización de este proyecto.

¡Gracias!

Índice general

1. Introducción	3
1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> . Perspectiva histórica	3
1.1.1. Descripción e identificación	3
1.1.2. Serotipos y clasificación	5
1.1.3. Avances en la biología molecular y <i>S. pneumoniae</i>	5
1.1.4. Inmunoterapia e inmunización	6
1.1.5. Terapia química, antibióticos y antimicrobianos	7
1.2. Infección neumocócica. Epidemiología	9
1.2.1. Síndromes clínicos	12
1.2.1.1. Otitis media aguda	12
1.2.1.2. Sinusitis	12
1.2.1.3. Meningitis	13
1.2.1.4. Exacerbación de la bronquitis crónica y enfermedad pulmonar obstructiva crónica	13
1.2.1.5. Neumonía	14
1.2.1.6. Otros síndromes	15
1.3. Diagnóstico microbiológico	15
1.3.1. Técnicas clásicas	16
1.3.1.1. Muestras	16
1.3.1.2. Valoración de las muestras y tinción de Gram	16
1.3.1.3. Cultivo cualitativo	16
1.3.1.4. Cultivo cuantitativo	17
1.3.1.5. Identificación	17
1.3.2. Nuevas técnicas de diagnóstico	18
1.3.2.1. Inmunocromatografía	19
1.3.2.2. Técnicas de microbiología molecular	21
1.3.2.2.1. Amplificación de 16s ADN ribosomal	22
1.3.2.2.2. Amplificación de genes específicos de <i>S. pneumoniae</i>	22
1.3.2.2.3. Técnicas de PCR diseñadas para diagnóstico de <i>S. pneumoniae</i> a partir del hemocultivo	23
1.3.3. Técnica de hibridación fluorescente <i>in situ</i> o <i>fluorescent in situ hybridisation</i> (FISH)	23
1.3.4. Espectrometría de masas	24
1.4. Virulencia	24
1.4.1. Cápsula polisacáridica	24
1.4.2. Ácidos teicoico y lipoteicoico	26
1.4.3. Fosfatidilcolina	26
1.4.4. Proteínas fijadoras de colina (CBPs)	27

1.4.4.1.	Enzimas autolíticas	27
1.4.4.2.	Adhesinas	27
1.4.4.3.	Proteínas de superficie	27
1.4.4.4.	Neumolisina	28
1.4.4.5.	Bacteriocinas	28
1.4.5.	Producción de <i>pilli</i>	28
1.4.6.	Otros factores de virulencia	29
1.4.6.1.	Variación de fase	29
1.4.6.2.	Neuraminidasas y hialuronidasas	29
1.4.6.3.	Exposición a Ca ²⁺ y Zn ²⁺	29
1.4.6.4.	Inducción de apoptosis	30
1.4.6.5.	Formación de biofilm	30
1.5.	Esquemas de tipado en <i>Streptococcus pneumoniae</i> . Aplicaciones. <i>Pneumococcal molecular epidemiology network</i> (PMEN)	31
1.5.1.	Técnicas de tipado	31
1.5.1.1.	Serotipado	31
1.5.1.2.	<i>Multi locus enzyme electrophoresis</i> (MLEE)	32
1.5.1.3.	Patrón de digestión por <i>restriction fragment length polymorphism</i> (RFLP) de las proteínas fijadoras de penicilina (PBPs)	32
1.5.1.4.	<i>BOX-fingerprinting</i>	32
1.5.1.5.	<i>Ribotyping</i>	33
1.5.1.6.	Electroforesis en gel por campo pulsado (<i>Pulsed field gel electrophoresis</i> , PFGE)	33
1.5.1.7.	REP-PCR o amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las secuencias repetitivas palindrómicas (REP)	33
1.5.1.8.	Espectrometría de masas	34
1.5.1.9.	<i>Multi locus sequence typing</i> (MLST) y <i>multi locus restriction typing</i> (MLRT)	34
1.5.2.	Aplicaciones de las técnicas de tipado	35
1.5.3.	<i>Pneumococcal Molecular Epidemiology Network</i> (PMEN)	35
1.6.	Transformación y recombinación en <i>Streptococcus pneumoniae</i>	36
1.7.	Epidemiología y evolución de la resistencia a los antimicrobianos en <i>Streptococcus pneumoniae</i> . Multirresistencia	38
1.7.1.	Resistencia a β -lactámicos	38
1.7.2.	Resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas	41
1.7.3.	Resistencia a las tetraciclinas	45
1.7.4.	Multirresistencia	47
1.8.	Elementos genéticos de resistencia a macrólidos en <i>Streptococcus pneumoniae</i>	48
1.8.1.	Transposones que transportan los genes <i>erm</i> en <i>S. pneumoniae</i>	48
1.8.1.1.	Transposones que incluyen el gen <i>erm</i> (B)	48
1.8.1.1.1.	Tn917	48
1.8.1.1.2.	Tn3872	48
1.8.1.1.3.	Elemento <i>erm</i> (B) o "inserción transportadora de <i>erm</i> (B)"	49

Tn6002	49
Tn6003	49
1.8.1.1.4. Tn1545	50
1.8.1.1.5. Tn2010	50
1.8.1.1.6. Tn1116	50
1.8.1.1.7. Otras estructuras	51
1.8.1.2. Transposones que incluyen el gen <i>erm</i> (TR)	51
1.8.2. Transposones que transportan los genes <i>mef</i> en <i>S. pneumoniae</i>	51
1.8.2.1. Elementos que transportan el gen <i>mef</i> (A)	51
1.8.2.2. Elementos que transportan el gen <i>mef</i> (E)	52
1.8.2.2.1. MEGA (<i>Macrolide Efflux Genetic Assembly</i>)	52
1.8.2.2.2. Derivados de MEGA	52
Tn2009 y Tn2010	52
1.8.2.3. Elementos que transportan el gen <i>mef</i> (I)	52
2. Objetivos	57
3. Material y métodos	61
3.1. Microorganismos estudiados	61
3.1.1. Aislados prevacunales	61
3.1.2. Aislados invasivos	61
3.2. Estudio de sensibilidad	62
3.2.1. Difusión con discos	62
3.2.2. Microdilución	62
3.2.3. Determinación de la CMI mediante Etest	64
3.3. Determinación de los fenotipos de resistencia a macrólidos	64
3.4. Métodos moleculares	65
3.4.1. Extracción de ADN genómico	65
3.4.1.1. Hervido o <i>boiling</i>	65
3.4.1.2. Elución en columna	65
3.4.2. Controles de amplificación	65
3.4.2.1. Controles positivos	65
3.4.2.2. Controles negativos	65
3.4.3. Amplificación de ADN	66
3.4.3.1. Productos de amplificación menores de 3Kb	66
3.4.3.2. Productos de amplificación mayores de 3Kb	67
3.4.4. Detección de productos	67
3.4.5. Purificación y secuenciación	68
3.5. Estructura poblacional	68
3.5.1. Serotipado	68
3.5.2. Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE)	69
3.5.3. Secuencia de alelos múltiples (<i>multi locus sequence typing</i> , MLST)	70
3.6. REP-PCR (Diversilab®)	71
3.6.1. Extracción de ADN	71
3.6.2. Amplificación	71
3.6.3. Detección de producto	72
3.6.4. Análisis de resultados	72
3.7. Detección de genes de resistencia	73

3.7.1.	Detección de genes de resistencia a los macrólidos	73
3.7.1.1.	Detección de los genes <i>erm</i>	73
3.7.1.2.	Detección de los genes <i>mef</i>	73
3.7.1.3.	Detección del gen <i>msr(D)</i>	73
3.7.2.	Detección de genes de resistencia a las tetraciclinas	74
3.8.	Análisis de estructura poblacional. Índices de diversidad	74
3.8.1.	Índice de Diversidad Clonal (<i>CD</i>)	74
3.8.2.	Índice de Dominancia de Diversidad de Simpson (<i>D</i>)	74
3.8.3.	Índice de Selander y Levin (<i>H</i>)	74
3.8.4.	Índice de Shannon (<i>H'</i>)	75
3.8.5.	Índice de Evento (<i>E'</i>)	75
3.9.	Elementos de transposición	75
3.9.1.	Detección de elementos genéticos asociados a la resistencia a los macrólidos	75
3.9.1.1.	Detección de derivados de Tn916 y Tn917	75
3.9.1.2.	Detección de los elementos MEGA (<i>Macrolide Element Genetic Assembly</i>) y MAS (<i>Macrolide-Aminoglycoside-Streptothricin</i>)	76
3.9.1.3.	Identificación de los elementos derivados de Tn916 (Tn6003, Tn6002, Tn2009 y Tn3872) mediante "mapeo" (<i>mapping</i>) por técnica de PCR <i>overlapping</i>	76
3.9.1.4.	Estudio del elemento MEGA. Mapa de restricción	77
3.9.2.	Análisis Bioinformático	77
3.9.3.	Análisis estadístico	79
4.	Resultados	83
4.1.	Resistencia a macrólidos y estructura poblacional en los aislados de <i>Streptococcus pneumoniae</i> pertenecientes a la colección prevacunal recogida entre los años 1999-2003 de diferentes áreas geográficas de España	83
4.1.1.	Perfiles de sensibilidad	83
4.1.2.	Determinantes genéticos de resistencia y fenotipos asociados	85
4.1.2.1.	Macrólidos	85
4.1.2.2.	Tetraciclina	85
4.1.3.	Estructura poblacional en aislados con genes <i>mef</i>	87
4.1.3.1.	Serotipos	87
4.1.3.2.	Electroforesis en campo pulsado (PFGE)	88
4.1.3.3.	MLST y análisis por eBurst	88
4.1.4.	Corresistencia, multiresistencia y su relación con la estructura poblacional	91
4.2.	Resistencia a macrólidos y estructura poblacional en aislados de <i>Streptococcus pneumoniae</i> pertenecientes a la colección de hemocultivos (2000-2007) obtenidos en el Hospital Universitario Ramón y Cajal.	92
4.2.1.	Perfiles de sensibilidad	92
4.2.2.	Determinantes genéticos de resistencia y fenotipos asociados	93
4.2.2.1.	Macrólidos	93
4.2.2.2.	Tetraciclina	94
4.2.3.	Estructura poblacional en aislados con genes <i>mef</i>	95

4.2.3.1.	Serotipos	95
4.2.3.2.	Electroforesis en campo pulsado (PFGE)	96
4.2.3.3.	MLST y análisis por eBurst	96
4.2.4.	Corresistencia, multirresistencia y su relación con la estructura poblacional	99
4.3.	Estudio de la estructura poblacional mediante el sistema semiautomático DiversiLab®	101
4.3.1.	Colección prevacunal	101
4.3.1.1.	Análisis global	101
4.3.1.2.	Análisis por complejos clonales y clones	102
4.3.1.2.1.	Complejo clonal Spain ^{9V} -3	102
4.3.1.2.2.	Complejo clonal Spain ^{6B} -2	102
4.3.1.2.3.	Complejo clonal ST135-ST2638	102
4.3.1.2.4.	Complejo clonal Sweden ^{15A} -25	103
4.3.1.2.5.	Clon Denmark ¹⁴ -32	103
4.3.1.2.6.	Clon ST549	103
4.3.1.2.7.	Clon ST62	103
4.3.1.2.8.	Clon Spain ^{23F} -1	103
4.3.1.2.9.	Clones independientes	103
4.3.2.	Colección de Hemocultivos	110
4.3.2.1.	Análisis global	110
4.3.2.2.	Análisis por complejos clonales y clones	113
4.3.2.2.1.	Complejo clonal Spain ^{9V} -3	113
4.3.2.2.2.	Complejo clonal Denmark ¹⁴ -32	115
4.3.2.2.3.	Complejo clonal Spain ^{6B} -2	115
4.3.2.2.4.	Complejo clonal Spain ^{23F} -1	115
4.3.2.2.5.	Complejo clonal ST62-ST55	115
4.3.2.2.6.	Clon Sweden ^{15A} -25	115
4.3.2.2.7.	Clon ST1866	116
4.3.2.2.8.	Clon ST89	116
4.3.2.2.9.	Clon England ¹⁴ -9	116
4.3.2.2.10.	Clon ST3427	117
4.3.2.2.11.	Clon ST42	117
4.3.2.2.12.	Clon ST30	117
4.3.2.3.	Clones independientes	117
4.4.	Cálculo de la diversidad genética mediante índices matemáticos	119
4.5.	Elementos de transposición	122
4.5.1.	Colección prevacunal	122
4.5.1.1.	Detección de derivados de Tn ₉₁₆ y Tn ₉₁₇	122
4.5.1.2.	Detección de los elementos MEGA y MAS	122
4.5.1.2.1.	Detección del elemento MEGA	122
4.5.1.2.2.	Detección del elemento MAS	123
4.5.1.3.	Identificación de elementos derivados de Tn ₉₁₆ (Tn ₆₀₀₃ , Tn ₆₀₀₂ , Tn ₂₀₀₉ y Tn ₃₈₇₂) mediante “mapeo” (<i>mapping</i>) por técnica de PCR <i>overlapping</i>	123
4.5.1.3.1.	<i>Mapping 1</i>	123
4.5.1.3.2.	<i>Mapping 2</i>	123

4.5.1.3.3. <i>Mapping 3</i>	124
4.5.1.3.4. <i>Mapping 4</i>	124
4.5.2. Colección de hemocultivos	126
4.5.2.1. Detección de derivados de Tn916 y Tn917	126
4.5.2.2. Detección de los elementos MEGA y MAS	126
4.5.2.2.1. Detección del elemento MEGA	126
4.5.2.2.2. Detección del elemento MAS	126
4.5.2.3. Identificación de elementos derivados de Tn916 (Tn6003, Tn6002, Tn2009 y Tn3872) mediante “mapeo” (<i>mapping</i>) por técnica de PCR <i>overlapping</i>	128
4.5.2.3.1. <i>Mapping 1</i>	128
4.5.2.3.2. <i>Mapping 2</i>	128
4.5.2.3.3. <i>Mapping 3</i>	128
4.5.2.3.4. <i>Mapping 4</i>	129
4.5.3. Análisis de los aislados pertenecientes al complejo clonal mayoritario	129
4.5.4. Análisis de los aislados pertenecientes al serotipo 19A	131
4.5.5. Mapa de restricción del elemento MEGA	132
5. Discusión	137
5.1. Resistencia a macrólidos y estructura poblacional en los aislados de <i>S.</i> <i>pneumoniae</i>	137
5.1.1. Perfiles de sensibilidad y coresistencia	137
5.1.2. Determinantes genéticos de resistencia y fenotipos asociados . . .	141
5.1.3. Estructura poblacional en aislados con genes <i>mef</i>	143
5.2. Estudio de la estructura poblacional mediante el sistema semiautomático DiversiLab®	148
5.3. Cálculo de la diversidad genética mediante índices matemáticos	152
5.4. Elementos de transposición	153
6. Conclusiones	159
Lista de Figuras	162
Lista de Tablas	164
Bibliografía	165
Anexos	185

Introducción

*“En el campo de la investigación el azar no favorece
más que a los espíritus preparados”*

Pasteur

1 Introducción

1.1. *Streptococcus pneumoniae*. Perspectiva histórica

1.1.1. Descripción e identificación

Durante el siglo XIX *Streptococcus pneumoniae* fue de las primeras bacterias que se aislaron y caracterizaron como causa de enfermedad infecciosa en los humanos. Ha sido uno de los microorganismos clave en el desarrollo de la bacteriología moderna, de la microbiología molecular y de la terapia antimicrobiana, así como en el estudio de la posterior aparición de resistencias. También ha contribuido al desarrollo de diferentes áreas en el campo de la microbiología; gracias al conocimiento de la biología y fisiología de *Streptococcus pneumoniae* se han desarrollado diferentes áreas de la inmunología y de la medicina preventiva con la inclusión de vacunas frente a dicho microorganismo en las políticas de prevención de la infección neumocócica asociada [1, 2].

Hasta la década de los años 80 del siglo XIX, la enfermedad conocida como neumonía era considerada una afección respiratoria, sin tratamiento específico más allá de lo que hoy denominamos medidas de soporte y preparados medicinales a base de plantas, todas ellas sin efecto directo evidente sobre el agente causal. Los primeros aislados de *Streptococcus pneumoniae* en muestras de pacientes datan de 1880 y se realizaron de forma independiente, aunque simultáneamente, por Louis Pasteur y George M. Sternberg, a pesar de que el primero en visualizar un microorganismo de morfología compatible con *Streptococcus pneumoniae* en muestras de esputo y biopsia de pulmón fue Edwin Klebs en 1875 [1].

Practicando uno de sus experimentos sobre la rabia en París, Louis Pasteur inoculó saliva de un niño muerto por rabia en un conejo. El animal enfermó y murió con una progresión mucho más rápida que la observada en el caso de la infección por rabia. Pasteur fue capaz de contagiar otros conejos a partir de sangre del animal muerto y aisló el microorganismo de éstos en diferentes medios de laboratorio al que llamó *microbe septicémique du saliva*. En sus anotaciones de las observaciones al microscopio describió: “tras la observación con diferentes objetivos, se aprecia que cada una de estas pequeñas partículas está rodeada de una especie de aureola que parece estar compuesta de alguna sustancia” describiendo por primera vez la cápsula polisacáridica, una de las características morfológicas y de patogenicidad más importantes de *S. pneumoniae* [3].

Sternberg trabajaba en el estudio de la malaria en Nueva Orleans. Como control de uno de sus experimentos inoculó su propia saliva en un conejo, por vía subcutánea, que rápidamente enfermó y murió. Como él mismo describió, en la sangre tanto del animal muerto como de otros conejos inoculados de igual forma se observaban “una inmensa cantidad de micrococos, normalmente dispuestos en parejas, de 0,5 micras de diámetro”, llamó a este microorganismo *Micrococcus pasteurii* [4]. En 1883 se denominó al microorganismo como neumococo y como *Diplococcus pneumoniae*, nomenclatura que

permaneció vigente hasta 1974, año en que se reclasificó en base a su capacidad de formar cadenas al crecer en medio líquido y pasó a denominarse *Streptococcus pneumoniae*.

Un par de años antes, en 1881 Carl Friedländer observó cocos con disposición en cadenas y en parejas en biopsias pulmonares de más de cincuenta pacientes que murieron a causa de neumonía. Sin embargo se generó una gran confusión en torno al agente infeccioso causal de dicha enfermedad, ya que Friedländer observó el llamado bacilo de Friedländer (*Klebsiella pneumoniae*) de un paciente que había muerto por neumonía. Parece ser que debido a las malas interpretaciones de sus anotaciones al respecto, se consideró dicho bacilo como el único agente causal de neumonía, dejando de lado el papel que los diplococos anteriormente descritos podrían jugar. En el mismo laboratorio en el que Friedländer desarrollaba sus trabajos, trabajaba Hans Christian Gram, que en 1883 puso a punto una tinción específica que permitía visualizar y diferenciar varios tipos de microorganismos en muestras orgánicas. Entre los ensayos para poner a punto y validar la exitosa y aún usada tinción de Gram, realizó esta técnica sobre veinte biopsias pulmonares de pacientes que habían fallecido por neumonía. En diecinueve de dichas tinciones se observaron diplococos de color azul (clasificados posteriormente como Gram-positivos) mientras que en la muestra restante se observaron bacilos de color rojo (denominados posteriormente Gram-negativos). A pesar de estas observaciones, Gram nunca publicó entre sus trabajos que la observación mayoritaria en muestras de pacientes con neumonía eran diplococos Gram-positivos, aunque sí se han encontrado cartas privadas en las que describe que el transcurso de la neumonía en el paciente del que se aisló el bacilo de Friedländer fue bastante diferente al transcurso de la neumonía común [5].

Esta polémica generada en torno a la posible causa infecciosa de la neumonía y la posibilidad de ser diagnosticada impulsó el desarrollo de más estudios hasta que en 1887 se relacionó directamente al neumococo como causa de neumonía lobular, ya que se observaba en la mayoría de las tinciones por el método de Gram (finalmente publicado y aprobado por la comunidad científica en 1884) y cumplía los postulados de Koch [6].

Gracias a estos estudios también se publicó que a pesar de encontrarse el neumococo como microorganismo más frecuente en las muestras procedentes de pacientes con neumonía, una gran variedad de microorganismos (posteriormente denominados como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp, y el bacilo de Friedländer) se aislaban también en estas muestras [7].

En 1886, Fränkel (que previamente acuñó el nombre de “pneumokokkus” para *S. pneumoniae*) aisló el microorganismo de la piamadre de un paciente que había muerto de meningitis, aunque no se pudo determinar si la meningitis fue primaria o secundaria a una neumonía. El mismo año se publicó un trabajo en el cual se observaron diplococos Gram-positivos en biopsias renales de 13 de 550 pacientes que habían fallecido por neumonía, indicando la posible diseminación hematógena del microorganismo a otras localizaciones anatómicas. En pocos años se publicaron diferentes trabajos en los que se describían varias complicaciones asociadas a la neumonía neumocócica, como artritis, endocarditis o pericarditis.

La observación de ciertas condiciones en los enfermos que predisponían a sufrir neumonía neumocócica no se produjo hasta 1952 tras la publicación de cinco casos en niños esplenectomizados por esferocitosis que habían muerto a causa de una sepsis

neumocócica. Así en los años sucesivos se describieron diferentes factores de riesgo, siempre asociados a deficiencias en la inmunidad humoral o a defectos en la cascada del complemento como cirrosis, hepatitis, diabetes, alcoholismo o fatiga [8].

1.1.2. Serotipos y clasificación

Con la identificación de diferentes microorganismos, particularmente *S. pneumoniae* como agente causal de la neumonía, se abrieron muchas líneas de investigación en el campo de la prevención de la enfermedad neumocócica y su posible tratamiento. Se demostró la inmunización a través de sueros de pacientes con neumonía, describiéndose así lo que hoy conocemos como inmunidad humoral frente al neumococo. A pesar de que han sido necesarios muchos años de investigación posterior para poder determinar que la inmunidad conferida en estos experimentos era debida a la inoculación de un polisacárido y no de una toxina, ya en 1891, se observó que el neumococo en presencia de suero de conejo inmune se comportaba de forma diferente a otras bacterias, ya que aglutinaba el suero alrededor de la cápsula bacteriana.

En 1902, Neufeld desarrolló un método para diferenciar el neumococo de otros estreptococos, que consistía en enfrentarlo a sueros de conejos inmunizados con sangre de diferentes pacientes y observar la aglutinación característica, técnica a la que llamó “Que-llung test”. Gracias a esta técnica, se estableció la primera clasificación en función de la respuesta del neumococo frente a diferentes sueros, se describieron en un primer momento cuatro serotipos o tipos: I, II, III y IV [9]. Sin embargo, la técnica de serotipado, tal y como se aplica hoy en día, se estandarizó por Sabin y no se popularizó hasta mediados del siglo XX.

En 1917 Avery y su equipo de investigación describieron “una sustancia soluble y elaborada de forma específica por *S. pneumoniae*, que se excreta en la orina de los pacientes con neumonía neumocócica”. Años después consiguieron aislar y precipitar dicha sustancia de un neumococo de tipo II, observando que se trataba de un polisacárido.

Tras este descubrimiento se realizaron estudios sobre el papel que jugaba esta molécula en la aglutinación frente a los antisueros descritos, llegando a la conclusión de que los anticuerpos generados frente a la cápsula eran los responsables de la inmunidad frente a la infección neumocócica. Así se abrió una nueva línea de investigación en torno a las características químicas y rutas de síntesis de los diferentes polisacáridos conocidos hasta el momento. Serían necesarios aún varios años hasta definir los más de 90 serotipos que actualmente pueden diferenciarse tanto en la clasificación por el sistema americano, como en la clasificación danesa, desarrollada en el *Statens Serum Institute* en Copenhague.

Las investigaciones sobre el polisacárido capsular del neumococo siguen vigentes tanto para entender su fisiología y patogenicidad, como para mejorar la clasificación por serotipos, de hecho, recientemente se han descrito variaciones en la cápsula del tipo 6 dando lugar a serotipos nuevos, 6C y 6D [10, 11].

1.1.3. Avances en la biología molecular y *S. pneumoniae*

En la segunda mitad del siglo XX se desarrolló la biología molecular y en gran parte fue gracias a los estudios realizados sobre *S. pneumoniae*. En base a los resultados

de los experimentos de Griffith, se pudo establecer que el ADN es la unidad básica del material genético [12]. Griffith trató de explicar el mecanismo por el cual se daban variantes de colonia lisa y rugosa del microorganismo en función de la producción de cápsula y por tanto de su patogenicidad. Descubrió que cuando se inyectaban ratones con una preparación de células de *S. pneumoniae* vivas de tipo II rugosas (sin cápsula), y de células muertas de tipo III lisas (capsuladas), el ratón desarrollaba la enfermedad, y también demostró que de los cultivos de muestras procedentes del animal se aislaban neumococos de tipo III vivos. Tras muchos experimentos similares con neumococos lisos y rugosos de diferentes tipos, llamó a este fenómeno transformación [12, 13].

Avery investigó el papel del ADN en el fenómeno de la transformación y llegó al descubrimiento de que el “principio transformante” era realmente el ADN y no una proteína o un carbohidrato.

Una vez abierta la línea de investigación en la biología molecular de *S. pneumoniae*, se hicieron descubrimientos relevantes, entre ellos que el neumococo es capaz de incorporar en su genoma grandes cadenas de ADN sencillas, lo que se denominó “competencia” Thomasz, Claverys y muchos investigadores más estudiaron la naturaleza y mecanismos por los que se produce la transformación y la competencia y así se descubrió que estos procesos son la base fenómenos tan importantes como el intercambio o *switching* capsular o la resistencia a los antimicrobianos [14, 15].

1.1.4. Inmunoterapia e inmunización

En el marco de los trabajos de inmunización frente a la rabia y otros microorganismos, se desarrollaron experimentos de inmunización a conejos mediante inoculación de células inactivadas por calor, filtrado de cultivos e incluso de líquido pleural de pacientes. Se observó que no sólo se inmunizaba a los animales inoculados, sino que también las crías recién nacidas de éstos presentaban resistencia al desarrollo de la enfermedad, demostrando una posible transferencia pasiva de la inmunidad. Las primeras vacunas frente a *S. pneumoniae* se ensayaron en animales y se utilizaron en un primer momento como terapia en enfermos más que como tratamiento preventivo o medida de control. El tratamiento mediante vacunación se inició en Chicago en 1918 y consistía en dar vacunas preparadas a base de células inactivadas a pacientes con neumonía neumocócica diagnosticada, basándose en el exitoso modelo empleado en el tratamiento de la difteria que se apoyaba en la idea de que esta estrategia aceleraba la producción de anticuerpos [16].

La confirmación sobre la utilidad del tratamiento serológico en enfermos de neumonía se produjo tras administrar dicho tratamiento en un campamento militar en Estados Unidos y a los soldados durante la I guerra mundial, en principio sólo frente al neumococo de serotipo I y más tarde también frente al de serotipo II, aunque con menos éxito y no se pudo conseguir un suero activo para la inmunización frente al neumococo de serotipo III. A pesar de que los resultados de este ensayo no fueron concluyentes según el diseño de los investigadores, sí que sugerían la eficacia de la terapia serológica para disminuir el impacto de la infección neumocócica [17]. Esto impulsó para que se diseñaran varios ensayos clínicos en los cuales se pudo incluso establecer una relación estadísticamente significativa entre el tratamiento serológico y la disminución de la mortalidad [16]. A pesar de todo ello, la terapia serológica suponía graves riesgos para el paciente ya que era

frecuente la presentación de reacciones anafilácticas graves por el resto de componentes de los sueros inoculados. Los sueros utilizados procedían en un primer momento de caballo y más tarde, con el estudio de la purificación del antígeno y concentración de los anticuerpos en el suero administrado se llegaron a desarrollar sueros de conejo altamente específicos para la inmunización frente a *S. pneumoniae*. A su vez, en universidades prestigiosas como Harvard o Rockefeller se elaboraron guías para la correcta administración de esta terapia; el paciente que se elegía para tratar debía estar correctamente diagnosticado por signos clínicos y radiológicos. Se estableció que para que el tratamiento fuera eficaz, el paciente debía encontrarse en las fases iniciales de la enfermedad, sin llevar más de tres días de curso clínico.

Una vez diagnosticado un paciente, se determinaba el serotipo bien por observación directa del *Quellung* sobre las muestras de esputo o bien por inoculación en un modelo animal. También era necesario recabar datos sobre hipersensibilidad a los caballos o conejos, inmunización anterior frente a la difteria, asma, urticaria u otro tipo de alergias.

Finalmente, era imprescindible someter a todos los pacientes, antes de recibir el suero, a una prueba de sensibilidad cutánea con polisacáridos de neumococo purificados y era obligatorio tener epinefrina “a pie de cama” para actuar frente a posibles reacciones anafilácticas.

El volumen de suero a emplear en función de la dosis de anticuerpos que se quería administrar se pautó en un primer momento de forma empírica hasta que en 1933 se describió un método por el cual era posible adecuar la dosis en función de la respuesta a la prueba de sensibilidad [18].

La conocida como “terapia serológica” o inmunoterapia se implantó ampliamente en Estados Unidos y en Europa como medida de control de la neumonía, a pesar de ser una terapia que requería personal especializado, suponía elevados costes y riesgos para el paciente. Con la aparición de los antimicrobianos se abandonó esta estrategia, pero la investigación continuó en la línea de la inmunización, hasta que en 1940 Austrian demostró que la vacunación con polisacáridos capsulares purificados de diferentes serotipos era una medida eficaz para la prevención en adultos frente a las infecciones por esos tipos capsulares [19, 20].

1.1.5. Terapia química, antibióticos y antimicrobianos

Antes del descubrimiento de la terapia serológica, se habían ensayado múltiples remedios frente a la neumonía neumocócica; extractos de plantas como la digital, soluciones de permanganato y de mercuriocromo, potasio e incluso aspirina, todas ellas con poco éxito. Los primeros avances se observaron al tratar pacientes con neumonía con un compuesto derivado de la quinina, la dietilcupreína más conocida como optoquina. Hoy en día, la sensibilidad de *S. pneumoniae* frente a este compuesto se emplea como diagnóstico diferencial *in vitro* del neumococo y otros estreptococos. A pesar de que rápidamente se observó que en los modelos en ratones, el neumococo generaba resistencia frente a la acción de la optoquina, se utilizó masivamente y sin control de dosificación, hasta que se recogieron datos en los que se indicaba que producía neuropatía óptica como efecto adverso grave, momento desde el cual, se desechó su utilización en humanos [21].

Gracias al descubrimiento del prontosil en 1932 y de su compuesto activo, la sulfonilamida, se popularizó el uso del llamado “elixir de sulfonila”, que consistía en un jarabe de

dicho compuesto utilizando como excipiente un compuesto neurotóxico, el etilénglicol. A pesar de ser un tratamiento efectivo frente a *S. pneumoniae*, la agencia para el control de alimentos y medicamentos de Estados Unidos, *Food and Drug Administration* (FDA), elaboró un informe desfavorable, debido probablemente a los efectos tóxicos del excipiente [2]. Uno de los compuestos derivados del prontosil, la sulfapiridina, fue el primer compuesto con el que se consiguieron resultados de curación sin efectos adversos en el tratamiento de un paciente con neumonía. La utilización de la sulfapiridina para el tratamiento y curación de la neumonía neumocócica se consolidó definitivamente en Europa, cuando se publicó la curación inesperada de Churchill en 1943 [22].

En Estados Unidos, tras los fracasos de la sulfonamida, la FDA reguló el uso de la sulfapiridina de forma que sólo se podía utilizar por médicos que además realizaran investigaciones sobre el compuesto. Gracias a ello se pudo comprobar que los pacientes tratados no presentaban efectos adversos y que se trataba de un compuesto seguro para desplazar a la terapia serológica en el tratamiento de la neumonía. Sin embargo, durante ese mismo año, 1943, ya fueron detectadas las primeras cepas de *S. pneumoniae* que presentaban resistencia a la sulfonamida.

A pesar del descubrimiento de la penicilina a finales de los años 20 del siglo XX, su uso para el tratamiento de la neumonía neumocócica no se popularizó hasta 1942, ya que en aquellos años se creía que la sensibilidad *in vitro* de *S. pneumoniae* frente a este compuesto era mucho menor que la que presentaba *Staphylococcus aureus*, con lo cual se suponía que no tenía buena actividad frente a neumococo [23]. Los primeros tratamientos con penicilina que se probaron en pacientes con infección neumocócica se administraron en tres casos de endocarditis tratados previamente con sulfonamida. A pesar de que todos murieron, tras la administración de penicilina, dos de ellos mejoraron notablemente, y todos los hemocultivos se negativizaron [24, 25].

Otra de las causas por las que la penicilina tardó en utilizarse en pacientes con infecciones neumocócicas fue la baja disponibilidad del antibiótico, debido a la dificultad para su producción y purificación. Cuando por fin se desarrollaron los procesos industriales para la producción de penicilina, los procesos infecciosos causados por *S. pneumoniae* como la neumonía, artritis séptica, endocarditis y bacteriemia pasaron a ser fácilmente controlables sin las complicaciones y riesgos que suponía la terapia sérica y sin ser imprescindible la determinación del serotipo. Aún así en los artículos de la época, sí se hace referencia a la persistencia de la tasa de mortalidad (en torno al 20 %) asociada a la neumonía neumocócica y la observación de que en la población en edades extremas (niños y ancianos), las enfermedades causadas por *S. pneumoniae* no estaban tan controladas como en los adultos [26].

Fueron necesarios 25 años desde que comenzó a utilizarse la penicilina en el tratamiento frente a *S. pneumoniae* para que se constatare las primeras pérdidas de sensibilidad a este compuesto en el uso clínico. En los primeros ensayos que se realizaron en ratones, se observó que el neumococo tenía la capacidad de sobrevivir en presencia de bajas concentraciones del antibiótico [23]. Tras la aparición en los años 80 de los primeros aislados altamente resistentes a penicilina, la resistencia se convirtió en un problema mundial en menos de diez años, lo que impulsó, y aún actualmente impulsa, el desarrollo de la investigación de los mecanismos implicados en la resistencia a diferentes compuestos. El uso global de la penicilina también provocó cambios epidemiológicos a nivel poblacional; los serogrupos más invasivos (1, 2, 3, 5 y 7) pasaron a ser poco

frecuentes, tanto en el estado de portador, como en los procesos infecciosos, pasando a ser los serogrupos “infantiles” (6, 9, 14, 19 y 23) los más exitosos tanto en la colonización como en las enfermedades propias de la infancia, especialmente la otitis media, por ello se cree que fueron los primeros serotipos (6A, 6B, 9V, 19F, 19Ay 23F) en adquirir mecanismos de resistencia.

1.2. Infección neumocócica. Epidemiología

El nicho ecológico habitual de *S. pneumoniae* es la nasofaringe. Hay estudios en los que tras un único cultivo de una torunda nasal, se aíslan *S. pneumoniae* en el 5-10% de los adultos sanos, y en el 40% de niños sanos y tras cultivos repetidos, el porcentaje de aislados aumenta hasta el 60%. Otra particularidad de la colonización nasofaríngea es que tiene tendencia estacional, siendo mayor en los meses fríos del año. El estado de portador está clásicamente asociado a los niños, que adquieren la primera colonización hacia los seis meses de edad y se van recolonizando por *S. pneumoniae* de diferentes serotipos, cada seis meses, siendo frecuente la co-colonización por más de un serotipo [27]. En el caso de los adultos, la colonización de la nasofaringe por *S. pneumoniae* también puede producirse, pero es transitoria, de forma que un serotipo suele persistir en la mucosa respiratoria sólo entre dos y cuatro semanas. Para que *S. pneumoniae* pase de ser un microorganismo que coloniza las vías respiratorias altas a causar procesos infecciosos, se deben dar una serie de factores, que dependen del hospedador y de los mecanismos de patogenicidad de la bacteria que serán descritos más adelante (ver apartado 1.4) [8]. La colonización de la mucosa respiratoria es un factor predisponente para la infección neumocócica invasiva, no obstante existen diferentes estudios en los que se propone la colonización como un factor protector frente a la adquisición de serotipos con mayor capacidad invasiva, cuya colonización suele ser transitoria [28]

Entre los factores que predisponen a la infección neumocócica se encuentran los defectos en los mecanismos inmunitarios ya que *S. pneumoniae* es un microorganismo extracelular, frente al cual tanto la inmunidad humoral (inmunoglobulinas y complemento) como la celular mediante fagocitosis (activación de macrófagos) juegan un papel clave para su eliminación de los lugares de infección. Deficiencias en la formación de anticuerpos por causas congénitas contribuyen a que *S. pneumoniae* sea la causa principal de infección respiratoria en pacientes con déficit en la formación de γ -globulinas o en enfermos con mieloma múltiple, linfomas o leucemia linfática crónica. Las deficiencias del sistema inmunitario adquiridas como la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) hacen que la infección neumocócica sea tan frecuente en estos pacientes que se recomienda realizar detección de VIH en los pacientes jóvenes con neumonías neumocócicas de repetición. Con respecto a la inmunidad celular, las deficiencias que se asocian con la infección neumocócica son el déficit en la cascada del complemento, en especial los que afectan a la vía de activación del factor C3b, dado que el suero no está implicado en estos mecanismos, al igual que la neutropenia. Sin embargo, defectos en la opsonización por los polimorfonucleares, como en las granulomatosis crónicas, no predisponen a la infección dado que el neumococo carece de catalasa y es, por tanto, sensible a la acción de los radicales peróxido y de la mieloperoxidasa presentes en la membrana de dichas células.

El bazo tiene un papel fundamental en la defensa del organismo frente a *S. pneu-*

moniae. Los neumococos que han sido opsonizados se eliminan por el hígado, pero las células de *S. pneumoniae* que han sido capaces de escapar a la opsonización se eliminan por el bazo ya que la sangre pasa más despacio a través de este órgano y se prolonga el contacto de los microorganismos con las células del sistema retículoendotelial en los cordones de Billroth. De hecho, a los pacientes esplenectomizados se les considera de alto riesgo para sufrir enfermedad neumocócica invasiva [8] y la vacunación frente a neumococo está altamente recomendada [29, 30].

La edad del paciente es un factor importante que predispone a la infección neumocócica. Es más habitual en pacientes ancianos y en lactantes y niños menores de dos años. El déficit inmunitario, tanto por inmadurez como por deficiencias en la respuesta, así como la presencia de enfermedades de base o malnutrición o la función inadecuada del bazo, son posibles explicaciones.

El alcoholismo está relacionado con la infección neumocócica hasta en un 30 % de los casos según algunos estudios. Se cree que esto puede ser debido al estilo de vida de estos pacientes, la continua exposición al frío, la malnutrición o la ausencia del reflejo del vómito.

La *diabetes mellitus* es otro factor predisponente, ya que la función fagocítica está alterada, especialmente si hay insuficiencia renal. Muchos procesos crónicos se asocian con infecciones debidas a *S. pneumoniae* que suelen necesitar ingreso hospitalario, llegando incluso a producirse infecciones nosocomiales por este microorganismo [8].

Las infecciones previas por virus también son un factor predisponente importante, especialmente en el caso de las infecciones causadas por el virus de la gripe, esto podría ser explicado por el aumento de los receptores de membrana celular que favorece la adherencia del neumococo a la mucosa y su invasión. Varios trabajos realizados para establecer la relación entre la neumonía neumocócica y la elevada mortalidad de la pandemia de gripe A/H1N1 de 1918 demuestran que en más del 50 % de los casos, las muertes en enfermos que se contagiaron del virus de la gripe, se debieron a neumonía bacteriana (principalmente neumocócica) según un estudio anatómico-patológico de las necropsias de tejido pulmonar [31, 32, 33]. En base a esto, otros trabajos relacionan el beneficio que podría aportar la vacunación frente a *S. pneumoniae* en caso de sufrir una pandemia de gripe como en la gripe rusa (1889-1893), la gripe española (1918-1919), la gripe asiática (1958-1959) o la gripe de Hong Kong (1969-1969) como medida de prevención de enfermedad neumocócica invasiva. La reciente pandemia de la variante de la nueva gripe A (H1N1) 2009 de origen porcino podría reforzar nuevamente las estrategias de vacunación.

Otros procesos que afectan al tracto respiratorio como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), las bronquiectasias, las deficiencias en el aclaramiento ciliar y la inhalación de tóxicos o el tabaquismo están directamente relacionados con la predisposición a que los neumococos presentes en la mucosa nasofaríngea la invadan y provoquen infección.

Por último, hay otra serie de factores, que a pesar de no conocer bien las causas, están directamente relacionados con la predisposición a sufrir infección neumocócica, como son el estrés y la fatiga. En la tabla 1.1 se muestra un resumen de los factores predisponentes para sufrir enfermedad neumocócica invasiva.

Factor predisponente	Causa
Formación defectuosa de anticuerpos	Enfermedades congénitas Mieloma múltiple Leucemia linfática crónica Linfoma Infección por VIH
Deficiencia o ausencia de factores del complemento	C1, C2, C3 y C4
Deficiencia en linfocitos polimorfonucleares	Neutropenia crónica Anemia aplásica Fármacos
Función de linfocitos polimorfonucleares alterada	Alcoholismo Cirrosis hepática Diabetes mellitus Insuficiencia renal Tratamiento con corticoesteroides
Infección respiratoria previa	Virus de la gripe
Alteraciones respiratorias	Asma EPOC Tabaquismo
Exposición a portadores	Centros de día Cuarteles Prisiones Guarderías
Otros	Edad (infancia y ancianidad) Malnutrición Fatiga y estrés Exposición al frío

Tabla 1.1: Factores predisponentes para sufrir enfermedad neumocócica invasiva

1.2.1. Síndromes clínicos

S. pneumoniae puede ser causa de diferentes infecciones en el tracto respiratorio por migración directa de los microorganismos que se encuentran colonizando la nasofaringe. Así mismo, por diseminación hematógena, también puede llegar al sistema nervioso central, las válvulas cardíacas, huesos, articulaciones y a la cavidad peritoneal. En algunos casos, la invasión de la pleura y del sistema nervioso central puede darse también por migración desde la nasofaringe o desde el oído medio. La bacteriemia puede ser primaria, cuando no hay un foco aparente desde el cual se diseminan los microorganismos por la sangre o secundaria a otros procesos infecciosos.

1.2.1.1. Otitis media aguda

La otitis media aguda representa la causa más común de consulta pediátrica así como uno de los motivos más habituales de prescripción de antibióticos en los niños [34]. Existe una predisposición a sufrir este tipo de infecciones en los meses fríos del año, esto se explica debido a que la infección por virus respiratorios como los coronavirus, virus respiratorio sincitial y los adenovirus favorecen el desarrollo de otitis media aguda por *S. pneumoniae* tras el cuadro viral [8, 35]. Normalmente el diagnóstico es presuntivo y el tratamiento es empírico, pero si se quiere estudiar los microorganismos implicados en el cuadro es necesario realizar una timpanocentesis y cultivar el exudado del oído medio. Las guías de pediatría recomiendan realizar dos timpanocentesis en el transcurso del cuadro, una al inicio, previo al tratamiento antimicrobiano y una segunda a los tres-cinco días de iniciar el tratamiento para comprobar la eficacia del tratamiento. Hay una gran discusión sobre el beneficio de aplicar tratamiento antibiótico. La desventaja que conlleva tratar este cuadro, es elevar la presión de antibióticos a la que están expuestos los microorganismos que forman parte de la microbiota faríngea. Por otra parte, a pesar de ser infecciones que, en algunos casos, pueden resolverse sin tratamiento antimicrobiano, la probabilidad de que se desarrollen complicaciones más graves como la mastoiditis es elevada. En un estudio realizado en el Hospital Niño Jesús de Madrid, comprobaron que los casos de mastoiditis entre los años 1999 y 2005, aumentaron el doble cada año, con igualdad de ingresos cada año a excepción de 2005, año en el que los ingresos se triplicaron [36].

Los microorganismos implicados con más frecuencia varían en función de la epidemiología local, la implantación de campañas de vacunación y el uso de antibióticos. El microorganismo que se aísla con mayor frecuencia es *S. pneumoniae*, sólo o conjuntamente con *H. influenzae* no tipable, llegando a causar hasta un 80 % de estas infecciones [37, 35].

1.2.1.2. Sinusitis

Al igual que en la otitis media aguda, *S. pneumoniae* es, junto con *H. influenzae* no tipable, la causa principal de la sinusitis. En ésta se produce un aumento de las secreciones en los senos paranasales que dificultan el aclaramiento de las bacterias que llegan a ellos por comunicación con la faringe. La acumulación de estas secreciones puede deberse a infecciones por virus, procesos alérgicos o simplemente catarros y produce

un medio adecuado para la proliferación de las bacterias y por tanto, la infección de los senos [8].

1.2.1.3. Meningitis

La llegada de los microorganismos a las meninges puede ser por migración directa desde los senos paranasales o el oído medio o por diseminación hematógena, también contribuye a la inflamación de las meninges la producción de reacción inflamatoria debida a la hipersecreción de factor de necrosis tumoral, interleucinas 1 y 6 y de péptidos vasoactivos en éstas y en el espacio subaracnoideo. Esta estimulación inmunológica es clave para la progresión de la enfermedad así como para su diagnóstico ya que la presencia de leucocitos, especialmente polimorfonucleares en el líquido cefalorraquídeo es indicador de meningitis bacteriana [8].

La implantación de políticas de vacunación frente a diferentes microorganismos que clásicamente eran protagonistas en esta entidad ha hecho que la epidemiología sea específica de forma local. *S. pneumoniae* es la primera causa de meningitis en adultos en zonas en las que la vacunación frente a *H. influenzae* tipo b y *Neisseria meningitidis* está implantada, y sigue siendo la primera causa entre la población pediátrica, con ciertos cambios en las zonas en las que las vacunas conjugadas (heptavalente, PCV-7 y trecevalente, PCV-13) llevan más años en uso.

En España hay estudios en los que se recoge que la incidencia de meningitis por *S. pneumoniae* en la población pediátrica ha disminuido desde un 6,14 por cada 100.000 niños menores de cinco años en 2001 a un 2,83 por cada 100.000 niños menores de cinco años en 2006. A pesar de no haber cambios estadísticamente significativos con respecto a los serotipos, esta disminución de la incidencia se correlacionó con el aumento de la aplicación de la vacuna PCV-7 [38]. Entre la población adulta en España, la mayor incidencia de meningitis neumocócica se produce en los mayores de 65 años, probablemente debido a la presencia de otras enfermedades de base y a la alteración de la respuesta inmune. La mortalidad asociada es de un 31 %, figurando como factores predisponentes importantes la neumonía o las otitis previas [39].

1.2.1.4. Exacerbación de la bronquitis crónica y enfermedad pulmonar obstructiva crónica

Cuando se realizan estudios microbiológicos de muestras de pacientes con bronquitis crónica o con EPOC, se observa la presencia de *S. pneumoniae* como uno de los microorganismos con mayor implicación [40, 41, 42]. En estos procesos respiratorios el aclaramiento ciliar y la producción de mucina están alterados debido a una respuesta inmunológica constante que responde a la colonización de la mucosa bronquial por diferentes microorganismos, entre los que principalmente se encuentra *S. pneumoniae*. A este proceso se le conoce como “colonización patogénica” ya que los microorganismos no invaden la mucosa, pero activan procesos inflamatorios que producen alteraciones en la misma [43]. En el caso de las exacerbaciones y neumococo se observa la adquisición de un serotipo diferente, frente al cual se desarrolla una nueva reacción inflamatoria [44].

1.2.1.5. Neumonía

Cuando *S. pneumoniae* es capaz de llegar a los alveolos pulmonares, se multiplica y es transportado a través de los septos alveolares. Esta multiplicación activa el sistema del complemento, produce citoquinas y regula la aparición de receptores de superficie en el endotelio vascular de la microcirculación alveolar. Como consecuencia se acumulan en los alveolos bacterias y exudado inflamatorio que son detectados fácilmente por técnicas de imagen, dando el patrón radiológico conocido como “neumonía típica” (ver fig. 1.1).

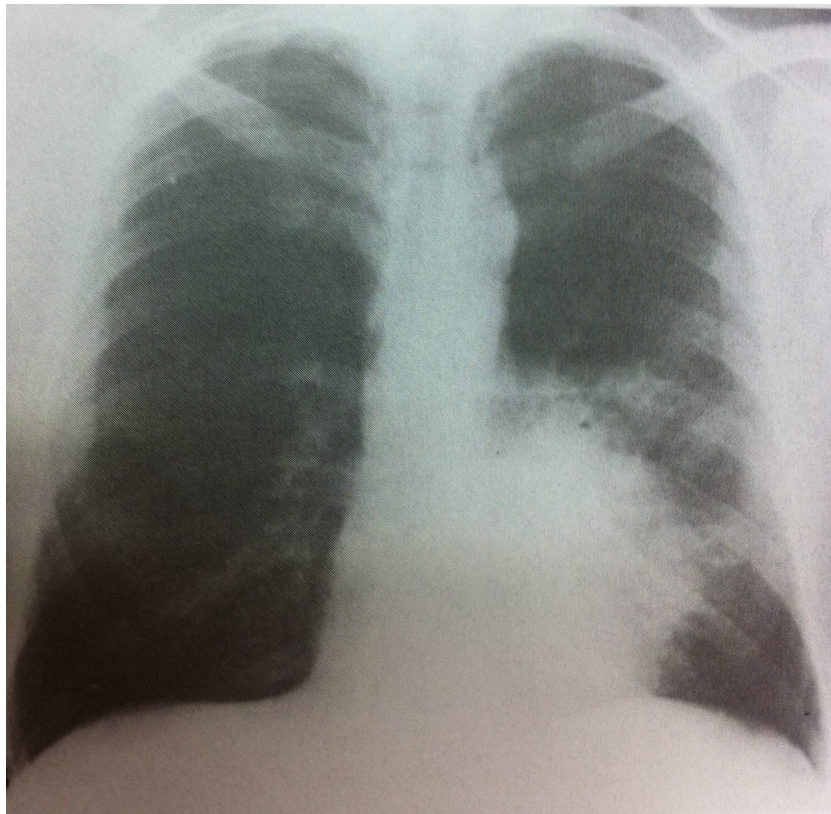


Figura 1.1: Patrón radiológico de neumonía típica

Entre los síntomas de la neumonía típica, se encuentran fiebre elevada (más de 40°C), dolor pleurítico, tos productiva, aceleración del pulso cardiaco (90-110 pulsaciones/min) y consecuente disnea [8]. Todos estos síntomas suelen presentarse de forma brusca, aunque existe una presentación atípica, que se suele encontrar en los ancianos en la que estos síntomas aparecen de forma gradual, no hay fiebre elevada, las alteraciones cardiacas no son tan marcadas y suele haber síntomas extrapulmonares y radiológicamente tampoco se aprecia en las radiografías la imagen típica. Es importante diferenciar el cuadro, debido a las complicaciones de la neumonía no tratada o tratada con demora ya que suele presentarse el derrame pleural y el empiema que requieren drenaje quirúrgico además de tratamiento antimicrobiano adecuado. Desde la introducción de la vacuna conjugada heptavalente, diferentes estudios remarcan la disminución en la incidencia de enfermedad invasiva neumocócica, tanto en niños, ya que son los receptores de la vacuna, como en adultos, por el efecto de “inmunidad de grupo” y su consecuencia

en cuanto al estado de portador nasofaríngeo. En Estados Unidos la vacuna heptavalente se introdujo en el año 2000 y en diferentes estudios se refleja una disminución de la incidencia entre los periodos pre y post vacunales [45, 46] siendo, según algunos autores de un 84 % entre los años 1979 y 2004 [47]. Además de disminución, se observan cambios en los serotipos de los neumococos aislados, elevándose significativamente los serotipos no incluidos en la vacuna heptavalente [47].

En España existen estudios tanto a favor de una disminución de la enfermedad neumocócica invasiva como en contra. En estudios realizados entre los años 1999-2000 y 2002-2004, se observó un aumento (del 21 % al 44 %) en los serotipos no vacunales, siendo el serotipo más prevalente el serotipo 1 [48]. Cabe destacar que en España la vacuna heptavalente se introdujo en 2002, y sólo es obligatoria en el calendario vacunal en la Comunidad de Madrid. Se estima que la tasa de vacunación en España está en torno al 45 % [49], con lo cual se observaría el mismo efecto en cuanto a disminución de incidencia de enfermedad neumocócica invasiva y en la prevalencia de serotipos en las zonas en las que la implantación de la vacuna es total aunque no se incluya de forma oficial en el calendario vacunal. Otra característica importante de la enfermedad invasiva es que parece ser que a pesar de estar causada por neumococos con menos resistencias a los antimicrobianos [50], los cuadros clínicos son muy complicados y las infecciones son muy persistentes a pesar de los tratamientos con antibióticos adecuados. Por ejemplo, en Sevilla y Málaga se observó un aumento de derrame pleural paraneumónico de hasta trece veces más entre los años 1998 y 2006, causados en un 86 % de los casos por neumococos de serotipos no incluidos en la vacuna heptavalente [49]. En contraste con estos datos, en otro estudio realizado entre los años 2007 y 2009 se observó un aumento de un 44 % en la incidencia de la enfermedad neumocócica invasiva en niños, presentando serotipos no incluidos en la vacuna conjugada heptavalente [51].

1.2.1.6. Otros síndromes

Además de los síndromes anteriormente descritos, el neumococo puede estar implicado en una amplia variedad de infecciones como la conjuntivitis que habitualmente se asocia a neumococos no capsulados y en forma de brote en instituciones. Puede ser causa de peritonitis primaria o secundaria a infección del sistema reproductor, sobre todo en mujeres. A pesar de ser causa de endocarditis y pericarditis muy frecuentemente en la antigüedad, actualmente se describen casos aislados en la literatura [52, 53], así como el síndrome o triada de Austrian (neumonía neumocócica, meningitis y endocarditis) [54]. Por último, los abscesos epidurales y cerebrales, la artritis séptica y la osteomielitis se asocian raramente a *S. pneumoniae* y en casos en que los pacientes presentan defectos inmunitarios.

1.3. Diagnóstico microbiológico

El diagnóstico microbiológico de la infección respiratoria y de otras localizaciones por *S. pneumoniae* es fácilmente accesible en un Servicio o laboratorio de Microbiología convencional, ya que puede realizarse adecuadamente con las técnicas microbiológicas habituales. No obstante suelen requerir un período amplio de tiempo (48-72 horas) para

su desarrollo por lo que también es útil disponer de nuevas técnicas que reduzcan estos tiempos [55].

1.3.1. Técnicas clásicas

1.3.1.1. Muestras

Para el diagnóstico convencional de la infección respiratoria por *S. pneumoniae* las muestras más adecuadas son el esputo, representativo de las secreciones de vías bajas, y las muestras obtenidas por métodos invasivos como son la fibrobroncoscopia (brocoaspirados, lavados broncoalveolares y cepillados bronquiales) o mediante punción (líquido pleural, muestras de secreciones por punción transtorácica o transtraqueal). En todos los casos, se recomienda a su vez procesar hemocultivos ya que refuerzan el diagnóstico etiológico puesto que hasta en el 20% de la neumonías neumocócicas cursan con bacteriemia. El procedimiento de identificación de *S. pneumoniae* en estas muestras es el mismo que el que se realiza a partir de las muestras respiratorias.

1.3.1.2. Valoración de las muestras y tinción de Gram

Las muestras obtenidas mediante procedimientos invasivos minimizan o evitan la posibilidad de contaminación con microbiota orofaríngea que pueda enmascarar o dificultar el aislamiento de *S. pneumoniae* [56]. En el caso de los esputos (o de secreciones traqueales) es necesario definir unos criterios de validez de la muestra para el cultivo. Estos criterios establecen la rentabilidad del mismo mediante su observación microscópica. Se basan en la presencia de células inflamatorias y su relación con la ausencia o presencia de células epiteliales que pueden indicar contaminación orofaríngea. Generalmente, la observación microscópica se realiza con objetivo de bajo aumento (sin aceite de inmersión) y sobre la tinción de Gram [57]. Los criterios cuantitativos habitualmente utilizados se recogen en la tabla 1.2.

El procesamiento de esputos no valorables puede conducir a informes incorrectos que condicionan orientaciones diagnósticas erróneas, tratamientos antibióticos inadecuados e incrementos en el gasto sanitario [58, 59]. Todas las muestras obtenidas mediante punción deben ser consideradas valorables. En ellas deben aplicarse una tinción de Gram que evidencie la posible presencia de *S. pneumoniae*. La morfología esperada en la tinción de Gram es la de un coco Gram positivo con disposición en parejas (diplococos) (fig. 1.2).

1.3.1.3. Cultivo cualitativo

En muestras respiratorias en las que por el método de obtención no se produce contaminación con microbiota del tracto respiratorio superior, la presencia de cualquier colonia en el cultivo microbiológico es criterio diagnóstico y debe procederse a su identificación. En el caso de muestras que hayan podido contaminarse con microbiota orofaríngea deben identificarse las colonias sospechosas con aspecto de neumococo (tabla 1.3) tanto si son mayoritarias en el cultivo con respecto al resto de los microorganismos como si estos

Categoría	Criterio
Muestra valorable	Observación de >25 células inflamatorias/campo y <10 células epiteliales/campo de bajo aumento
	Observación de >25 células inflamatorias/campo y >10 cél. epiteliales/campo de bajo aumento si el ratio de células infamatorias/células epiteliales es >10 y existe un único morfotipo bacteriano predominante
Muestra no valorable	Espustos con ≥ 10 cél. epiteliales/ campo de bajo aumento
	Aspirados traqueales de adultos con ≥ 10 células epiteliales por campo de bajo aumento y sin observación de microorganismos
	Aspirados traqueales de pacientes pediátricos sin observación de microorganismos
Excepciones	Muestras para cultivo de <i>Legionella</i> spp., <i>Mycobacterium</i> spp., <i>Nocardia</i> spp., <i>Rhodococcus</i> spp.
	Muestras de pac. neutropénicos o con fibrosis quística

Tabla 1.2: Criterios de aceptación de muestras respiratorias (esputo) para cultivo

se encuentran en baja proporción. Esta identificación también ha de ser independiente de lo observado en la tinción de Gram [56].

1.3.1.4. Cultivo cuantitativo

Se realiza habitualmente a partir de las muestras obtenidas por fibrobroncoscopia. Para el cultivo cuantitativo es necesario realizar diluciones seriadas de la muestra y cultivar cada una de las diluciones para poder establecer el recuento de bacterias. Mediante esta técnica se consigue establecer la carga bacteriana de la muestra y diferenciar colonizaciones de bajo grado de las colonizaciones patogénicas, generalmente asimiladas a una situación de infección. En el caso de *S. pneumoniae* suele tomarse como criterio de colonización patogénica los cultivos con recuentos superiores a 10^5 - 10^6 unidades formadoras de colonia por ml (ufc/ml) para los broncoaspirados y lavados broncoalveolares y de 10^3 ufc/ml para los cepillados broncoalveolares [56]. Recuentos inferiores a 10^3 ufc/ml suelen indicar contaminación por microbiota orofaríngea. No obstante, en determinadas situaciones, tanto en el lavado como en el cepillado brocoalveolar los criterios habituales no deben ser aplicados de forma rígida ya que recuentos inferiores también se han asociado con situaciones patogénicas, sobre todo en pacientes que han recibido tratamiento antimicrobiano previo [56].

1.3.1.5. Identificación

Las características fenotípicas de *S. pneumoniae* en el cultivo en placas de agar sangre en condiciones habituales (48 horas de incubación a 35°C y 5% CO₂) se resumen en la

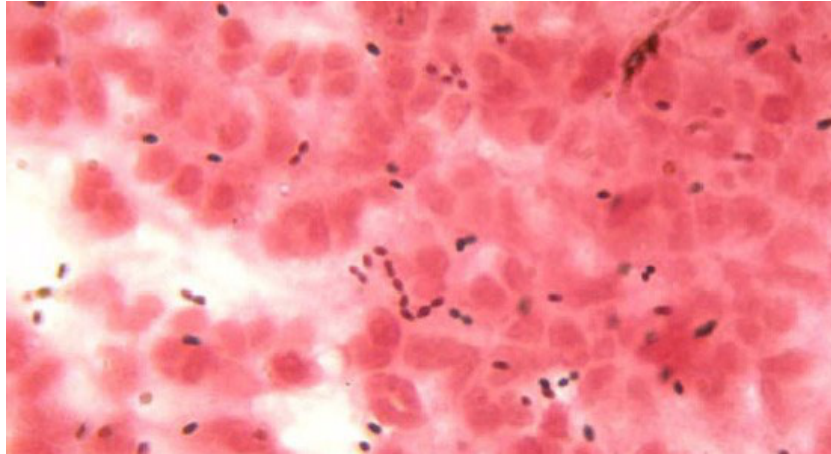


Figura 1.2: Tinción de Gram de *S. pneumoniae* en una muestra de esputo con criterio de aceptación valorable para el cultivo

tabla 1.3.

Características fenotípicas de <i>S. pneumoniae</i> en cultivo
α -hemólisis en placas de agar sangre (halo verde alrededor de la colonia crecida)
Catalasa negativa
Sensibilidad a la optoquina
Solubilidad en bilis (desoxicolato)

Tabla 1.3: Identificación de *S. pneumoniae* en cultivo

Estas características fenotípicas pueden verse afectadas por las condiciones ambientales en las que se realice el cultivo como por ejemplo la presencia de diferentes concentraciones de CO₂. Desde el punto de vista del diagnóstico microbiológico es importante tener en cuenta estas condiciones ya que podrían producirse errores en la identificación y subestimar por la presencia de otras especies como *Streptococcus pseudopneumoniae* o *Gemella* spp. que pueden confundirse con colonias de *S. pneumoniae* o presentar resultados anómalos como la sensibilidad a optoquina, y que en ocasiones se han asociado con neumonía [60]. Asimismo, se han descrito variantes de colonias de *S. pneumoniae* (no umbilicadas y rugosas) con morfología atípicas que se asocian con alteraciones genotípicas relacionadas con la selección de cepas resistentes a los antimicrobianos. En ocasiones las colonias de *S. pneumoniae* tienen un aspecto mucoso característicamente asociadas al serotipo 3.

1.3.2. Nuevas técnicas de diagnóstico

En general y como se ha comentado en el epígrafe anterior, el diagnóstico microbiológico tradicional de la neumonía adquirida en la comunidad presenta el inconveniente principal de la demora en la obtención de los resultados. En el caso de la infección

causada por *S. pneumoniae*, el diagnóstico precoz es particularmente importante, dada la alta mortalidad asociada a este tipo de neumonía [61, 62]. Asimismo, la demora en el diagnóstico condiciona el retraso en la instauración del tratamiento antibiótico y en la elección adecuada del mismo [63, 8]. Esta situación no solo genera la aparición de complicaciones graves sino que también influye en la selección de determinados clones multirresistentes [64].

La aparición de nuevas técnicas de laboratorio, denominadas “de diagnóstico rápido” y *point of care* para la detección de *S. pneumoniae* ha supuesto un avance en el diagnóstico etiológico de la neumonía adquirida en la comunidad, así como en la instauración adecuada del tratamiento antimicrobiano precoz. Es importante recordar que las técnicas de diagnóstico convencionales (tinción de Gram y cultivo) siguen constituyendo las pruebas de diagnóstico de referencia o *gold-standard* y que toda técnica de diagnóstico rápido debe ser confirmada con posterioridad con técnicas de diagnóstico tradicionales [56]. Entre las técnicas de diagnóstico rápido de la neumonía adquirida en la comunidad más empleadas se encuentran la inmunocromatografía para la detección de antígenos y las técnicas de diagnóstico molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1.3.2.1. Inmunocromatografía

Esta técnica se fundamenta en la detección del polisacárido C capsular de *S. pneumoniae* con propiedades antigénicas. Este antígeno es soluble en determinados líquidos o fluidos como la orina y el líquido cefalorraquídeo. El polisacárido C está presente como componente de la cápsula neumocócica independientemente del serotipo del microorganismo. También se encuentra presente en otras especies del género *Streptococcus* como son *Streptococcus oralis* y *Streptococcus mitis* [65]. El desarrollo de esta prueba se realiza sobre una membrana de nitrocelulosa a la que se encuentra adsorbido el anticuerpo específico frente al polisacárido C de *S. pneumoniae*. Al entrar en contacto el antígeno soluble presente en la muestra del paciente, este se conjuga con el anticuerpo específico, produciéndose una precipitación que puede observarse a simple vista sobre la membrana. Las muestras biológicas sobre las que se ha validado esta técnica son la orina y el líquido cefalorraquídeo. La recogida de ambas debe producirse según los procedimientos habituales establecidos y el transporte hasta el laboratorio debe realizarse en condiciones estériles. Estas muestras pueden almacenarse a temperatura ambiente (20-30°C) siempre y cuando vayan a procesarse para el análisis en un plazo máximo de 24h. Las muestras refrigeradas (2-8°C) o congeladas pueden conservarse un máximo de 14 días en el caso de la orina y de 7 en el caso del líquido cefalorraquídeo. A diferencia de la detección de antígeno de *Legionella pneumophilla* en orina, no se recomienda realizar centrifugación o calentamiento de la muestra antes de realizar su determinación. En algunos casos se ha demostrado la posible interferencia por la presencia de inmunoglobulinas no específicas de *S. pneumoniae* que también pueden unirse al antígeno y dificultar así su detección. Por ello se recomienda su uso sobre orina para el diagnóstico de neumonía comunitaria y sobre líquido cefalorraquídeo para el diagnóstico de meningitis. También es importante reseñar que el polisacárido C una vez excretado en orina es estable al menos 48h y puede ser detectado en pacientes bajo tratamiento antimicrobiano [66, 67]. Los datos de sensibilidad y especificidad de la técnica se recogen en la tabla 1.4.

Muestra	Tipo de pacientes	Valores diagnósticos	
		Sensibilidad(%)	Especificidad (%)
Orina	Pacientes hospitalizados	90 (60-98)	71 (59-80)
	Pacientes ambulatorios	90 (70-97)	78 (70-85)
Líquido cefalorraquídeo	Pacientes que acuden a servicio urgencias	97 (84-100)	99 (98-100)

Tabla 1.4: Sensibilidad y especificidad de la inmunocromatografía (BINAX Now[®])

En la interpretación de los resultados es importante tener en cuenta la posibilidad de encontrar resultados falsos positivos en pacientes que sean portadores nasofaríngeos de *S. pneumoniae* como es frecuente que ocurra en niños, de hecho la exactitud de la prueba no se ha demostrado en el caso de las determinaciones sobre orina en niños, aunque existen estudios con buenos resultados, en los que se emplea la inmunocromatografía en torundas nasales para realizar estudios de colonización [68]. También pueden ser causa de falsos positivos en casos de niñas con colonización vaginal con *S. pneumoniae* y en pacientes colonizados crónicamente por este microorganismo, como en la EPOC, la bronquitis crónica o pacientes con bronquiectasias [65]. La presencia permanente del microorganismo en el tracto respiratorio hace que la liberación del polisacárido C en orina sea relativamente constante y por tanto, fácilmente detectable aunque según los estudios hay discrepancias en los resultados obtenidos [69]. La vacunación también es un factor responsable de resultados falsos positivos por lo que no se recomienda realizar esta prueba a los individuos que hayan sido vacunados frente a *S. pneumoniae* en los cinco días previos.

En los pacientes adultos, diferentes estudios avalan la utilidad de esta técnica en el diagnóstico rápido de neumonía comunitaria tanto en los que no precisan ingreso hospitalario como en los que requieren hospitalización (en planta o en unidades de cuidados intensivos). También se han obtenido buenos resultados en enfermos inmunodeprimidos [70] y se propone su utilización en estos como método de diagnóstico precoz de neumonía con síntomas atípicos, que habitualmente se presenta en los pacientes con infección por VIH [71]. En los pacientes pediátricos se han llevado a cabo menos estudios, aunque los resultados también demuestran su utilidad. No obstante, hay que tener presente la posibilidad reseñada con anterioridad de falsos positivos debido a los estados de portador y de resultados no específicos debidos a *S. oralis* o *S. mitis* [65].

Existen varios estudios que avalan la utilidad de esta prueba en la detección de antígenos en muestras diferentes de la orina o el LCR como el líquido pleural, sobre todo en pacientes con empiema y derrame pleural. A pesar de ser una muestra para la cual la técnica no está plenamente validada se han señalado varias ventajas, entre las que destacan una elevada sensibilidad, incluso superior al cultivo convencional. También se ha demostrado su utilidad en pacientes en los que ha existido antibioterapia previa al empiema. Entre las desventajas se encuentran, no tratarse de una técnica validada y la falta de especificidad (igualmente reacción cruzada con polisacárido C de *S. oralis* y de *S. mitis* [66, 67, 72, 73]. También se ha intentado aplicar esta técnica sobre otro tipo de muestras como los hemocultivos, aunque esta aplicación necesita más estudios de validación (hemocultivos) [74]. Se ha descrito un método que permite detectar la presen-

cia de *S. pneumoniae* en muestras de esputo mediante inmunocromatografía. Detecta la presencia del polisacárido C mediante el reconocimiento con anticuerpos policlonales. Los datos de sensibilidad y especificidad son de 89,1 % y 95,3 % respectivamente y en comparación con la utilización de la inmucromatografía convencional en orina, parece ofrecer mejores resultados [75].

Los beneficios en la detección de *S. pneumoniae* utilizando esta técnica son evidentes para el paciente. A pesar del aumento del coste en el diagnóstico, ya que esta prueba no debe sustituir al cultivo, los estudios de coste-beneficio avalarían también su utilización ya que disminuiría el tiempo empleado en el diagnóstico y facilitaría una mejor adecuación del tratamiento antimicrobiano [76].

1.3.2.2. Técnicas de microbiología molecular

La técnica de microbiología molecular más empleada para el diagnóstico etiológico precoz de la neumonía adquirida en la comunidad es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Con esta técnica se puede detectar la presencia de material genético (ADN o ARN) de un microorganismo en la muestra de estudio. Según el tipo de técnica de PCR empleada es posible:

- amplificar material genético para su posterior identificación mediante comparación con secuencias de diferentes microorganismos almacenadas en bases de datos
- amplificar material genético específico de un microorganismo que sólo se encuentran presentes en el genoma de éste.

Asimismo, existen técnicas de PCR como la PCR en tiempo real que permite no solo detectar la presencia del microorganismo sino también cuantificar la cantidad de este [77]. En el caso de *S. pneumoniae* podrían utilizarse en muestras de LCR para el diagnóstico de meningitis pero también puede aplicarse en muestras del tracto respiratorio, incluyendo el líquido pleural [78].

Las ventajas principales que ofrecen las técnicas de microbiología molecular son la rapidez y elevada sensibilidad y especificidad cuando se comparan con el cultivo con independencia del tipo de muestra. Entre las limitaciones principales de estas técnicas se encuentran:

- Detección de fragmentos de ADN de microorganismos no viables en la muestra estudiada. Este hecho podría ser habitual en pacientes tratados previamente con antimicrobianos.
- Detección de microorganismos que no sean la causa directa del proceso infeccioso. En la neumonía, podrían existir en la muestra estudiada, ADN de *S. pneumoniae* procedente del tracto respiratorio superior o en los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica podría detectarse este microorganismo como colonizador de la superficie mucosa y ser otro el patógeno implicado en la neumonía.
- Dificultad de desarrollo de la técnica por interferencia de la reacción de PCR. No todas las muestras son igualmente idóneas para la realización de esta técnica. Como ejemplo, la presencia de una alta carga proteica (esputos, líquido cefalorraquídeo) presentan problemas de interferencias que disminuyen la sensibilidad de la técnica.

Las técnicas de PCR más empleadas en el diagnóstico de la neumonía comunitaria por *S. pneumoniae* y de sus complicaciones asociadas son la amplificación de 16s

ADN-ribosomal y la amplificación de genes específicos de *S. pneumoniae* como los que codifican para los genes de neumolisina (gen *ply*), autolisina (gen *lytA*), la adhesina de superficie (gen *psaA*) [79], y genes altamente conservados, que codifican para la síntesis de diferentes polisacáridos de la cápsula (los genes *cpsA* y *wzg*), incluyendo los que determinan los serotipos mediante utilización de sondas TaqMan específicas [49, 80].

También se ha evaluado la utilidad de la detección del gen de la neumolisina mediante una técnica de PCR en tiempo real en pacientes pediátricos con empiema y sospecha de infección por *S. pneumoniae*. Su aplicación en sangre y en el líquido pleural, aumentó el diagnóstico de esta entidad [78].

1.3.2.2.1. Amplificación de 16s ADN ribosomal Mediante esta técnica se amplifica el ADN ribosomal de la subunidad 16s. Este gen se encuentra en todas las bacterias. Posee fragmentos que son comunes a todas las especies bacterianas (se dice por ello que es un gen conservado) y también fragmentos que son específicos de cada especie. Gracias a los fragmentos comunes es posible amplificar el gen procedente de diferentes especies bacterianas que posteriormente se identificarán por secuenciación de los fragmentos específicos y comparación de éstos con las bases de datos existentes [81]. Esta técnica ha sido empleada y evaluada en algunos estudios para el diagnóstico etiológico de la neumonía comunitaria, del empiema y de la meningitis por *S. pneumoniae* 1.5 y existen sistemas comerciales para su aplicación clínica [78, 82].

Técnica	Muestra	Sensibilidad	Especificidad	Tiempo	Referencia
PCR tiempo real (<i>molecular beacon</i>)	Espudo	96,2 %	93,2 %	2h	31
PCR rDNA16s; PCR neumolisina	Líquido pleural	70 %	43 %	-	21
PCR neumolisina	Líquido cefalorraquídeo	96 %	100 %	4h	32

Tabla 1.5: Evaluación de las técnicas de PCR para diagnóstico de la infección por *S. pneumoniae*

1.3.2.2.2. Amplificación de genes específicos de *S. pneumoniae* La técnica de PCR permite amplificar y detectar genes que pueden ser específicos de grupos de microorganismos concretos o de especies concretas. En el caso de *S. pneumoniae* es particularmente importante dada la posible confusión en la identificación que puede producirse con otras especies muy cercanas filogenéticamente como *S. pseudopneumoniae*, *S. mitis* u otros estreptococos del grupo viridans, sobre todo en muestras respiratorias, en las que la relevancia clínica es menor [81].

Los genes que se detectan habitualmente como marcadores de la presencia de *S. pneumoniae* en la muestra de estudio son el gen de la neumolisina (*ply*) y el gen de la autolisina (*lytA*) [83, 84, 85]. Estos genes son altamente específicos de neumococo. Aún así, al existir la posibilidad de coexistir *S. pneumoniae* con otras especies del mismo género como especies del grupo viridans o *S. pseudoneumoniae* en el tracto respiratorio se pueden producir mecanismos de transferencia de material genético (transforma-

1.3 Técnica de hibridación fluorescente *in situ* o *fluorescent in situ hybridisation* (FISH) 23

ción natural) que provoquen la adquisición de genes o de fragmentos de genes específicos de neumococo en estas otras especies. Este hecho puede determinar errores en el diagnóstico etiológico mediante estas técnicas [81].

La identificación y detección de genes más específicos de *S. pneumoniae* como el gen *psaA* que codifica para la adhesina de superficie ha sido señalado como uno de los genes candidatos a utilizar [79] así como la detección de genes específicos de la cápsula de *S. pneumoniae* y que están altamente conservados, lo que implica que no están sometidos a procesos de transformación natural, como son los genes *cpsA* y *wzg* [49, 80]. Con ello se minimizaría la posibilidad de errores en la identificación de este microorganismo mediante estas técnicas [79, 80].

También se ha descrito la posibilidad de determinar no sólo la presencia del neumococo en muestras en las que el cultivo no es viable, sí no también su serotipo, mediante técnicas que combinan amplificación de los genes implicados en la síntesis de los polisacáridos que determina la estructura concreta de cada serotipo e hibridación de cada uno de ellos mediante sondas específicas (sondas TaqMan). Con esta técnica se consigue diferenciar los serotipos o serogrupos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F/A, 8, 9V/N/L, 14, 15B/C, 18C/B, 19A, 19F/B/C, 23A y 23F de muestras en las que el cultivo fue estéril [80].

1.3.2.3. Técnicas de PCR diseñadas para diagnóstico de *S. pneumoniae* a partir del hemocultivo Como ya se ha mencionado anteriormente, la toma de muestras de hemocultivo en los enfermos en los que se sospecha una neumonía comunitaria puede facilitar la confirmación del diagnóstico microbiológico, sobre todo si se produce el aislamiento de *S. pneumoniae*. Dada la importancia de la muestra de sangre se han desarrollado técnicas de PCR específicas y directamente aplicadas sobre ella sin necesidad de incubación aplicadas a la detección de microorganismos con gran relevancia patogénica, entre los que se encuentra *S. pneumoniae*. Entre ellas destaca el SeptiFast®. Este sistema utiliza la técnica de PCR en tiempo real detectando secuencia de DNA del 16s rRNA. El proceso completo, desde la preparación de la muestra hasta la emisión del resultado, puede desarrollarse en una 6-8 horas por lo que acorta sustancialmente el tiempo de respuesta. Los principales inconvenientes de esta técnica son los costos económicos de la misma y la especificidad en los resultados obtenidos [86]. Recientemente se han publicado también técnicas que combinan la amplificación y la utilización de microarray con buenos resultados tanto para la detección de *S. pneumoniae* [87] como para la determinación de los serotipos [88].

1.3.3. Técnica de hibridación fluorescente *in situ* o *fluorescent in situ hybridisation* (FISH)

Se basa en utilizar sondas de hibridación específicas para *S. pneumoniae* que reconocen las secuencias complementarias correspondientes al microorganismo sobre la muestra directamente. A su vez la sonda lleva un fluoróforo que emite fluorescencia cuando se observa al microscopio. La técnica se ha aplicado para la detección de *S. pneumoniae* en hemocultivos, siendo posible diferenciar neumococo de otros estreptococos y de *Abiotrophia* spp. o *Granulicatella* spp. [89].

1.3.4. Espectrometría de masas

Esta técnica se desarrolló inicialmente para identificar moléculas orgánicas de pequeño tamaño en el seno de mezclas complejas. Las variantes de la técnica que más se emplean como método de diagnóstico en microbiología son ES (*Electrospray*) y MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight*). Mediante radiación láser se ioniza una suspensión de los aislados a estudiar en una matriz específica, que se somete a un campo magnético lo que provoca que los iones liberados “vuelen” en diferente tiempo a lo largo de un conductor, en función de su tamaño y carga. El análisis de las señales de estos iones genera espectros complejos que son característicos del contenido molecular de cada bacteria y por tanto comparables entre aislados de la misma especie. Otra aplicación importante de esta técnica es el análisis de moléculas de ADN concretas, como podrían ser elementos de resistencia a los antimicrobianos. Esta técnica se ha empleado para diagnóstico clínico, aunque la identificación de estreptococos en general ha de realizarse siempre con apoyo de otras técnicas [90, 91], y como establecimiento de relaciones clonales en *S. pneumoniae* mediante técnicas de multi locus sequence typing (MLST) [92]. También se propone su aplicación para la identificación de serotipos [93] y de mecanismos de resistencia a β -lactámicos [94].

1.4. Virulencia

Desde su identificación como microorganismo patógeno, se describieron en *S. pneumoniae* estructuras químicas que se asociaron con su capacidad de inducir respuesta inmune tanto en humanos como en animales de experimentación. La identificación y descripción de los mecanismos de diferentes factores de virulencia en el neumococo constituye en los últimos años una línea importante de investigación, en los que los cambios epidemiológicos asociados a la disminución de la resistencia a los antimicrobianos no se asocia a una disminución en la incidencia y morbi-mortalidad de las infecciones invasivas, fenómeno que podría ser explicado por la expresión de diferentes factores de virulencia.

Entre los principales factores de virulencia asociados a la patogenicidad de *S. pneumoniae* se encuentran entre otros la cápsula polisacáridica, el ácido teicoico y lipoteicoico, la fosfatidilcolina y las proteínas fijadoras de colina (CBPs), la neumolisina, las bacteriocinas y los *pilli*.

1.4.1. Cápsula polisacáridica

La cápsula constituye uno de los factores de patogenicidad más importantes y conocidos en *S. pneumoniae*. Descrita por el propio Pasteur en sus observaciones al microscopio, su estudio en cuanto a la descripción química y purificación se impulsó dada la necesidad de implementar y mejorar la terapia serológica.

En este sentido se han analizado las estructuras moleculares de las cápsulas de diferentes serotipos, así como las diferencias entre las cápsulas de un mismo serogrupo. Entre las técnicas empleadas para el estudio de las cápsulas se encuentran la cromatografía gas-líquido y la espectrometría de masas. También se han estudiado con detalle

las rutas de síntesis, desde los mecanismos genéticos implicados hasta los operones reguladores del proceso, llegando incluso a describirse posibles inhibidores de la síntesis. [95]

La cápsula se compone de cadenas de polisacáridos, en las que tanto la naturaleza de los azúcares que la componen, como el tipo de unión química entre ellos define la estructura para cada serotipo. Está presente alrededor de toda la bacteria y es soluble en disoluciones polares, por tanto es soluble en suero y orina. Entre las funciones de esta estructura está la de mantener hidratada la célula y gracias a su naturaleza poli-aniónica modula la entrada y salida del microorganismo de iones y nutrientes, favorece la adherencia a superficies orgánicas e inorgánicas y está implicada, aunque existen otros mecanismos coadyuvantes, en la formación de biofilms. Con respecto a su contribución a la virulencia de *S. pneumoniae* la cápsula favorece la adherencia a las células epiteliales de la mucosa del tracto respiratorio superior e inhibe la fagocitosis por los macrófagos. Una vez invadidas las células, estimula la inmunidad humoral mediante la producción de anticuerpos específicos frente a los polisacáridos capsulares, es decir, específicos para cada serotipo. [96]

La primera cápsula estudiada en 1941 pertenecía al serotipo 3 y la primera publicación de estructuras genéticas publicada corresponde al año 1964, que se revisó y amplió en 1974. Se han publicado las organizaciones moleculares y rutas de síntesis de diversos serotipos, entre los que se encuentran algunos asociados a resistencia a diferentes grupos de antibióticos como son el 14, 19A [97, 98] o los descritos más recientemente 6C y 6D [10, 11].

En relación a los mecanismos genéticos que intervienen en la expresión de la cápsula, se ha comprobado que existen genes específicos para cada tipo capsular que están localizados en el cromosoma y siempre parecen ocupar la misma posición en éste. La homología entre estos genes no es elevada, incluso entre serotipos pertenecientes a un mismo serogrupo. Estos genes, son movilizables, gracias a la presencia de otros genes que codifican para transposasas, fosfomutasas y permeasas, y que, de este modo, intervienen en la transposición del módulo completo durante el proceso de la transformación. Este mecanismo es común en todos los aislados, independientemente del tipo capsular que expresen. Estos genes que interviene en la movilización de los genes específicos de cada tipo de cápsula en algunos casos están siempre ligados a los específicos (serotipo 19F) y se comportan como un *cassette*. Este *cassette* puede ser movilizado por transferencia horizontal, y mediante la transformación puede recombinar entre dos aislados de dos tipos capsulares diferentes, lo que da lugar al fenómeno de intercambio o *switching* capsular [99]. En algunos serotipos, como en el caso del serotipo 3 se ha comprobado que los genes implicados en la movilización y los del módulo que codifica para la cápsula están situados en regiones diferentes del cromosoma. Esto podría facilitar fenómenos de transposición dada en un mismo microorganismo, que explicaría la capacidad de producir en el laboratorio aislados de *S. pneumoniae* capaces de expresar dos tipos capsulares diferentes, los serotipos 3 y 1 y los serotipos 3 y 5. Finalmente, la regulación de la expresión de la cápsula está codificada por otro grupo de genes que no se encuentra ligado a los genes anteriormente mencionados [95].

1.4.2. Ácidos teicoico y lipoteicoico

Son moléculas de estructura polisacáridica que incluyen una cadena lipídica en su composición. Normalmente la unión de la zona lipídica se produce por un enlace fosfoéster a un grupo glicerol fosfato, en el caso de *S. pneumoniae* se une un ribitol fosfato que además lleva intercalados residuos de tetrasacáridos como componentes de la membrana, por tanto, la estructura molecular de estos compuestos en el neumococo es específica y diferente a la estructura en otras bacterias Gram positivas.

El ácido teicoico se describió por primera vez en 1930 como el polisacárido C soluble. Se encuentra tanto anclado a la pared celular, como expuesto en la superficie y presenta dos residuos de fosfatidilcolina, cuya implicación en la patogenicidad y virulencia de *S. pneumoniae* se explica más adelante. El ácido lipoteicoico se describió por primera vez en 1943, como el antígeno F ya que se describió como responsable de la llamada "antigenicidad de Forssman" que consiste en la inducción de la expresión de anticuerpos hemolíticos por parte del hospedador. Esta molécula sólo se encuentra en la superficie de la membrana citoplasmática y contiene un sólo residuo de fosfatidilcolina. Las estructuras moleculares de ambos compuestos se describieron finalmente en los años 90 [100, 101].

Además de comportarse como moléculas inductoras de la respuesta humoral, presentan otras propiedades como la activación de la cascada del complemento y la regulación de la distribución de las enzimas autolíticas (como la neumolisina) en la célula, para las cuales es imprescindible la presencia de colina.

Se ha comprobado también que la variación en la cantidad de ácido teicoico está implicada en las variaciones de fase de colonia de transparente a opaca, mediante la cantidad de colina presente en la superficie de la célula, ya que las variantes transparentes, que son las menos virulentas, incluyen mayor cantidad de este compuesto.

1.4.3. Fosfatidilcolina

La fosfatidilcolina es un compuesto que generalmente está presente en las células eucariotas y, a pesar de no encontrarse frecuentemente en las células procariotas, es un factor de crecimiento esencial para *S. pneumoniae*. Se ha comprobado que para algunas funciones fisiológicas de la bacteria, podría sustituirse por etanolamina (como en otras bacterias Gram positivas), pero hay procesos como la transformación o los mecanismos autolíticos para los cuales es imprescindible su presencia [102]. Este compuesto está expuesto en la superficie de la célula y genera la producción de anticuerpos específicos frente a él que en modelos animales confieren cierta protección frente a la infección. En un trabajo realizado en meningitis en modelos animales, se ha demostrado que en presencia de elevadas concentraciones de colina en el lugar de la infección, la progresión de la meningitis es mayor y tiene peor evolución, dada la mayor estimulación de la secreción de proteína C reactiva y de la secreción de mediadores de inflamación como son la interleucina (IL) 1 β , IL-6, IL-10 ó IL-12 [103].

Además del estímulo inmunitario, este compuesto está implicado en la adhesión y penetración en los neumocitos y células endoteliales del sistema respiratorio y en la actividad de diversas enzimas, conocidas como proteínas fijadoras de colina.

1.4.4. Proteínas fijadoras de colina (CBPs)

Son una familia de proteínas cuya característica común es que necesitan de la presencia de colina para actuar. Tienen diferentes funciones, ligadas a la patogenicidad y la virulencia del neumococo, entre ellas se encuentran las enzimas autolíticas y lisinas codificadas por fagos, las adhesinas y las proteínas de superficie [104].

1.4.4.1. Enzimas autolíticas

Estas enzimas intervienen en varios procesos celulares como la síntesis de la pared celular, la finalización de la división y separación de las células hijas, la movilidad de la célula y el desarrollo de la transformación genética. Estas enzimas están conservadas y pueden encontrarse en otras especies de estreptococos como el *S. mitis* [105], entre las enzimas más conocidas se encuentran la codificada por el gen *lytA*, con actividad amidasa y en cuya regulación interviene el ácido lipoteicoico mediante el mantenimiento de los niveles de colina, ya que a mayor concentración de colina, menor expresión de la enzima. Otras enzimas importantes en la fisiología de *S. pneumoniae* conocidas son las codificadas por los genes *lytB*, con actividad glucosaminidasa, y *lytC* con actividad lisozima [104].

1.4.4.2. Adhesinas

Las adhesinas son enzimas que expresa *S. pneumoniae* que se unen a receptores de las células del hospedador y que intervienen en los procesos de colonización, invasión de células y tejidos y evasión del sistema inmune. Algunas adhesinas se han llegado a considerar como posibles candidatas para el diseño de nuevas vacunas, ya que inducen respuesta inmunitaria. Entre estas se encuentran las adhesinas CbpA, CbpB, PspA que se unen a las células humanas activadas por citoquinas, se unen al ácido siálico y favorecen la invasión celular. También producen la activación del factor C₃ del complemento. Algunas de estas enzimas también tienen acción hialuronidasa, que degrada el tejido conectivo, y así se favorece también la invasión tisular [104].

1.4.4.3. Proteínas de superficie

Existen varias proteínas de superficie descritas, entre ellas una de las más conocidas es la proteína neumocócica de superficie A (PspA) y sus isoenzimas como la PspC. Estas proteínas se encuentran ancladas a la membrana externa gracias a la colina y poseen capacidad inmunogénica además de su capacidad virulenta, al estar directamente implicadas en la invasión de las células epiteliales del tracto respiratorio. Se ha observado que la colina tiene una función reguladora de la capacidad inmunogénica de estas proteínas, ya que cuando se produce un aumento de la concentración de colina en el medio, e la PspA se libera de la superficie celular. Existen otras familias de proteínas de superficie, como la SpsA, en las que una de sus funciones principales es unirse y bloquear la acción de las inmunoglobulinas secretoras, en este caso, de la inmunoglobulina A, favoreciendo así los procesos de colonización [104].

1.4.4.4. Neumolisina

Esta proteína se codifica por el gen *ply*, gen utilizado para la identificación a nivel molecular de especie de *S. pneumoniae*. La función fundamental de esta proteína es unirse a las moléculas de colesterol de las células eucariotas y producir poros en la membrana lipídica, con el efecto final de lisado de la célula, en especial a las células epiteliales del sistema respiratorio. [106]. También interfiere con las inmunoglobulinas solubles y produce activación del complemento por la vía clásica.

Existen estudios en los que se pone de manifiesto que los neumococos deficientes en neumolisina y en autolisina presentan una capacidad virulenta disminuida en modelos de infección del sistema nervioso central[107].

1.4.4.5. Bacteriocinas

Recientemente se ha asociado la producción de bacteriocinas en *S. pneumoniae* a determinados clones como son el Spain^{23F}-1 y el Spain^{9V}-3 y podría tener implicación en la prevalencia de estos clones frente a otros minoritarios [108]. Se ha identificado un gen directamente relacionado con la producción de estas moléculas, el gen *pnc*, pero parece ser un sistema complejo, con regulación de la expresión en el que deben estar implicados más genes [108].

1.4.5. Producción de *pilli*

La cápsula se ha considerado tradicionalmente el factor que más implicación tiene en la adherencia de *S. pneumoniae* a las células. Sin embargo existen estudios en los que se demuestran que las células no capsuladas de neumococo poseen también la capacidad de adhesión a las células y la capacidad de colonizar las mucosas. Esta capacidad la mantienen gracias a la expresión de *pilli*, en la que están implicados diferentes genes como el *rrrA*, el cual se ha demostrado que forma parte de una isla de patogenicidad que no se encuentra necesariamente en todos los aislados clínicos, aunque si se ha encontrado relacionado a clones concretos como los aislados pertenecientes a las ST156 y ST162 (MLST) que exhiben resistencia a la penicilina [109].

Se ha demostrado relación clonal en el análisis de las secuencias de *rrrA* y existen estudios en los que se relaciona la expresión de estos *pilli* con la disminución de la colonización concomitante con *S. aureus* [110].

Entre los genes descritos en la isla de patogenicidad anteriormente mencionada, se han encontrado genes que codifican para sortasas (*srtD*), cuya función consiste en enlazar las unidades de *pilli* al peptidoglicano y el gen *rrgC* que se intenta relacionar en diferentes estudios como marcador molecular de aislados que expresan *pilli*. Así por ejemplo, en diferentes estudios se ha observado que no existen diferencias significativas en la secuencia de este gen entre los aislados invasivos y no invasivos. También se ha demostrado que la presencia de este gen se asocia a determinados serotipos, por ejemplo, en aislados pertenecientes a los serotipos 4, 6B y 9V se encuentra más frecuentemente dicho gen, mientras que en aislados pertenecientes a serotipos cruzados como son el 6A, 9A, 9L ó 18C, 19A, 23A y 23B presentan de forma estadísticamente significativa menor presencia de dicho gen. Este tipo de asociación también se ha establecido

con respecto a los clones internacionales de multirresistencia. Así se encontró siempre el gen *rrgC* en aislados pertenecientes a los clones Spain^{9V}-3 (ST81), Maryland^{6B}-17 (ST384), Taiwan^{19F}-14 (ST236), Poland^{6B}-20 (ST315), Portugal^{19F}-21 (ST315) y North Carolina^{6A}-23 (ST376). En otros estudios también se observa cierta disminución de la presencia del gen *rrgC* paralelamente a la implantación de la vacunación [111].

1.4.6. Otros factores de virulencia

Existen otros factores o procesos en los que está implicado el neumococo que afectan a su virulencia, como son la variación de fase, la producción de neuraminidasas y hialuronidasas, las concentraciones de Ca^{2+} y Zn^{2+} , la inducción de la apoptosis o la formación de biofilm.

1.4.6.1. Variación de fase

Se trata de la capacidad que tiene *S. pneumoniae* para variar la expresión de las moléculas de superficie de forma que se observa diferente morfología de la colonia, de aspecto opaco a transparente y viceversa. Se ha observado que la fase transparente corresponde a neumococos que se encuentran colonizando las mucosas, mientras que cuando invaden las células, se aíslan células opacas. En este mecanismo se encuentran implicados diferentes genes que codifican para la expresión de las proteínas de superficie [104].

1.4.6.2. Neuraminidasas y hialuronidasas

Son enzimas que producen daño en el hospedador, las neuraminidasas se unen al ácido siálico de los glucolípidos y glucoproteínas de las superficies celulares y de los fluidos y así se favorece la invasión. Se ha observado que la expresión de estas proteínas es más frecuente en los neumococos que se aíslan de bacteriemias y de meningitis [112]. Existen múltiples isoenzimas y entre los genes implicados para su codificación se han identificado los genes *nanA* y *nanB*. La hialuronidasas favorecen también la invasión de las células y tejidos por degradación del tejido conectivo.

1.4.6.3. Exposición a Ca^{2+} y Zn^{2+}

Ambos iones están implicados en la regulación de funciones que están directamente relacionadas con la virulencia del microorganismo. El Ca^{2+} regula la competencia para la transformación y es activador de la autolisina LytA (autolisina). Por otra parte la concentración de Zn^{2+} está implicada en la regulación de la expresión de algunas CBPs como la PcpA. Existen estudios en los que tras tratamiento con Zn^{2+} preventivo se observa una disminución del riesgo de sufrir colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* [113]. Ambos iones están implicados en la regulación de la expresión de las proteínas PhtA, PhtB, PhtD y PhtE en la nasofaringe y a nivel pulmonar, que son necesarias para la inhibición del factor H de la cascada del complemento.

1.4.6.4. Inducción de apoptosis

El neumococo tiene la capacidad de estimular la producción de derivados activos de oxígeno en el lugar de la colonización, de forma que induce la apoptosis de otras especies que comparten nicho ecológico, lo que confiere una ventaja selectiva en la colonización. Se ha observado que el gen *spxB* está relacionado con estos mecanismos [114].

1.4.6.5. Formación de biofilm

El fenómeno de crecimiento en biopelículas ha sido ampliamente estudiado en modelos de colonización-infección en las infecciones respiratorias. *S. pneumoniae* se encuentra entre los microorganismos capaces de crecer en biofilms, dentro de una matriz cuya composición es mayoritariamente agua y mucopolisacárido donde consigue eludir los factores de defensa del huésped como la fagocitosis. Una característica particular de los microorganismos que crecen en biopelículas es que suelen ser resistentes a los antimicrobianos.

S. pneumoniae es capaz de crecer en biopelículas en mayor proporción en procesos infecciosos crónicos como la fibrosis quística o la EPOC [115] aunque en estudios en modelos animales se ha observado la formación de biopelículas también en procesos agudos como la otitis media aguda [116]. Entre los aislados procedentes de pacientes con enfermedades crónicas, se ha observado una mayor frecuencia de mutación, que se asociaría con el crecimiento de estos aislados en forma de biopelículas y sus elevadas tasas de resistencia [117].

Existen estudios que demuestran que en sangre el neumococo aumenta la expresión de neumolisina y proteínas de superficie que favorecen el crecimiento planctónico (no en biopelícula), sin embargo en el pulmón o las meninges, se favorece el crecimiento séstil [118]. El papel de la cápsula polisacáridica en la formación de biofilms es discutido. Parece ser que la formación de la cápsula está inhibida en las células que crecen dentro del biofilm (crecimiento séstil) [119]. En el caso de aislados con cápsula perteneciente al serotipo 3, se ha comprobado que los genes implicados en la formación de la cápsula dejan de transcribirse [120].

1.5. Esquemas de tipado en *Streptococcus pneumoniae*. Aplicaciones. *Pneumococcal molecular epidemiology network (PMEN)*

Dada la relevancia epidemiológica de la infección causada por *S. pneumoniae*, se han ensayado y puesto a punto diferentes esquemas de tipado, basados en características inmunológicas (aglutinación de la cápsula frente a sueros específicos), enzimáticas o moleculares. Así se consigue establecer relaciones de clonalidad o determinar la estructura poblacional de los neumococos con resistencia a los antibióticos o la dispersión clonal en determinadas infecciones y áreas geográficas, así como establecer las bases para el estudio del reemplazamiento clonal tras implementar políticas de vacunación.

1.5.1. Técnicas de tipado

1.5.1.1. Serotipado

Es la primera técnica que se utilizó para clasificar y agrupar los aislados de *S. pneumoniae*. Se basa en la capacidad que tiene la cápsula de aglutinar en presencia de antisueros específicos. Según esta técnica, se asigna un número en función del número del antisuero frente al cual la aglutinación haya sido positiva. Existen dos sistemas de nomenclatura: el americano y el danés. El sistema americano asigna números correlativos a los antisueros en función de la capacidad de aglutinación e independientemente de que algunos antisueros presenten reacciones cruzadas o difíciles de distinguir. El sistema danés, sin embargo, asigna números correlativos a los antisueros, pero establece grupos de antisueros según la capacidad de la reacción inmunológica, la cual se diferencia por letras, es decir, establece los serogrupos que agrupan a diferentes serotipos. Así por ejemplo, dentro del serogrupo 6 según el sistema danés, el serotipo 6A se corresponde con el serotipo 6 del sistema americano y el serotipo 6B del sistema danés se corresponde con el serotipo 26 del sistema americano, ya que fue descrito con posterioridad. El sistema más comúnmente empleado es el sistema danés.

La utilización de los serotipos como herramienta para clasificar y agrupar aislados de neumococo se ha usado desde el descubrimiento de la capacidad inmunogénica de la cápsula y ha servido para asociar determinados serotipos con características asociadas a la virulencia o a la resistencia a diferentes antibióticos. Así por ejemplo, diferentes estudios asocian los serotipos 1, 5, 7 y 14 con enfermedad invasiva, mientras que los serotipos predominantes en los estudios de colonización nasofaríngea son el 6, 18, 19 y 23.

Con respecto a las resistencias a los antibióticos, hasta el empleo de técnicas de tipado molecular, se asoció clásicamente la resistencia a β -lactámicos y macrólidos con los serotipos 14, 19 y 23 principalmente. En la actualidad, con la ayuda de las técnicas moleculares basadas en la amplificación y secuenciación de genes conservados (se exponen más adelante), podemos establecer relaciones de clonalidad entre aislados que pertenecen a serotipos diferentes, debido al fenómeno del intercambio o *switching* capsular.

Dado que las vacunas se diseñan en función de los serotipos que se asocian más con enfermedad o colonización, es necesario realizar estudios de serotipado a todos

los aislados de *S. pneumoniae* procedentes de muestras clínicas y, a su vez, realizar estudios de colonización, con objeto de poder hacer un seguimiento de la acción de la vacuna a nivel de la colonización inicial y poder estudiar fenómenos de re-colonización, co-colonización y reemplazamiento clonal.

1.5.1.2. *Multi locus enzyme electrophoresis (MLEE)*

Identifica las isoenzimas de enzimas que catalizan rutas metabólicas básicas (*housekeeping*) mediante su movilidad electroforética. Estas enzimas están codificadas por alelos del mismo gen, de forma que en un patrón electroforético, se observan pequeñas variaciones en tamaño y carga y se identifican “tipos electroforéticos”. A pesar de no tratarse de una técnica rápida y de ser muy laboriosa, ha sido referencia para el estudio de la clonalidad de poblaciones [121], y en caso de *S. pneumoniae* fue una técnica muy útil para el estudio de la dispersión clonal de los aislados multirresistentes pertenecientes al serotipo 23F [122].

1.5.1.3. *Patrón de digestión por restriction fragment length polymorphism (RFLP) de las proteínas fijadoras de penicilina (PBPs)*

Esta técnica ha sido utilizada para el estudio de poblaciones de *S. pneumoniae* resistentes a β -lactámicos, ya que la resistencia a este grupo de antimicrobianos está codificada por alteraciones en los genes que codifican para las proteínas fijadoras de penicilina (PBPs), en concreto de los genes *pbp1a*, *pbp1b*, *pbp2b* y *pbp2x*. Estas modificaciones consisten en sustituciones nucleotídicas que se alternan con fragmentos de secuencia correspondientes a los genes salvajes, generando estructuras en mosaico. Consiste en amplificar mediante PCR los genes implicados y utilizar diferentes enzimas de restricción para cada gen, de forma que en un gel de electroforesis se identifican diferentes patrones de restricción, que pueden corresponderse, como en caso del clon multirresistente del serotipo 23F, con clones previamente identificados [123]. Esta técnica también se ha utilizado para la detección de aislados resistentes a penicilina, procedentes de muestras clínicas [124] o de muestras que han sido estériles para el cultivo [125].

1.5.1.4. *BOX-fingerprinting*

Esta técnica se basa en hibridación mediante sondas específicas y transferencia a membranas de nylon (Southern blot) fragmentos de ADN que están altamente conservados y repartidos a lo largo del cromosoma conocidos como elementos BOX, y que, en el caso de *S. pneumoniae* hay unos 25 elementos BOX. Al tratarse de secuencias altamente conservadas, es necesario mucho tiempo para acumular variaciones [126, 127]. Una variante de esta técnica que se ha empleado para el tipado molecular de *S. pneumoniae* consiste en digerir con enzimas de restricción las amplificaciones de dichos fragmentos y observar el patrón electroforético de dicha digestión. Esta técnica se sigue empleando para el tipado molecular de aislados que proceden de poblaciones concretas [116].

1.5.1.5. *Ribotyping*

Mediante *southern blot*, se define el número de *loci* de los genes ribosomales (23s, 16s y 55rRNA) y su posición en el cromosoma bacteriano. Se trata de una técnica reproducible, pero su poder de discriminación es menor que el de otras técnicas actualmente empleadas como la electroforesis en gel por campo pulsado (PFGE). Se ha empleado en el estudio de la dispersión de neumococo resistente a penicilina mediante digestión con diferentes enzimas de restricción. Está recomendado para estudios epidemiológicos de largo tiempo y entre aislamientos de diferentes zonas geográficas [128, 129].

1.5.1.6. **Electroforesis en gel por campo pulsado (*Pulsed field gel electrophoresis*, PFGE)**

Consiste en la restricción por digestión enzimática del material genético y posterior separación de los fragmentos en un gel de agarosa en el que cada cierto tiempo – predeterminado– se cambia el ángulo de la orientación de los pulsos eléctricos. Las enzimas de restricción que se utilizan reconocen más de seis pares de bases de corte, de forma que se generan escasos fragmentos de ADN (habitualmente menos de treinta) de elevado peso molecular [130]. En el caso de *S. pneumoniae* esta técnica se ha empleado para el tipado de aislados resistentes a diferentes grupos de antibióticos y las enzimas habitualmente empleadas son *Apal* y *SmaI* resultando entre 10 y 19 fragmentos de restricción [131]. Sin embargo, en el caso de los aislados portadores de los genes *mef* los lugares de reconocimiento de estas enzimas, principalmente de la enzima *SmaI* coinciden con fragmentos de las secuencias de estos genes, de forma que la restricción no se realiza correctamente y los patrones de bandas no son adecuados. Para solucionar este problema, se emplea un esquizómero de *SmaI*, llamado *Cfr9*, con el que se obtienen digestiones adecuadas [132, 133].

El análisis de los geles se realiza visualmente, existiendo unos criterios para definir aislados indistinguibles, relacionados y no relacionados [134] y/o digitalmente empleando índices matemáticos siendo el más comúnmente empleado el coeficiente de correlación de Dice. Dado que un sólo evento de mutación puede dar lugar de cero a cuatro bandas de diferencia según el punto del cromosoma en el que ocurra, se sugiere aplicar la nomenclatura por subtipos, dentro de aislados que consideraríamos indistinguibles y relacionados, y tener siempre en cuenta los datos epidemiológicos de los aislados que se están comparando. Esta técnica tiene un poder de discriminación elevado, y es de referencia para comparar diferentes poblaciones, tanto eucariotas como procariotas. El inconveniente principal es la difícil reproducibilidad entre diferentes laboratorios y el tiempo necesario para obtener resultados [135].

1.5.1.7. **REP-PCR o amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las secuencias repetitivas palindrómicas (REP)**

Este método se basa en la amplificación de secuencias de ADN que se encuentran flanqueadas por secuencias repetitivas a lo largo del genoma y palindrómicas (elementos REP), que son la zona de unión de los oligonucleótidos o primers [136]. Así, el número de productos obtenidos es proporcional al número de elementos REP y por tanto, carac-

terísticos de cada especie, mientras que el tamaño de estos productos es característico de cada aislado y sirve para establecer relaciones filogenéticas [136]. En el caso de *S. pneumoniae*, esta técnica se ha empleado para identificar aislados que presentan diferente serotipo por intercambio (*switching*) capsular como aislados descendientes de un mismo antecesor [137, 98, 97]. Existe en el mercado un sistema semiautomático que se basa en esta técnica, cuya ventaja es que aporta un análisis informático de los geles y un servidor en el cual se depositan los resultados de cada laboratorio, de forma confidencial, desde el que pueden ser comparados aislados de diferentes zonas geográficas. Este sistema (DiversiLab[®]) se ha utilizado para establecer la clonalidad en aislados de *S. pneumoniae* pertenecientes a un mismo serotipo [138, 139] así como para establecer la clonalidad entre aislados resistentes a la penicilina [140]. No hay mucha experiencia en la interpretación de los resultados, por lo que se recomienda comparar el empleo de estas técnicas con otras como PFGE o MLST.

1.5.1.8. Espectrometría de masas

Como se mencionó anteriormente en el apartado 1.3.4, la técnica MALDI-TOF ha sido empleada para el tipado de *S. pneumoniae* procedente de muestras clínicas [92].

1.5.1.9. *Multi locus sequence typing* (MLST) y *multi locus restriction typing* (MLRT)

MLST es la variante genotípica de MLEE, ya que se trata de amplificar los genes conservados (*housekeeping*) que codifican para las enzimas empleadas en MLEE. Se amplifican y secuencian una porción de siete genes (*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt* y *ddl*) y a cada secuencia diferente del mismo alelo se le asigna un número correlativo según su descripción. A la combinación de números correspondiente a los siete alelos (perfil alélico) se le asigna a su vez un número que define la secuencia tipo (ST). Se define también el concepto de complejo clonal, formado por aislados a los que se les asigna diferentes STs, pero que tiene en común que el perfil alélico varía únicamente de la ST fundadora en un alelo (*single locus variant*) o en dos como máximo (*double locus variant*) y que derivan de ésta.

El esquema de MLST para *S. pneumoniae* fue de los primeros descritos en 1998 para aislados invasivos [141] y desde entonces ha sido ampliamente utilizado en diferentes zonas del mundo, sirviendo para relacionar STs y complejos clonales concretos con clones multirresistentes que se han dispersado mundialmente. El análisis de los datos mediante programas específicos como e-BURST permite establecer las relaciones clonales y distancias filogenéticas entre aislados pertenecientes al mismo complejo clonal, así como trazar la evolución de una determinada ST con relevancia clínica. Se trata de un método altamente reproducible, que permite la creación de bases de datos por los propios usuarios cada vez que se asigna un perfil alélico nuevo, y por tanto se describe una ST, de todas las perfiles alélicos y alelos depositados en internet (<http://spneumoniae.mlst.net>) (alrededor de 8.300 perfiles alélicos hasta el momento). La mayor desventaja es que se trata de una técnica de coste elevado, debido a la secuenciación que no es posible realizar por muchos laboratorios.

1.5.2. Aplicaciones de las técnicas de tipado

Son muchas las aplicaciones de los diferentes métodos de tipado de *S. pneumoniae*, clásicamente se han utilizado para establecer la clonalidad de los aislados resistentes a la penicilina, que se dispersaron por diferentes áreas geográficas durante las décadas de los ochenta y noventa, el estudio de los clones que colonizan la nasofaringe y de los que provocan infección, así como la comparación entre aislados de un mismo paciente, procedentes de colonización y de muestras invasivas. Aunque en caso de las infecciones causadas por *S. pneumoniae* es difícil hablar de brotes, mediante métodos de tipado se ha podido establecer que ciertas líneas clonales son las responsables de los escasos brotes descritos, así como estudiar la clonalidad de los aislados que en modelos animales, poseen alta capacidad patogénica.

Otras de las aplicaciones es la determinación de la estructura poblacional de grupos de aislados con características concretas de resistencia o epidemiológicas, así como su evolución en clones de multirresistencia o en su diversificación en diferentes patrones de resistencia.

1.5.3. *Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN)*

En 1997 se creó la red de epidemiología molecular de neumococo para estandarizar la nomenclatura y clasificación de los aislados estudiados mediante métodos de tipado y resistentes a diferentes grupos de antimicrobianos. En 2001 se describió por primera vez la nomenclatura de 16 clones de neumococo de dispersión mundial y multirresistentes tras el estudio de cada uno de ellos mediante PFGE, BOX-PCR y MLST [142]. Los criterios de inclusión de un clon en la red son:

- El clon se ha dispersado exitosamente en diferentes áreas del mundo (al menos debe estar presente en tres continentes).
- El clon está establecido durante un periodo de tiempo largo.
- Debe ser resistente a uno o más de los antibióticos usados normalmente en clínica.
- Deben publicarse datos epidemiológicos del clon previo a su inclusión en la red.
- Los clones deben proponerse para su inclusión en la reunión anual de la red.
- El aislado debe depositarse en la colección americana de cultivos tipo.

Según las características geográficas y de serotipo se define la nomenclatura de los clones: se utiliza el nombre del país o zona (sí el país es muy extenso, como en Estados Unidos o Rusia) donde se aisló por primera vez, seguido por el serotipo de ese primer aislamiento en superíndice y por el número correlativo asignado en la red o la secuencia tipo fundadora. Así el clon multirresistente Spain^{23F}-1, se aisló por primera vez en España, con el serotipo 23F y es el primer clon descrito en la red y se podría nombrar igualmente como Spain^{23F}-ST81, al ser su ST fundadora la ST81 (comunicación personal Dra. Mc.Gee).

1.6. Transformación y recombinación en *Streptococcus pneumoniae*

La transformación se define como la habilidad para captar ADN del medio. *Streptococcus pneumoniae* fue el primer microorganismo en que se describió en 1928 este proceso.

El neumococo, como todos los microorganismos que pueden realizar transformación, necesitan llegar al estado de “competencia” que se coordina entre las células por fenómenos de *quorum-sensing*, es decir, por comunicación entre ellas mediante determinadas moléculas, en este caso denominadas feromonas. La mayoría de las células se hacen competentes en el punto de la fase exponencial de crecimiento en el que se alcanza la concentración de células crítica.

La coordinación de la competencia, así como su dependencia de la densidad celular están condicionados, a su vez, por la secreción al medio de una proteína conocida como el factor de competencia (CF). Esta proteína fue la primera feromona descrita en bacterias [143]. Además se han descrito como factores importantes para alcanzar el estado de competencia la cápsula (en los neumococos capsulados el estado de competencia se alcanza con mayor dificultad), la concentración de iones de calcio en el medio, la concentración de albúmina y el pH.

Gracias a los estudios sobre esta feromona, se consiguió aislar y purificar un péptido estimulante de la competencia o CSP que se postula es el CF descrito inicialmente aunque éste podría ser una mezcla de péptidos. La acción de CSP sobre cultivos no competentes dura entre quince y veinte minutos. El factor CSP se expresa en la superficie de las células de forma que induce al resto de la población a producirlo [144]. Se ha comprobado que CSP es parte de una amplia familia de proteínas implicada en los procesos de *quorum-sensing* para la regulación de la competencia y que dichas proteínas están relacionadas específicamente con las especies de estreptococos pudiendo establecerse “ferotipos”. Así, en el caso de *S. pneumoniae*, las proteínas activadoras de la competencia son específicas para esta especie y se han descrito dos alelos *comC1* y *comC2* que codifican para dos CSPs con una similitud del 53% a nivel nucleotídico. Cada célula de *S. pneumoniae* posee receptores específicos para uno de los alelos [145], incluyendo los capsulados de los serogrupos 2, 3, 6, 9, 17, 18 y 19. La densidad celular en el medio está relacionada también con la concentración de CSP, por lo que parece que la síntesis de bacteriocinas también está implicada en estos procesos.

La síntesis de proteínas que posibilitan la captación de ADN del medio y la recombinación es codificada por el gen *comX*. Este sistema de regulación genético está implicado también en la capacidad que tienen las subpoblaciones de *S. pneumoniae* competentes, de activar los procesos de lisis en las subpoblaciones no competentes de un mismo medio de cultivo, para poder favorecer la salida de ADN al medio y captarlo por transformación.

Una vez que se ha captado ADN del medio, se engloba en el cromosoma celular mediante procesos de recombinación. Entre los genes implicados en la recombinación se encuentran los genes *recA* y *mmsA* y de los genes implicados en el sistema de reparación (*mismatch repair system*) *hexA* y *hexB*. La proteína codificada por el gen *mmsA* se encarga de abrir las dobles hélices, con un mínimo gasto de energía (ATP) ya que en los procesos de transformación y posterior recombinación es posible tomar cualquier ADN del medio, con el único requisito imprescindible de que esté en forma de cadena

sencilla. El gen *hexA* (con mayor actividad que el gen *hexB*) se encarga de corregir las incorrecciones en la secuencia cuando se incorpora DNA nuevo al cromosoma.

Para integrar la nueva secuencia al cromosoma, es necesario que una mínima parte de ésta tenga cierta homología (convergencia) con las zonas del cromosoma en las que va a insertar, para que las enzimas de recombinación la reconozcan. En caso de que no exista homología (divergencia) en principio no se podría dar la recombinación, ya que el *mismatch repair system* la inhibiría, sin embargo, en el caso de *S. pneumoniae*, este sistema no evita la transformación y recombinación interespecies, estos procesos se producen de forma independiente a la acción de *hexA* [146]. Por ello se producen estructuras “en mosaico”. Ejemplos de estructuras en mosaico son las secuencias que codifican para las proteínas fijadoras de penicilina (PBPs) alteradas, incorporadas por transformación de otras especies de estreptococos, que provocan que *S. pneumoniae* sea resistente a la acción de los antibióticos β -lactámicos; los aislados de *S. pneumoniae* resistentes a la optoquina, por incorporación de secuencias genéticas de otros estreptococos [147] o la evolución en los serogrupos que dan lugar a diferentes serotipos, así como la patogenicidad de ciertas especies de estreptococos no patógenos por captación de ADN del neumococo. Se calcula que durante la transformación el neumococo es capaz de incorporar de entre un 1 % y un 5 % de ADN (con respecto a su genoma).

Mediante los procesos de transformación se consigue que el genoma del neumococo posea una elevada plasticidad, considerándose un proceso adaptativo para reponer secuencias alteradas por mutaciones deletéreas por las secuencias presentes originalmente en la especie. Además, en el caso de *S. pneumoniae* es posible incorporar secuencias de especies diferentes que comparten nicho ecológico como puede ser la nasofaringe, y en el caso de tratarse de secuencias de especies poco relacionadas, dichas secuencias se pueden incorporar a especies relacionadas como *S. mitis*, *S. oralis*, *S. gordonii* o los estreptococos del grupo viridans, actuando como paso previo para la incorporación en *S. pneumoniae*.

Por otra parte, la recombinación homóloga puede dar lugar a mutaciones puntuales que impliquen a la expresión de los genes, generando alteraciones en las proteínas que pueden suponer cambios adaptativos y evolutivos como la modificación de las enzimas de unión a los β -lactámicos (PBPs) [148]. La incorporación de ADN nuevo puede darse entre genes unidos o entre genes separados, en el caso de darse entre genes separados, puede dar lugar a la adquisición de complejos multiproteicos. Por ejemplo, los segmentos BOX (elementos repetitivos altamente conservados) son suficientemente largos y con secuencias homólogas, por ello podrían estar implicados en reorganizaciones del genoma tras sufrir un proceso de transformación, de hecho, se ha comprobado que un fragmento de ADN lineal flanqueado por secuencias repetitivas (secuencias de inserción) se procesa con mayor facilidad por la maquinaria de la recombinación, lo que podría explicar el fenómeno de las cápsulas binarias, por adición de un cassette con secuencias de inserción correspondientes a los operones de los polisacáridos capsulares, de forma que se expresan la cápsula nativa de la célula y la adquirida por recombinación [149].

Finalmente, la inserción de ADN heterólogo siempre ocurre de forma simultánea a la delección de secuencias cromosómicas, de forma que la evolución del genoma es constante cuando se somete a procesos de recombinación.

1.7. Epidemiología y evolución de la resistencia a los antimicrobianos en *Streptococcus pneumoniae*. Multiresistencia

La primera resistencia detectada en *S. pneumoniae* fue frente a la optoquina (etilhidrocupreína) en 1912. En los ensayos en ratones, previos a la utilización en terapéutica para el tratamiento de la neumonía en humanos, se observó que los aislados procedentes de los ratones que previamente habían sido tratados con optoquina, eran resistentes a dicho antimicrobiano, es decir, se había seleccionado la resistencia in vivo. Cinco años más tarde se aisló una cepa de *S. pneumoniae* de un paciente, resistente a la optoquina [21]. Actualmente se conocen los mecanismos genéticos que confieren resistencia a la optoquina, basados en la aparición de mutaciones puntuales en el gen *atpC* que codifica para el segmento transmembranal de la subunidad c del complejo enzimático F₀F₁ H⁺-ATPasa que regula la concentración de iones H⁺ en el interior de la célula y por tanto, su pH y equilibrio osmótico [150]. Cabe resaltar que las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a la optoquina se aíslan en la actualidad tanto en muestras clínicas (0,6%) [151] como en muestras nasofaríngeas obtenidas para estudios de colonización (2%) [152].

1.7.1. Resistencia a β -lactámicos

En 1945 se publicó la aparición de aislados de *S. pneumoniae* con sensibilidad disminuida a la penicilina que habían sido cultivados en presencia de penicilina G en el laboratorio [153]. Sin embargo, fue en 1967 cuando se aisló el primer neumococo procedente de una muestra clínica de un paciente con hipogamaglobulinemia en Australia, y dos años después en Nueva Guinea, tratándose en ambos casos de aislados clasificados como "intermedios" según el criterio microbiológico de interpretación de los valores de CMI [154]. En 1977 se detectaron los primeros aislados de neumococo con alto nivel de resistencia a la penicilina, en Sudáfrica procedentes de muestras clínicas pediátricas y que, además presentaban resistencia a otros grupos de antibióticos [155].

En Europa, los primeros neumococos resistentes se detectaron en Hungría en 1975 y en los países de la conocida en aquella época como "Europa del Este" con porcentajes de resistencia cercanos al 30% mientras que en el resto del continente rondaban el 7% [156]. Con respecto a la zona Oeste del continente, los primeros aislados de *S. pneumoniae* resistentes a la penicilina se encontraron en España en la década de los ochenta, diseminándose clones que portaban dicha resistencia a los países cercanos (Francia, Portugal, Marruecos), pero no en otros países del continente como Alemania, Suecia o Dinamarca donde las tasas de resistencia a la penicilina durante los años ochenta se mantuvieron estables y bajas (0%-5% según países).

En Estados Unidos el primer caso de fracaso clínico por resistencia a la penicilina se detectó en un niño con meningitis en 1974 aunque ya en 1965 en Boston se detectaron dos aislados en un estudio de sensibilidad que recogía 200 cepas, con 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ de CMI para la penicilina. Desde la aparición de los primeros aislados resistentes, la resistencia a la penicilina se expandió en las décadas de los ochenta y noventa, debido a la dispersión de serotipos específicos que portaban estos mecanismos de resistencia. Se realizaron varios estudios para establecer qué serotipos eran los responsables de dispersar esta

resistencia, así como para establecer qué serotipos se encontraban principalmente en la nasofaringe de personas sanas, en estado de portador. Así se pudo establecer que los serotipos principalmente asociados a la resistencia a β -lactámicos en los portadores en aquel momento eran 6B, 19F y 19A, 23F y 14 y que las infecciones, principalmente otitis media, se producían en el transcurso de un mes tras la colonización de la nasofaringe por estos grupos [157]. Gracias a los estudios de epidemiología molecular (PFGE, MLST...) y a la creación de la red PMEN (*Pneumococcal Molecular Epidemiology Network*) se comprobó que la dispersión de la resistencia no sólo dependía del serotipo, si no de clones específicos entre los que podían estar representados diferentes serotipos debido a fenómenos de *switching capsular*. Por ejemplo es frecuente aislar cepas del serotipo 19A que pertenecen a clones establecidos, cuyos aislados patrón portan cápsulas de serotipos diferentes como 6B, 9V o 15 (clones Spain^{6B}-2, Spain^{9V}-3 o Sweden^{15A}-25) [158].

La resistencia en *S. pneumoniae* a β -lactámicos se produce por alteración de las proteínas fijadoras de penicilina, conocidas como PBPs (*penicillin binding proteins*) que catalizan diferentes pasos en la formación del peptidoglicano, los β -lactámicos forman una unión covalente con las PBPs dependientes de serina, así, cuando se producen alteraciones en la secuencia de los genes que codifican para las PBPs, se producen alteraciones en la estructura de la proteína de forma que estos antibióticos pierden afinidad por las proteínas y su acción disminuye, por tanto, son necesarias mayores concentraciones de antibiótico y, a su vez, se produce una disminución en la capacidad para alcanzar el estado de competencia para la transformación genética [159]. Se ha observado que estos mecanismos de resistencia no solo se transfieren entre clones de *S. pneumoniae*, sino que también se transfieren entre otras especies de estreptococos como *S. mitis* y *S. oralis* [148].

Se han descrito seis tipos de PBPs que se clasifican en función de su peso molecular, estimado en función de su secuencia aminoacídica 1.6 y se ha comprobado en mutantes de laboratorio que todas sus variantes son capaces de provocar disminución en la afinidad por los β -lactámicos. En los mutantes de laboratorio se generan mutaciones puntuales (no se han observado mutantes espontáneos) y únicamente en la PBP2x, pero en la naturaleza la adquisición de este tipo de resistencia se produce por transformación genética y la formación de genes en mosaico [160, 148].

Desde la aparición del primer aislado con sensibilidad disminuida a la penicilina en 1967, el número de aislados resistentes ha ido en aumento hasta la aplicación de la vacuna conjugada heptavalente (PCV-7). En Estados Unidos se aislaron cepas de neumococo con sensibilidad intermedia (CLSI previo al año 2008) entre los años 1979 y 1993, apareciendo el primer aislado resistente en 1993 y llegando a un pico de prevalencia de aislados resistentes entre los años 2000 y 2004. Desde este año, la resistencia a la penicilina (aislados tanto intermedios como resistentes) ha ido decreciendo progresivamente [47]. La tendencia en la disminución progresiva de la resistencia a la penicilina en aislados de *S. pneumoniae* procedente de enfermedad invasiva es similar en Europa según los datos recogidos por el *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* [161].

En España, según datos recogidos en el Centro Nacional de Referencia para *S. pneumoniae*, la resistencia a la penicilina aumentó de forma progresiva desde 1979 (6%) hasta 1989 (44,4%), continuó en aumento, pero de forma menos marcada desde 1990 (34,5%) hasta 1998 (43,7%) y comenzó a decrecer entre los años 1999 (33,9%) y el

Clase	Peso molecular	PBP	Efecto de las formas modificadas
A	80-90 kDa	1a	Confiere alto nivel de resistencia si hay previa modificación de las PBP de clase B
		1b	No existen datos suficientes para establecer el nivel de resistencia
		2a	Confiere alto nivel de resistencia si hay previa modificación de las PBP de clase B
B	82,3 kDa	2x	Bajo nivel de resistencia. Son necesarias para que se generen variantes de alto nivel de resistencia
		2b	Confiere bajo nivel de resistencia a penicilina. No está implicada en resistencia a las cefalosporinas de 3ª generación (cefotaxima)
C	48,2 kDa	3	Sólo se ha visto implicada en mutantes generados en laboratorio

Tabla 1.6: Clasificación de las proteínas fijadoras de penicilina según su peso molecular

año 2008 (22,3%) observándose un marcado descenso entre los años 2005 y 2008, inversamente proporcional al aumento de implantación de la vacuna PCV-7 empleada en España [162].

Esta disminución global de la resistencia, se asocia al reemplazamiento de serotipos tras la aplicación de la vacunación. En la vacuna heptavalente se incluyen los serotipos que clásicamente se han asociado con la resistencia a la penicilina también conocidos como serotipos “pediátricos” (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F). En diferentes estudios se ha observado una disminución global de éstos y un aumento progresivo de otros serotipos que colonizaban la nasofaringe y no se relacionaban tanto con procesos infecciosos. En Estado Unidos, los serotipos prevalentes antes de la introducción de la vacunación eran el serotipo 14 y el serotipo 6B, mientras que en la actualidad se mantiene el serotipo 14 y ha aumentado significativamente el serotipo 19A. En España la prevalencia de ciertos serotipos vacunales ha disminuido significativamente entre los periodos 1997-2001 y 2007-2008, sin embargo la prevalencia del serotipo 14 ha permanecido estable y también se ha observado un aumento significativo del serotipo 19A. Tabla 1.7 [163].

La prevalencia del serotipo 19A ha aumentado de forma general en todos los países, incluidos los países en los que el acceso a la vacunación no es universal. Este hecho, unido a que estos aislados no sólo son resistentes a la penicilina, sino que suelen llevar más resistencias asociadas (casi siempre a macrólidos y a algún grupo de antimicrobianos más) y que suelen pertenecer a un complejo clonal determinado (Taiwan^{19F}-14, inicialmente descrito en aislados pertenecientes al serotipo 19F) hace pensar que la vacunación ha sido un factor añadido a otros como el consumo elevado de antibióticos.

Cabe mencionar que, a pesar de tratarse del aumento más llamativo, no sólo el serotipo 19A ha aumentado entre los aislados resistentes a penicilina tras la introducción de la vacuna conjugada heptavalente. También se ha descrito mayor aparición de otros serotipos como el 1, 3, 5, 7F, 15A, 23A, 35B y el recientemente descrito 6C [162, 164].

Serotipo	Periodo	
	1997-2001	2007-2008
6B	16,7 %	0,0 %
9V	15,4 %	9,1 %
19F	13,7 %	7,3 %
23F	12,6 %	3,8 %

Tabla 1.7: Evolución de los serotipos vacunales (PCV7) que presentaron un descenso significativo tras la comercialización de la vacuna PCV7 en España ([163]).

Con la reciente introducción en el mercado de la nueva vacuna conjugada 13-valente que además de los serotipos incluidos en la vacuna heptavalente (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) incluye protección frente a los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F y 19A es de esperar que se observen cambios en la dinámica poblacional de *S. pneumoniae*.

Los clones que se identificaron como responsables de la dispersión de la resistencia a la penicilina en las décadas de los ochenta y noventa, fueron Spain^{23F}-1-ST81, Spain^{6B}-2-ST90, Spain^{9V}-3-ST156 y Sweden^{15A}-25-ST63. Tras la aplicación de la vacuna conjugada heptavalente, la prevalencia de estos clones ha disminuido significativamente [163] y a la vez que se observa un aumento de complejos clonales con secuencias fundadoras correspondientes a los clones anteriormente mencionados, es decir, la diversidad genética en estos aislados es mayor, de hecho se suele producir *switching capsular*, de forma que la mayoría de los aislados postvacunales pertenecientes al complejo clonal Spain^{9V}-3 portan la cápsula correspondiente al serotipo 14 [158].

1.7.2. Resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas

Los macrólidos contienen en su estructura química un anillo lactónico macrocíclico en cuyos sustituyentes se anclan desoxiazúcares o aminoazúcares. En función del número de átomos que componga el anillo lactónico se clasifican en

- Compuestos con anillo de 14 átomos, contienen normalmente dos azúcares, de los cuales uno de ellos es un aminoazúcar. En este grupo se clasifican la eritromicina, la claritromicina, la roxitromicina y la diritromicina (fig. 1.3).
- Compuestos con anillo de 15 átomos, se conocen como azálidos y el representante principal es la azitromicina (fig. 1.4).
- Compuestos con anillo de 16 átomos, presentan diferentes posibilidades en los azúcares sustituyentes. Los representantes de este grupo son josamicina, midecamicina, rokitamicina y espiramicina (fig. 1.5).

Los macrólidos se utilizan habitualmente para el tratamiento empírico de la infección respiratoria aguda comunitaria, generalmente como agentes de segunda elección en diferentes guías [165]. Los más empleados son claritromicina y azitromicina por sus características farmacocinéticas y por producir menos efectos secundarios que la eritromicina.

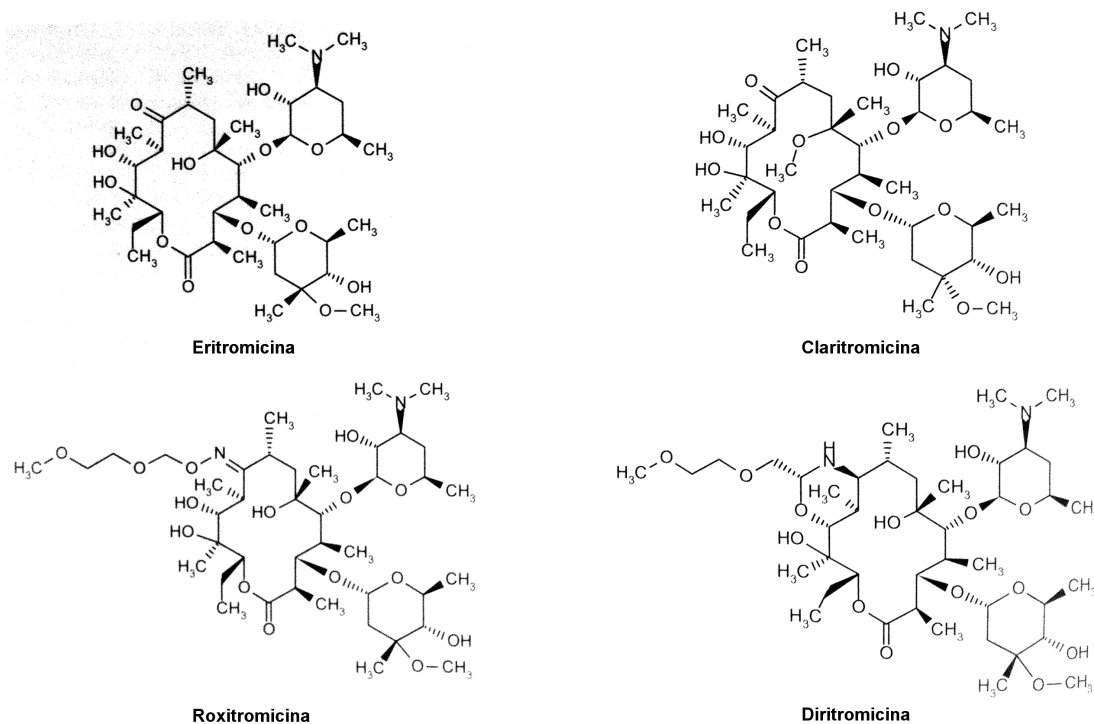


Figura 1.3: Macrólidos con anillo lactónico de 14 átomos

El mecanismo de acción de los macrólidos es la inhibición de la síntesis proteica por su unión al centro peptidil-transferasa del dominio V del ARN ribosomal 23s de la subunidad 50s del ribosoma bacteriano, esto impide la translocación y la cadena de aminoácidos en formación, que aún se encuentra unida al ARN, pasa del sitio aceptor (A) al donador (P) de forma que se impide el salto al siguiente codón de la cadena de ARN. Este sitio de unión es común para otros grupos de antibióticos como las lincosamidas (clindamicina), las estreptograminas (quinupristina/dalfopristina), el cloranfenicol y las pleuromutilinas [166].

Los mecanismos de resistencia a los macrólidos descritos son:

- Metilación del ARN ribosomal 23s por metiltransferasas. Estas enzimas metilan a nivel post-transcripcional el ARN ribosomal 23s de forma que se bloquea el sitio de unión de los macrólidos por cambios conformacionales. La monometilación origina resistencia cruzada a todos los macrólidos, la clindamicina y la estreptogramina B o dalfopristina, por tanto se dice que genera resistencia de fenotipo MLS_B que a su vez puede ser expresado de forma constitutiva, o ser inducible. La inducción es más eficaz en el caso de los macrólidos de 14 y 15 átomos ya que está relacionada con la clandinosa, mientras que los macrólidos de 16 átomos son malos inductores, llegando a ser activos en bacterias que son resistentes a otros macrólidos por estos mecanismos [166]. Estas enzimas están codificadas por los genes *erm*, en el caso de *S. pneumoniae* fundamentalmente el gen *erm(B)*, que codifica para una metilasa que actúa a nivel del residuo de adenina A2058 (numeración *E. coli*) en el dominio V del ARN ribosomal 23s, que puede expresarse de forma tanto constitutiva como

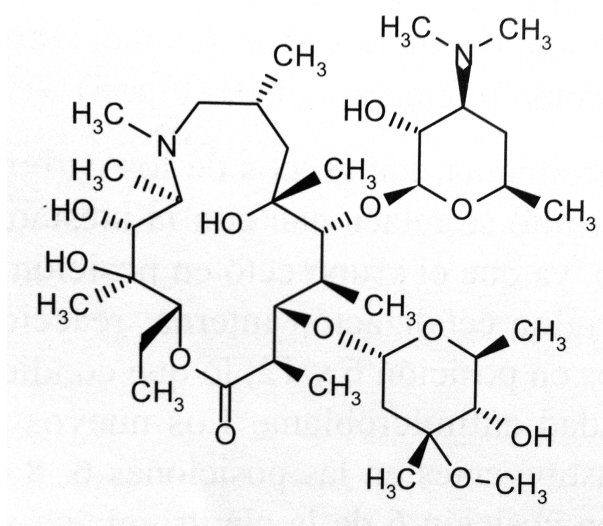


Figura 1.4: Azitromicina: macrólido con anillo lactónico de 15 átomos

inducible. Existen otros subtipos de genes *erm*, como *erm*(TR), *erm*(A) o *erm*(T), que a pesar de no haberse descrito en *S. pneumoniae* (ocasionalmente *erm*(TR), se han descrito en otras especies de estreptococos como *Streptococcus pyogenes* y estreptococos del grupo D [167].

- Mutaciones cromosómicas a nivel ribosomal en la secuencia del ARN ribosómico 23s de las proteínas L4 y L22. Dichas mutaciones están codificadas por los genes *rpD* y *rpN* y aunque este mecanismo de resistencia no se encuentra frecuentemente en aislados de *S. pneumoniae*, probablemente por la existencia de varias copias del operón *rrn* que codifica el ARN 23s ribosomal, sí se han descrito casos de fracaso terapéutico [168]. Los mecanismos MLS_B confieren alto nivel de resistencia a los macrólidos, pudiendo alcanzarse CMI mayores de 256 mg/L para la eritromicina. Se han descrito algunos aislados, con elevado nivel de resistencia que presentaban la combinación del gen *erm*(B) más mutaciones ribosomales en la proteína L4 [169].
- Expulsión activa: mediada por bombas de eflujo, que son sistemas de transporte ABC que se compone de dos subunidades, la subunidad transmembranal está codificada por los genes *mef*, mientras que la subunidad anclada en la parte externa de la membrana celular está codificada por el gen *mel*, también descrito como *msr*(D) [170]. Las bombas de eflujo sólo eliminan de la célula macrólidos de 14 (eritromicina, claritromicina, roxitromicina y diritromicina) y 15 átomos (azitromicina), y el fenotipo asociado se conoce como fenotipo M [166]. Aunque los valores de CMI para este tipo de aislados, están comprendidos, en general, entre 4-32 mg/ml (bajo nivel de resistencia) se han descrito fracasos terapéuticos [171].

Existen también diferentes variantes de los genes *mef*. La primera variante descubierta fue el gen *mef*(A) en *S. pyogenes*, que también se encuentra en *S. pneumoniae* y en otras especies de estreptococos. El gen *mef*(E) se describió poco después en *S. pneumoniae* y en otras especies de estreptococos, pero no

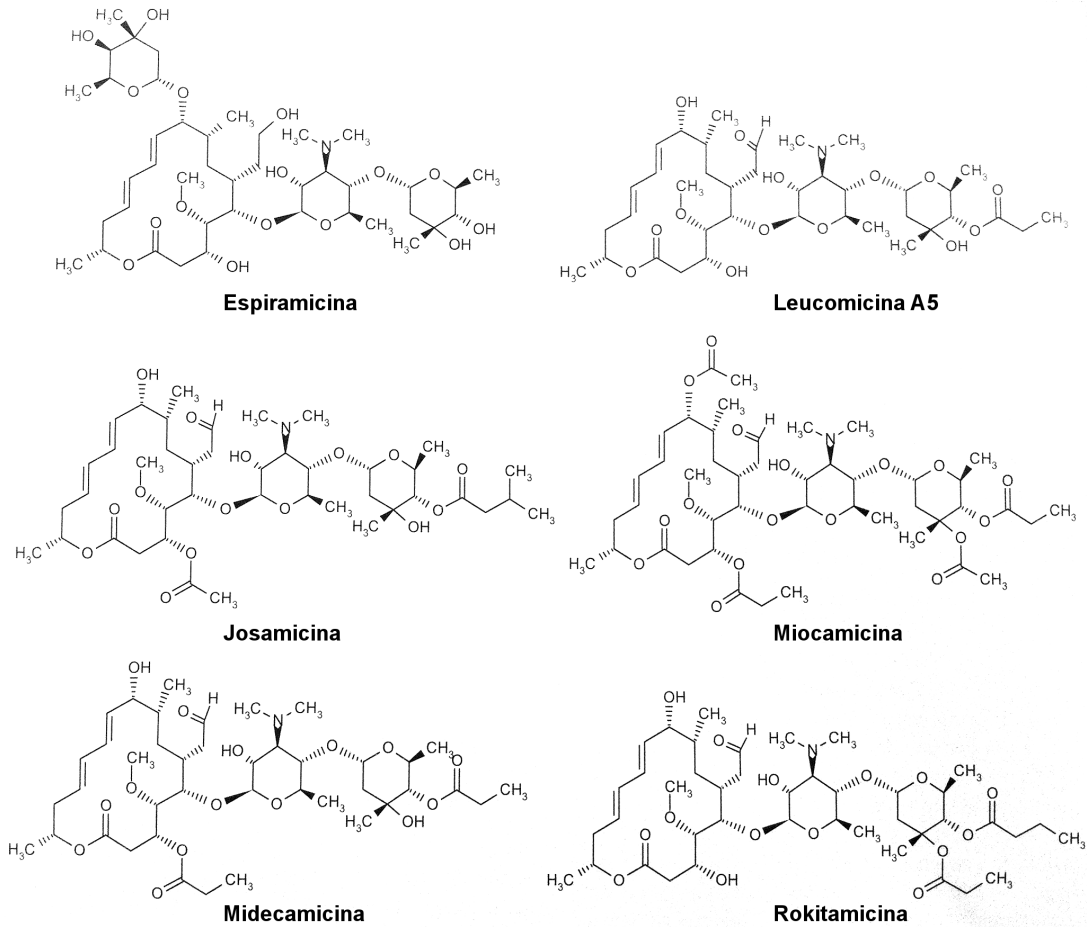


Figura 1.5: Macrólidos con anillo lactónico de 16 átomos

en *S. pyogenes*. Estos dos subtipos de *mef* son altamente análogas a nivel nucleotídico (91,6%) por lo que se sugirió que se consideraran como el mismo subtipo [172, 173] denominándose únicamente como gen *mef(A)*; sin embargo, los diferentes elementos genéticos en los que se transportan así como su diferente distribución entre las especies de estreptococos, fundamentalmente entre *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*, avalan la necesidad de discriminar entre ambos subtipos [174, 167]. Se han descrito otros subtipos de genes *mef*, mucho menos comunes como los genes *mef(l)* detectado en *S. pneumoniae* [175], *mef(O)*, detectado en *S. pyogenes* [176], *mef(B)* en estreptococos del grupo B y *mef(G)* en estreptococos β -hemolíticos del grupo G [177, 178].

En algunos trabajos realizados en neumococo se ha podido demostrar que los genes *mef* y *mel* se cotranscriben como un sistema dual, que puede ser inducible por eritromicina [179, 180, 181]. Además se ha demostrado que el segmento de la bomba codificada por *mel* puede expulsar de forma independiente macrólidos [181, 170].

- modificación enzimática del anillo por inactivación mediada por estererasas y fosfo-

rilasas codificadas por los genes *ere* y *mph(B)* respectivamente y que confieren resistencia a los macrólidos de 14 átomos o en el caso de las estererasas y a la espiramicina en el caso de las fosforilasas [167, 166]. A pesar de haber sido descrito inicialmente en microorganismos Gram negativos, también se han descritos en algunas especies de estreptococos, como *Streptococcus uberis* [182].

La resistencia a los macrólidos se observó por vez primera en Canadá en 1967, pero no empezó a aumentar hasta la década de los ochenta tras su utilización masiva de forma empírica como alternativa a la resistencia a los antibióticos β -lactámicos. En Estados Unidos se observó por primera vez en 1984, siendo responsable un mecanismo de metilación, ya que el aislado también era resistente a las lincosamidas. Hasta 1987 se detectaron esporádicamente este tipo de resistencias, y en 1989 se detectó el primer aislado con sensibilidad disminuida a eritromicina por la presencia de bombas de eflujo. Desde este momento, la resistencia a los macrólidos fue aumentando hasta un 55,6% en el año 2004, siendo predominantes los mecanismos de expulsión, ya que la resistencia a la clindamicina era baja, hasta que en año 2004 (ya introducida la vacuna PCV-7) alcanzó valores en torno al 40% [47].

En España y Europa los mecanismos de resistencia mediados por metilasas han sido predominantes frente a los mecanismos de expulsión. La prevalencia en Europa varía según zonas geográficas. En los países del norte como Suecia y Dinamarca es baja (inferior al 5%) en los países del centro y del sur como Alemania, Bélgica o Francia se alcanzan valores en torno al 30% [161].

En España la resistencia comenzó a aumentar a partir del año 1986 hasta el año 2001 con cifras en torno al 30%. Este aumento drástico estuvo influido por el uso indiscriminado de este tipo de antibióticos [163]. Tras la introducción de la vacunación y la implementación de medidas de control y uso racional de los antimicrobianos, la resistencia se redujo a un 22% en 2008. Entre los aislados provenientes de población pediátrica la disminución en los niveles de resistencia ha sido significativa, mientras que entre la población adulta se mantiene en torno al 20% [163].

Por último cabe destacar la emergencia de aislados de *S. pneumoniae* que portan más de un mecanismo de resistencia a los macrólidos, habitualmente los genes *erm(B)* y *mef(E)* [158, 183].

Los mecanismos moleculares que justifican estos fenotipos parecen deberse a la transferencia de genes de resistencia a macrólidos y a otros grupos de antibióticos mediante transferencia horizontal por transposones conjugativos, que se describirán más adelante.

1.7.3. Resistencia a las tetraciclinas

Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro, que se han empleado, sobre todo en sus formas orales, en los países desarrollados con mucha frecuencia antes de la aparición de los β -lactámicos en formulación de administración por vía oral y que se siguen empleando habitualmente en los países en vías de desarrollo. Además de presentar actividad tanto frente a bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, presentan la ventaja de ser relativamente baratas y no tienen efectos secundarios ni contraindicaciones, salvo en el caso de la población pediátrica en la que se pueden producir problemas en el esmalte dentario y en embarazadas. Se han descrito tres mecanismos principales de resistencia a las tetraciclinas

- Bombas de eflujo: este mecanismo se produce en microorganismos tanto Gram-positivos como Gram-negativos que presentan proteínas transmembranales codificadas por los genes *tet(A)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(K)*, *tet(L)* y *tet(P)* (según los microorganismos), que intercambian una molécula de tetraciclina con un protón, se trata por tanto, de un mecanismo de expulsión activa.
- Modificación enzimática del antibiótico: sólo descrito por el momento en bacterias del género *Bacteroides* spp.
- Protección ribosomal: codificado por los genes *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(P)* y *tet(Q)*. Es el mecanismo descrito en *S. pneumoniae* en el que se han descrito únicamente los genes *tet(M)* y *tet(O)* que codifican para proteínas que presentan elevada homología con los factores de elongación implicados en la síntesis de proteínas. El gen más prevalente en *S. pneumoniae* es *tet(M)*, mientras que la detección de *tet(O)* es esporádica ([184, 185]).

El primer aislado de *S. pneumoniae* resistente a la tetraciclina se aisló en Australia en 1963, en un niño con meningitis. Desde entonces la resistencia se ha dispersado mundialmente debido a la utilización frecuente de este antibiótico y a que los genes *tet(M)* se localizan en elementos móviles, concretamente en transposones conjugativos. Los transposones conjugativos implicados en la dispersión de este tipo de resistencias están relacionados con el transposón Tn916, de hecho se describe la familia Tn916, que está compuesta por transposones que derivan de éste ya que presentan alta homología de nucleótidos. Estas estructuras pueden encontrarse formando transposones conjugativos Tn916-like que son estructuras combinadas en las que unos transposones se introducen en la estructura de otras más complejas. Además de su capacidad de movilización entre bacterias, estos transposones suelen llevar asociados genes de resistencia a otras familias de antibióticos (tabla: 1.8).

	Transposón	Mecanismos de resistencia asociados	Antibióticos afectados
Familia Tn916	Tn1545	<i>erm(B)</i> , <i>aphA'</i> -3	MLS _B , aminoglucósidos
	Tn3703	<i>erm(B)</i>	MLS _B
Tn916-like	Tn3872	<i>erm(B)</i> (mediado por Tn917)	MLS _B
	Tn2009	<i>mef(E)</i> (mediado por MEGA)	Macrólidos
	Tn3701	<i>erm(B)</i> (mediado por Tn3703)	MLS _B
	Tn5252	<i>cat</i>	cloranfenicol
	Tn5253	<i>cat</i> (mediado por Tn5251)	cloranfenicol

Tabla 1.8: Ejemplos de transposones conjugativos que portan genes de resistencia a tetraciclinas y a otros antimicrobianos

La presencia de estas estructuras explicaría la frecuente asociación entre la resistencia a la eritromicina y la tetraciclina, en torno al 60 % en Estados Unidos y en torno al 80 % en Europa [186].

En algunos estudios que han estudiado los genes *tet(M)* de diferentes aislados que contenían diferentes transposones conjugativos, se han descrito patrones concretos (en función de la estructura nucleotídica del gen) para cada tipo de transposón, y en algunos

casos, estructuras en mosaico de los genes *tet(M)* [187].

Recientemente se ha introducido en terapéutica un derivado de tetraciclina, la tigeciclina. Estructuralmente se trata de una glicilciclina, y aunque entre las indicaciones no está el tratamiento de la neumonía adquirida en la comunidad, existen varios estudios que avalan su empleo en función de su seguridad y eficacia ya que presenta una buena actividad intrínseca frente a *S. pneumoniae* (CMI₉₀ 0,06 mg/L) resistente a β -lactámicos y macrólidos [188].

1.7.4. Multirresistencia

La asociación de resistencia a más de dos grupos de antibióticos en *S. pneumoniae* es relativamente frecuente. Lo más común es que se asocien resistencias a β -lactámicos y a macrólidos, que, como se mencionó anteriormente, está ligada a la resistencia a la tetraciclina. La resistencia simultánea a macrólidos y β -lactámicos comenzó a detectarse con mayor frecuencia en los años noventa y se ha extendido con éxito debido a la dispersión de clones que portaban resistencia a penicilina y que habían adquirido resistencia a los macrólidos mediada por transposones conjugativos, seleccionadas por el uso de dichos antibióticos [163]. En algunos estudios asocian una mayor proporción de aislados clasificados por punto de corte como resistentes a penicilina a los aislados que son además resistentes a macrólidos y tetraciclinas, mientras que los aislados clasificados como intermedios, sólo portarían resistencia a β -lactámicos [160].

Actualmente la resistencia combinada a penicilina y a macrólidos ha disminuido en algunos países de Europa como Francia (32 % en 2005 a 25 % en 2008) [161].

En España, la resistencia combinada a penicilina y macrólidos aumentó del 24 % en 1997 al 35 % en 2003 y tras la vacunación ha ido disminuyendo progresivamente hasta 11.5 % [163]. Este hecho puede deberse al efecto de la vacunación en la eliminación de los clones penicilina resistentes por eliminación de los serotipos más frecuentemente asociados a esta resistencia, y a la dispersión de clones como el Spain^{9V}-3 ST156, que se ha convertido en el más prevalente entre los aislados resistentes estudiados en el periodo postvacunal [158, 189] y a la expansión de aislados pertenecientes al serotipo 19A.

1.8. Elementos genéticos de resistencia a macrólidos en *Streptococcus pneumoniae*

Como se mencionó anteriormente, se han descrito elevados porcentajes de resistencia a eritromicina a nivel mundial. Este aumento de la resistencia y su mantenimiento a pesar de la aplicación de medidas como la vacunación, que han derivado en la disminución de la resistencia a otros antibióticos por disminución de serotipos que acumulaban diferentes resistencias, o del control y uso racional de los antibióticos, indica que la resistencia a este grupos de antimicrobianos además de diseminarse de forma clonal, se transfiere por mecanismos genéticos de transferencia horizontal, en concreto por elementos genéticos de transposición o transposones conjugativos.

1.8.1. Transposones que transportan los genes *erm* en *S. pneumoniae*

Existen varios transposones conjugativos que en su estructura incluyen los genes *erm*, fundamentalmente el gen *erm(B)* y *erm(TR)*. Se trata de estructuras que acumulan complejidad, factor que aporta plasticidad al genoma de *S. pneumoniae*. Se ha descrito que en los aislados en los que *erm(B)* se expresa de forma inducible, los elementos en los que se transporta son más conservados, mientras que en los aislados en los que dicho gen se transcribe de forma constitutiva, las estructuras en las que se transporta presentan alta variabilidad [167]. A continuación se hará una descripción de cada una de este tipo de estructuras.

1.8.1.1. Transposones que incluyen el gen *erm(B)*

1.8.1.1.1. Tn917 Se secuenció por primera vez en los años ochenta e inicialmente fue descrito como un plásmido no conjugativo de *Enterococcus faecalis* [190]. Su estructura (5.614 pb) contiene cinco orígenes de replicación (*open reading frame*, ORF) de los cuales, el *orf2* es el gen *erm(B)* y los *orf4* y 5 codifican para la resolvasa (*tnpR*) y la transposasa (*tnpA*) que son enzimas imprescindibles para la transposición de estos elementos entre diferentes bacterias [167] (ver fig. 1.6).

1.8.1.1.2. Tn3872 Se trata de un transposón conjugativo de 23,6 kb que se compone a partir de la inserción de Tn917 en el *orf9* del transposón Tn916, concretamente a nivel de la base 14.525 (número de acceso U09422). Por lo tanto este elemento combina la resistencia a la eritromicina por el gen *erm(B)* del transposón Tn917 y a la tetraciclina por el gen *tetM* del transposón Tn916 [191].

En *S. pneumoniae* no se ha podido demostrar la transferencia por transformación de este elemento, aunque sí se ha podido demostrar su transferencia por conjugación en *S. pyogenes* y de *Abiotrophia defectiva* a *E. faecalis* [167].

Estas estructuras (Tn917 y Tn3872) son las estructuras que se encuentran más frecuentemente en los aislados de *S. pneumoniae* portadores del gen *erm(B)* en Japón [192] (ver fig. 1.6).

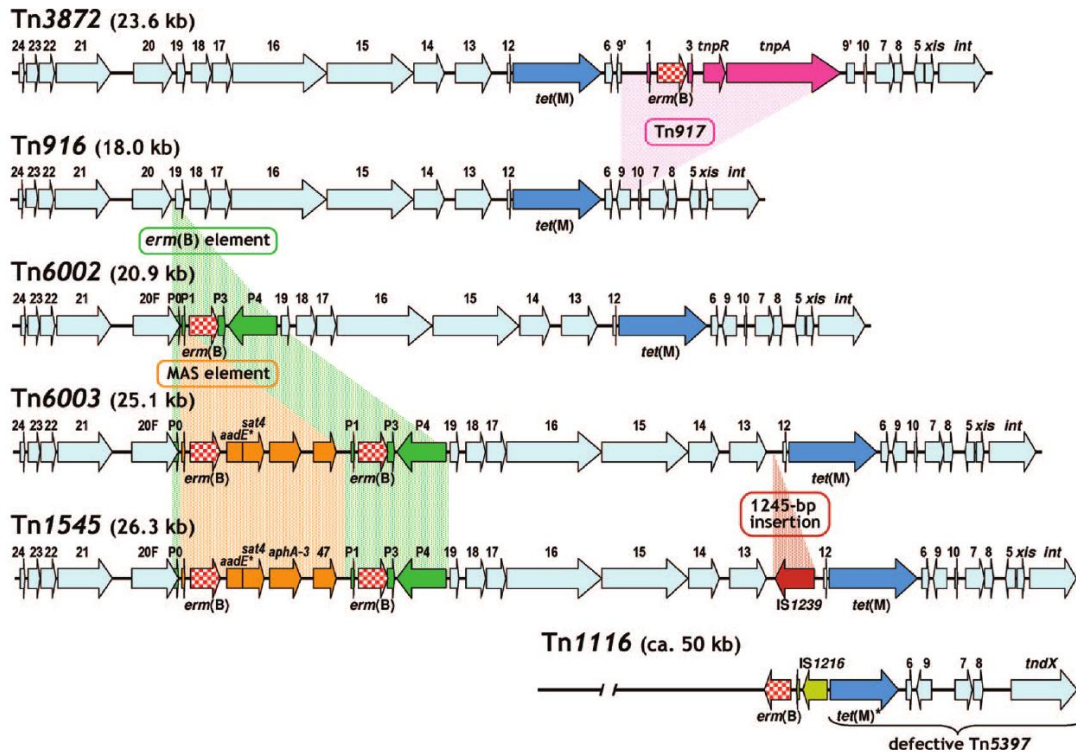


Figura 1.6: Trasposones conjugativos que incluyen Tn916 (modificada de la referencia [167])

1.8.1.1.3. Elemento *erm(B)* o “inserción transportadora de *erm(B)*” Se trata de un fragmento de 2.847 pb que contiene cinco ORFs, denominados de *orfP0* a *orfP4*, de los cuales el gen *erm(B)* es el *orfP2*, que se inserta en el *orf20* y el *orf19* de Tn916, concretamente en la base 3.847. En función de que dicha inserción lleve añadidos otros determinantes genéticos de resistencia a otros antibióticos, se definen diferentes composiciones de elementos entre los que se incluyen las estructuras denominadas

Tn6002 Se trata de una estructura de 20.880 pb que se puede detectar tanto en *S. pneumoniae* como en *S. pyogenes*, pero que tiene su origen en *Streptococcus cristatus* (AY898750). En este transposón se inserta únicamente el elemento *erm(B)* en el transposón Tn916. Se ha podido demostrar su transferencia en neumococo, pero sólo cuando los donantes eran *S. pyogenes*, no entre diferentes células de *S. pneumoniae* [193]. Este elemento, seguido por Tn3872, es el más encontrado entre los aislados procedentes de Italia y España en los que la resistencia a los macrólidos está mediada por el gen *erm(B)* [167] (ver fig. 1.6).

Tn6003 Es una estructura de 25.101 pb que se forma cuando sobre la secuencia de Tn6002 se inserta un elemento de 4.225 pb conocido como MAS (*macrolide-amino-glycoside-streptothricin*) a nivel del elemento *erm(B)*, en la posición 4.110 de Tn6002 entre *orfP0* y *orfP1*. Para que se produzca esta inserción, es necesario que exista una

delección de 222 pares de bases (con respecto a la secuencia de Tn916) tanto en el lado izquierdo (*upstream*) del elemento *erm*(B), como en el lado derecho (*downstream*) del elemento MAS.

El elemento MAS procede del plásmido pRE25 de *E. faecalis* y contiene en su secuencia de izquierda (*upstream*) a derecha (*downstream*) otro gen *erm*(B), sin codón de terminación y con su péptido líder, un conjunto de genes que confieren resistencia a los aminoglucósidos y a la estreptotricina (*aadE-sat4-aphA-3*) con una delección de 551 pb en *aadE* y un ORF homólogo al *orf47* del plásmido pRE25. En *S. pneumoniae* el gen *erm*(TR) es poco común, pero se asocia a un transposón, Tn1806, que se compone de una combinación entre transposón y profago provenientes de *S. pyogenes* y que es capaz de insertarse en el ORF homólogo al spr0790 del aislado *S. pneumoniae* R6 [167].

Por tanto la dispersión del transposón Tn6003 confiere resistencia al grupo MLS_B, a la tetraciclina, a la kanamicina y a otros aminoglucósidos con estructura química derivada de ésta. Este elemento no ha podido transferirse en experimentos de laboratorio entre *S. pneumoniae*, pero sí se ha podido realizar dicho experimento entre un neumococo donador y un enterococo receptor [193].

Cabe destacar que el elemento MAS sólo se ha podido describir en *S. pneumoniae* y que en los estudios de prevalencia de este tipo de estructuras, el transposón Tn6003 es el tercero más prevalente, tras Tn6002 y Tn3872 [167] (ver fig. 1.6), aunque recientemente se ha descrito que el transposón Tn6003 puede “perder” el elemento MAS mediante un proceso de excisión espontánea y transformarse por tanto en el transposón Tn6002 [194].

1.8.1.1.4. Tn1545 Este transposón fue el primero que se describió en *S. pneumoniae*, que portaba el elemento *erm*(B) y multirresistencia [195, 196]. Se demostró su capacidad para ser transferido por conjugación entre diferentes especies de microorganismos Gram-positivos, pero sólo se estudiaron regiones concretas del transposón por mapas de restricción. Entre las regiones que se estudiaron estaban su parte final, el elemento *erm*(B) y la región que incluye los genes de resistencia *aadE-sat4-aphA-3* y la integrasa (*int*) y la excisionasa (*xis*) que están estructuralmente relacionadas con las de la familia Tn916 [167].

En un estudio realizado en el año 2008, se describieron dos regiones más del transposón demostrando una gran similitud entre Tn1545 y Tn6003 ya que, se ha encontrado una estructura análoga (99,7 % de homología a nivel nucleotídico) al elemento MAS de Tn6003 (AM903082). La única diferencia entre ambos transposones es la inserción de un fragmento de 1.245 pb entre los ORFs *orf13* y *orf12*, a nivel de la base 18.833 (numeración de la secuencia de Tn6003) que codifica para la secuencia de inserción IS1239 (AM889142) [197] (ver fig. 1.6).

1.8.1.1.5. Tn2010 Esta estructura de 26.390 pb es el resultado de la inserción de una variante del elemento MEGA (se describirá más adelante) que contiene el gen *mef*(E) en la posición 17.014 de Tn6002 (AB426620) [198, 199] (ver fig. 1.6).

1.8.1.1.6. Tn1116 Se trata de un transposón en el que la inserción de *erm*(B) se realiza en la secuencia que codifica para *tetM* (base 15.019) en el transposón Tn5397.

El transposón Tn5397 pertenece a la familia de Tn916, pero se diferencia de este último en que en lugar de portar los genes *int* y *xis* (integrasa y excisionasa) porta el gen *tndX* que codifica para una resolvasa. Además este transposón (Tn5397, AF333235) se aisló originalmente en *Clostridium difficile*.

Tras la inserción de *erm*(B) en esta secuencia, toda la región *upstream* del transposón se pierde (y por tanto la resistencia a la tetraciclina) y se ha comprobado que la región situada entre *erm*(B) y *tndX* codifica para una secuencia de inserción descrita en enterococo (IS1216). A pesar de que este transposón (Tn1116) por el momento se ha descrito únicamente en *S. pyogenes*, un elemento similar se ha descrito en *S. pneumoniae*. La única diferencia es que la expresión de *tet*(M) no está truncada, y por tanto estos aislados mantienen la resistencia a la tetraciclina [200, 201] (ver fig. 1.6).

1.8.1.1.7. Otras estructuras Se han descrito ocasionalmente otras dos estructuras relacionadas con Tn916. Se trata de dos estructuras no móviles, con organizaciones que sugieren fenómenos de recombinación antigua y que no poseen *tet*(M), pero si portan Tn917 y en un caso una estructura completa de MAS y en el otro una estructura incompleta de MAS [193].

1.8.1.2. Transposones que incluyen el gen *erm*(TR)

En *S. pneumoniae* el gen *erm*(TR) es infrecuente, pero se asociado a un transposón, Tn1806, que se compone de una combinación entre transposón y profago provenientes de *S. pyogenes* y que es capaz de insertarse en el ORF homólogo al *spr0790* del aislado *S. pneumoniae* R6. [167].

1.8.2. Transposones que transportan los genes *mef* en *S. pneumoniae*

Como se mencionó anteriormente, a pesar de la gran homología a nivel nucleotídico que presentan los genes *mef*, los elementos en los que se transportan son muy diferentes y esto mismo justifica su determinación y caracterización a nivel de subtipo. Los principales elementos que transportan los genes *mef* se describen a continuación.

1.8.2.1. Elementos que transportan el gen *mef*(A)

La primera estructura descrita que portaba el gen *mef*(A) era una estructura cromosómica llamada Tn1207.1 (7.244 pb) que se describió en neumococo. Se considera un transposón defectivo ya que se encuentra truncado el extremo 5' a nivel de su *orf8*. Se compone de ocho ORFs: *mef*(A) y *msr*(D) son los *orf4* y *orf5* respectivamente. *orf2* es un lugar de reconocimiento para recombinación entre bacterias Gram-positivas y los *orf6*, *orf7* y *orf8* son análogos (50 %) a tres ORFs del transposón Tn5252 de neumococo. En experimentos en el laboratorio, se ha podido demostrar la transferencia de este elemento mediante transformación [202]. Tn1207.1 se inserta en un lugar específico del cromosoma, en *ceiB*, que es un gen que codifica para obtener el estado de competencia. Por ello, los neumococos que portan el transposón Tn1207.1 son incapaces de transformar, lo que podría explicar la baja prevalencia de este transposón en *S. pneumoniae*.

1.8.2.2. Elementos que transportan el gen *mef(E)*

1.8.2.2.1. MEGA (Macrolide Efflux Genetic Assembly) Este elemento, de 5.532 pb se compone de cinco ORFs que son muy similares a los cinco últimos ORFs de Tn1207.1. *mef(E)*, que es homólogo a *mef(A)* de Tn1207.1 en un 91,6% es el *orf1* y *mel* [también descrito como *msr(D)*] es el *orf2*. Los otros tres ORFs presentan alrededor de un 50% de analogía con tres ORFs del Tn5252. Entre *mef(E)* y *mel* existe una región intergénica de 119 pb que contiene una secuencia *Shine-Dalgarno*. Se ha podido demostrar que los genes *mef(E)* y *mel* se cotranscriben de forma conjunta.

Este elemento presenta cuatro variantes, relacionadas con los lugares de inserción en el cromosoma de *S. pneumoniae*, las más diseminadas son las variantes II y IV que presentan una delección de 99 pb en la región intergénica entre *mef(E)* y *mel* con respecto a las variantes I y III. La variante I se estudió primero y es la depositada en la base de datos GeneBank (AF274302). Este elemento ha podido transferirse entre células de *S. pneumoniae* en experimentos de laboratorio por transformación [180].(Ver fig. 1.7).



Figura 1.7: Elemento MEGA

1.8.2.2.2. Derivados de MEGA Un derivado descrito en *Streptococcus salivarius* con capacidad de transformarse en el laboratorio a *S. pneumoniae* se caracteriza por tener una secuencia muy similar (5.511 pb) pero que incluye un *orf6* entre el *orf4* y el *orf5* de MEGA [203]. Existe otra variante de este elemento, que además añade un *orf7* *upstream* de *mef(E)* es la variante de MEGA que se encuentra en el transposón Tn2009 de *S. pneumoniae* que se describe a continuación.

Tn2009 y Tn2010 Tn2009 (23,5 kb) es una transposón derivado de Tn916 que se origina al insertarse el derivado de MEGA anteriormente mencionado en el *orf6* (en la posición 14.166) de Tn916, mientras que Tn2010 (23.390 pb) se origina por la inserción del mismo derivado de MEGA en la misma posición de Tn916, sólo que sobre una estructura de Tn6002. En el laboratorio, únicamente Tn2009 ha podido ser transformado entre células de *S. pneumoniae* [198, 199, 204].(Ver fig. 1.8).

1.8.2.3. Elementos que transportan el gen *mef(I)*

El gen *mef(I)* posee un 91,4% de homología con el gen *mef(A)* y un 93,6% de homología con el gen *mef(E)* y es transportado en una estructura en principio no móvil, de 30.505 pb que contiene 13 ORFs, llamado 5216IQ complex. Este elemento se compone de fragmentos de Tn5252 y de Tn916 en su lado 5', y en la región 3' contiene el gen

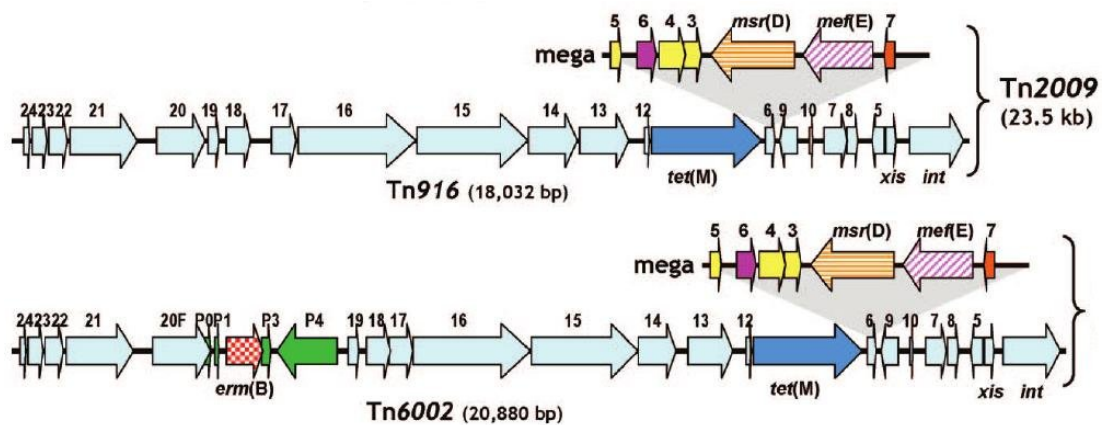


Figura 1.8: Derivados de MEGA (modificada de la referencia [167])

mef(I) que es el *orf7* y una variante a su lado del gen *msr(D)* que es el *orf8*. Los *orf1* y *orf13* son dos transposasas idénticas y el *orf12* es el gen *catG* que codifica para una cloranfenicol acetiltransferasa que confiere resistencia al cloranfenicol [205]. En la tabla 1.9 se muestra un resumen de los elementos anteriormente descritos.

Elemento	Resistencia a macrólidos		Tamaño (pb)	N° acceso GeneBank	Resistencia asociada
	Gen	Fenotipo			
Tn917	<i>erm(B)</i>	iMLS _B ; cMLS _B	5.614	M11180	-
Tn3872	<i>erm(B)</i>	cMLS _B	23.600	U09422	<i>tet(M)</i>
Tn6002	<i>erm(B)</i>	cMLS _B	20.880	AY898750	<i>tet(M)</i>
Tn6003	<i>erm(B)</i> ^a	cMLS _B	25.101	AM410044	<i>tet(M)</i> , <i>aadE</i> , <i>sat4</i> , <i>aphA-3</i>
Tn1545	<i>erm(B)</i> ^a	cMLS _B	26.300	X04388; X05577; X61025; X52632; AM889142; AM903082	<i>tet(M)</i> , <i>aadE</i> , <i>sat4</i> , <i>aphA-3</i>
Tn2010	<i>erm(B)</i> , <i>mef(E)</i> , <i>msr(D)</i>	cMLS _B	26.390	DQ426906; DQ426907; EF592165; AB426620	<i>tet(M)</i>
Tn1806	<i>erm(TR)</i>	iMLS _B	56.00	EF469826	<i>orf3</i> , <i>orf4</i> , <i>orf6</i> ^b
Tn1207.1	<i>mef(A)</i> , <i>msr(D)</i>	M	7.244	AF227520	-
MEGA	<i>mef(E)</i> , <i>msr(D)</i>	M	5.532	AF274302	-
Tn2009	<i>mef(E)</i> , <i>msr(D)</i>	M	23.500	AF376746	<i>tet(M)</i>
5216IQ complex	<i>mef(I)</i> , <i>msr(D)</i>	M	30.505	AJ971089	<i>catQ</i> , <i>tet(M)</i>

^a: doble copia del gen *erm(B)*

^b: *orf3* y *orf4*: resistencia a tetranosina; *orf6*: resistencia a espectinomicina

Tabla 1.9: Elementos genéticos de transferencia relacionados con la resistencia a los macrólidos en *S. pneumoniae*

Objetivos

*“La formulación de un problema,
es más importante que su solución”*

Einstein

2 Objetivos

Streptococcus pneumoniae constituye un patógeno relevante en la patología infecciosa. Asimismo, es paradigma en el estudio de la evolución de la resistencia a los antimicrobianos y en el estudio de la estructura poblacional en los que la utilización de los antimicrobianos y la implantación de políticas de vacunación han determinado modificaciones relevantes en los últimos años. El presente trabajo está encaminado a analizar la relación entre resistencia y clonalidad en *S. pneumoniae*, utilizando como modelo y ejes principales la resistencia a los macrólidos, el análisis de la estructura poblacional mediante las técnicas de MLST y repPCR así como de las estructuras genéticas que vehiculizan los genes de resistencia a los macrólidos. Los objetivos del presente trabajo han sido:

1. Determinar la resistencia a los macrólidos entre los aislados de *S. pneumoniae* de origen no invasivo y de hemocultivos, obtenidos en dos periodos de tiempo diferentes (colección prevacunal recogida entre 1999 y 2003 y colección obtenida en la época en que la vacuna conjugada heptavalente estaba implantada, entre los años 2000 y 2007).
2. Determinar las resistencias asociadas a otros antibióticos entre los aislados de *S. pneumoniae* resistentes a los macrólidos.
3. Describir los genes y fenotipos de resistencia asociados a los macrólidos así como a la tetraciclina entre los aislados seleccionados.
4. Determinar la estructura poblacional de los aislados de *S. pneumoniae* con amplificación positiva para los genes *mef* mediante diferentes técnicas de tipado.
5. Evaluar la aplicación del sistema semiautomático DiversiLab[®] para el tipado de aislados de *S. pneumoniae* resistentes a los macrólidos.
6. Emplear diferentes índices matemáticos para medir la diversidad genética y la distribución de esta en los aislados de *S. pneumoniae* resistentes a los macrólidos.
7. Determinar la presencia de elementos derivados de Tn916 en los aislados de *S. pneumoniae* resistentes a los macrólidos.

Material y métodos

*“Todo el método consiste en el orden
y disposición de aquellas cosas hacia
las cuales es preciso dirigir
la agudeza de la mente
para descubrir alguna verdad”*

Descartes

3 Material y métodos

3.1. Microorganismos estudiados

Los aislados de *S. pneumoniae* seleccionados para este estudio fueron recogidos de muestras clínicas procedentes de dos colecciones obtenidas durante diferentes períodos de tiempo y con orígenes clínicos diferentes.

3.1.1. Aislados prevacunales

Esta colección comprende 712 aislados de *S. pneumoniae* procedentes de diferentes muestras clínicas entre las que se encontraban esputos (n=21), exudados conjuntivales (n=7), nasales (n=4), óticos (n=4), hemocultivos (n=2), lavados broncoalveolares (n=2), broncoaspirados y aspirados traqueales (n=1 respectivamente), puntas de catéter (n=1) y líquidos pleurales (n=1) recogidos entre los años 1999 y 2003 en 13 hospitales de diferentes Comunidades Autónomas entre las que se encontraban Madrid, Cataluña, Baleares, Castilla y León, Comunidad Valenciana, Galicia, Andalucía, Murcia, Asturias y Aragón.

El periodo de recogida de aislados es previo a la introducción y utilización formal de la vacuna conjugada heptavalente en España. Esta colección es parte de un estudio de vigilancia epidemiológico realizado en nuestro laboratorio con los objetivos de conocer la prevalencia de la resistencia en *S. pneumoniae* y los mecanismos de resistencia implicados [206]. De esta colección, 244 aislados fueron resistentes a la eritromicina. En el presente estudio se seleccionaron específicamente todos los aislados resistentes a la eritromicina que presentaban el gen *mef* (n=45) para la caracterización de los genes de resistencia a macrólidos, el estudio del entorno genético de los genes responsables y el análisis pormenorizado de su estructura poblacional.

3.1.2. Aislados invasivos

Esta segunda colección comprende 416 aislados (un aislado por paciente) de *S. pneumoniae* obtenidos de los hemocultivos procesados en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal entre los años 2000 y 2007. De esta colección se seleccionaron específicamente todos los aislados resistentes a la eritromicina (n=78) para la caracterización de los genes de resistencia a macrólidos, el estudio del entorno genético de los genes responsables y el análisis pormenorizado de su estructura poblacional.

3.2. Estudio de sensibilidad

El estudio de sensibilidad se realizó utilizando diferentes métodos que incluían la difusión con discos, la microdilución y la técnica de Etest.

3.2.1. Difusión con discos

Mediante la técnica de difusión con disco según las especificaciones del CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) [207] se estudió la sensibilidad a eritromicina (30 µg), clindamicina (2 µg) y tetraciclina (30 µg). Para ello se utilizaron placas de agar Mueller-Hinton suplementadas con 5 % de sangre de carnero que se inocularon utilizando una torunda impregnada en una suspensión de células de *S. pneumoniae* de turbidez equivalente a 0,5 de la escala de McFarland (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Las placas se incubaron 18 horas a 35°C en atmósfera de aerobiosis.

Como aislados control y para obtener resultados comparativos, se emplearon las cepas de referencia procedentes de la colección *American Type Culture Collection* (ATCC), *S. pneumoniae* ATCC 49619 (con criterio de interpretación “intermedio” para la penicilina) y *S. pneumoniae* ATCC 6303 (con criterio de interpretación “sensible” para la penicilina), ambas sensibles frente a la eritromicina. La interpretación de la lectura de los halos de inhibición en mm se realizó mediante los criterios del CLSI publicados en el año 2007 [208].

3.2.2. Microdilución

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante la técnica de microdilución en caldo empleando medio Mueller-Hinton suplementado con cationes y un 5 % de sangre lisada de caballo, en una proporción del 2 al 5 % volumen/volumen según el método descrito por el CLSI y empleando los paneles comerciales del sistema Wider específicamente diseñados para *S. pneumoniae*. (Fco. Soria Melguizo, Madrid, España).

Los antibióticos estudiados y las concentraciones empleadas se exponen en la tabla 3.1. La incubación se realizó a 35°C en atmósfera aerobia durante 18 horas.

Como aislados control y para obtener resultados comparativos, se emplearon las cepas mencionadas en el apartado 3.2.1. Para la interpretación de las CMI se emplearon los criterios establecidos por el CLSI publicados en el año 2007 [208].

Se seleccionó un subgrupo de aislados que presentaron amplificación positiva a ambos determinantes genéticos de resistencia *erm*(B) y *mef*(E) para analizar la CMI alcanzada frente a la eritromicina. Para ello, se realizó microdilución en caldo utilizando placas de 96 (12x8) pocillos, según la técnica descrita por el CLSI. Se evaluaron doce concentraciones de eritromicina A (rango 4-8192 mg/L) utilizando cada fila de la placa para un aislado y dejando las dos últimas filas de cada placa para el aislado control (ATCC 49619) y el control negativo de crecimiento (sin inóculo bacteriano). El antibiótico empleado (eritromicina A) se suministró por Sigma como sustancia valorada de potencia conocida.

El inóculo bacteriano se preparó a partir de una suspensión en suero salino de células de *S. pneumoniae* obtenidas a partir de una placa de agar sangre con un crecimiento de

Antibiótico	Rango de concentración ($\mu\text{g/ml}$)
Penicilina	0,03-4
Ampicilina	0,06-4
Amoxicilina/ác. clavulánico	0,5/0,25-4/2
Cefuroxima	0,12-8
Cefotaxima	0,03-4
Meropenem	0,12-4
Vancomicina	0,25-2
Teicoplanina	0,25-2
Eritromicina	0,25-1
Claritromicina	0,25-16
Clindamicina	0,12-1
Tetraciclina	0,25-4
Ciprofloxacino	0,06-4
Levofloxacino	0,25-8
Cotrimoxazol	0,5/9,5-2/38
Cloranfenicol	2-4
Rifampicina	0,5-2

Tabla 3.1: Antibióticos y rango de concentraciones empleados en el estudio de sensibilidad mediante microdilución (paneles Wider, Fco. Soria Melguizo, Madrid, España)

18h, con una turbidez equivalente a 0,5 en la escala de McFarland (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml).

El volumen final de cada pocillo fue de $100 \mu\text{l}$ correspondiente al caldo de medio Mueller-Hinton suplementado con cationes y un 5% de sangre lisada de caballo, en una proporción del 2 al 5% volumen/volumen, con la concentración de antimicrobiano ($50 \mu\text{l}$) y a la suspensión bacteriana ($50 \mu\text{l}$). Las placas se prepararon utilizando una pipeta multicanal, añadiendo $50 \mu\text{l}$ de caldo sin antibiótico a los pocillos de las columnas 2-12 y $100 \mu\text{l}$ de la concentración más elevada de eritromicina A (8192 mg/L) a la columna 1. Se realizaron diluciones seriadas de $50 \mu\text{l}$ de las columnas 1 a 12. Finalmente se añadieron $50 \mu\text{l}$ de suspensión bacteriana, empleando de las filas 1-6 para diferentes aislados y la fila 7 para el aislado control. No se añadió suspensión bacteriana a la fila 8, de forma que se empleó como control negativo de crecimiento. Las placas se incubaron apilando como máximo cuatro placas, a 35°C en atmósfera aerobia durante 18 horas.

3.2.3. Determinación de la CMI mediante Etest

Se determinó la CMI para eritromicina y clindamicina mediante la técnica de Etest (BioMerieux) en los aislados para los se obtuvieron resultados controvertidos mediante otras técnicas o con resultados discordantes entre ellas Como aislados control y para obtener resultados comparativos, se emplearon las cepas de referencia mencionadas en el apartado 3.2.1 Para la interpretación de los valores de CMI se emplearon los criterios establecidos por el CLSI publicados en el año 2007 [208].

3.3. Determinación de los fenotipos de resistencia a macrólidos

El fenotipo de resistencia asociado a los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLS_B) se determinó mediante la prueba de triple difusión con discos por aproximación empleando discos de eritromicina ($30\mu\text{g}$), clindamicina ($10\mu\text{g}$) y espiramicina ($30\mu\text{g}$). Las placas de agar Mueller-Hinton suplementadas con 5% de sangre de carnero se inocularon con una torunda impregnada en una suspensión en suero salino de células de *S. pneumoniae* de turbidez equivalente a 0,5 de la escala de McFarland obtenida a partir de una placa con crecimiento de 18h. Los discos anteriormente mencionados se dispusieron sobre la placa en línea, separados entre 15 y 20mm y ocupando la posición central el disco de eritromicina. Las placas se incubaron 18 horas a 35°C en atmósfera de aerobiosis. La ausencia de halos de inhibición alrededor de los discos de eritromicina y clindamicina, y la leve disminución de dicho halo alrededor del disco de espiramicina, se interpretó como fenotipo de resistencia MLS_B constitutivo. La ausencia de halo de inhibición alrededor del disco de eritromicina y con una disminución del halo de inhibición de la clindamicina en la zona adyacente a la eritromicina se interpretó como fenotipo MLS_B inducible. Con la espiramicina, macrólido de dieciséis átomos, este efecto es menos evidente o incluso ausente.

La ausencia de halo de inhibición alrededor del disco de eritromicina y presencia de éste alrededor de los discos de espiramicina y clindamicina se interpretó como fenotipo de resistencia M [206].

3.4. Métodos moleculares

3.4.1. Extracción de ADN genómico

Se realizó extracción de ADN genómico total de todos los aislados de *S. pneumoniae* resistentes e intermedios a eritromicina (CMI $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$), así como de los aislados utilizados como controles de las reacciones de amplificación.

3.4.1.1. Hervido o *boiling*

Se prepara una suspensión densa de cultivo tras incubación de 18-24h en placas de agar sangre, en 300 μl de agua estéril y se hierve a 100°C durante 15 minutos. Para separar el material genómico de los productos restantes se centrifuga a 12.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos. El sobrenadante, en el que se encuentra suspendido el ADN, se recoge y conserva a 4°C para ser empleado en las amplificaciones.

3.4.1.2. Elución en columna

Se extrae el material genómico mediante purificación por columnas de sílice, utilizando un tratamiento previo con una solución de lisis siguiendo las indicaciones de la casa comercial, mediante el sistema QI Aamp DNA miniKit de Quiagen (Quiagen GmbH, Hilden, Alemania).

3.4.2. Controles de amplificación

3.4.2.1. Controles positivos

Los aislados empleados como controles positivos se resumen en la tabla 3.2.

Como control positivo de la amplificación del gen *tetM* se utilizó un aislado de *S. pneumoniae* procedente de la colección prevacunal (aislado 44), cuya amplificación para este gen fue positiva. Dicho amplicón se comprobó mediante secuenciación con los cebadores utilizados para la amplificación y la secuencia se comparó con la depositada en la base de datos GeneBank (AF376746) mediante el programa ClustalX siendo la homología entre ambas del 100 %

3.4.2.2. Controles negativos

Como controles negativos de amplificación de genes de la presencia de genes de resistencia a macrólidos se emplearon los aislados R6 y el ATTC 6303 de *S. pneumoniae* ambos sensibles a macrólidos.

Gen/Elemento		Aislado
erm	erm(B)	<i>Streptococcus pyogenes</i> AC1 ^a
	erm(A)	<i>S. pyogenes</i> S211 ^a
mef	mef(A)	<i>S. pneumoniae</i> SPnMA ^a
	mef(E)	<i>S. pneumoniae</i> SPnME ^a
msr(D)		<i>S. pneumoniae</i> SPnME ^a
tetM		<i>S. pneumoniae</i> aislado 44 colección prevacunal
Tn6002		<i>S. pneumoniae</i> An1 ^b
		<i>S. pneumoniae</i> Rm11 ^b
Tn6003		<i>S. pneumoniae</i> Ar4 ^b
		<i>S. pneumoniae</i> Fi6 ^b

^a: Cedidos amablemente por la Dra. Stefani, Universidad de Catania.

^b: Cedidos amablemente por el Dr. Varaldo, Universidad Politécnica de Las Marcas, Ancona

Tabla 3.2: Aislados empleados como controles positivos en la detección de diferentes genes y elementos genéticos de resistencia

3.4.3. Amplificación de ADN

La amplificación de ADN se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa o PCR. Las reacciones se realizaron en un termociclador MJ Research PTC-100 (Global Medical Instrumentation Inc. Minn. EE.UU). Las condiciones de reacción fueron diferentes en función del tamaño de producto a amplificar.

3.4.3.1. Productos de amplificación menores de 3Kb

La composición de la mezcla de amplificación (*master mix*) con un volumen final de 20 μ l fue: 5 mM Tris-HCl, 50 mM KCl (pH 8.0), 2 mM MgCl₂, 100 μ M de cada desoxinucleótido, 2 pmol de cada cebador (directo y reverso), 0,5-1,5U de la polimerasa empleada, y 1 μ l de DNA genómico extraído. Las polimerasas empleadas fueron:

- TaKaRa Taq TM , 0,5 UI (TaKaRa Bio Inc. Shiga, Japón) que es una enzima de baja fidelidad, empleada en reacciones que no necesiten alta especificidad.
- AmpliTaq Gold 1, 5 UI (Applied Biosystems, Norwalk, Conn. EE.UU) que es una enzima de alta fidelidad, altamente específica debido al requerimiento de altas temperaturas para su activación, que evita la formación de productos inespecíficos.

Las condiciones de amplificación para cada gen se describen en la sección 3.7.

3.4.3.2. Productos de amplificación mayores de 3Kb

La composición de la mezcla de amplificación (*master mix*) con un volumen final de 25 μ l fue: 20mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 25mM MgCl₂, 400 μ M de cada nucleótido, 100 μ M de cada cebador (directo y reverso), 5 U de la polimerasa TaKaRa LA TaqTM (Takara Bio Inc. Shiga, Japan) y 1 μ l de DNA genómico. La polimerasa TaKaRa LA TaqTM es una polimerasa de alta fidelidad y eficiencia que permite amplificar fragmentos de ADN de hasta 15Kb de forma específica. Las condiciones de amplificación para cada reacción se describen en el apartado 3.7.

3.4.4. Detección de productos

La detección de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis en corriente continua. La aplicación de un campo eléctrico en corriente continua permite separar fragmentos de ADN con un tamaño comprendido entre 10pb y 50kb, que se separan en la matriz de los geles de agarosa según su peso molecular. La resolución de la técnica es óptima para fragmentos entre 10pb y 20kb. La técnica se compone de una serie de pasos:

- **Preparación de los geles de agarosa:** Se utilizó una agarosa de baja electroendósmosis para permitir una mayor movilidad, en este trabajo se empleó la agarosa D-1 Low EEO (Pronadisa, Madrid, España) disuelta en tampón TBE 0,5x a concentraciones 0,8 % peso/volumen para separar fragmentos de amplificación comprendidos entre 1Kb y 10Kb y 2 % peso/volumen para separar fragmentos de amplificación comprendidos entre 100pb y 1Kb.
- **Electroforesis:** Se cargaron entre 2-4 μ l de producto de amplificación en los pocillos de la agarosa mezclados con 5 μ l de tampón de carga para la visualización de la electroforesis. La separación de los fragmentos se realizó en TBE 0,5x, en una cubeta horizontal a 100V durante un tiempo comprendido entre 30 minutos y una hora en función del tamaño de los fragmentos a visualizar.

Los tamaños del ADN separado se determinaron por comparación con los marcadores de peso molecular III (0,12-21,2 Kb), V (8-5,8pb) (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany), λ -Eco14 I/Bgl II digest (60-2. 392 pb) (TaKaRa Bio Inc. Shiga, Japón) y 100pb DNA ladder (100-1.500 pb) (TaKaRa Bio Inc. Shiga, Japón).

- **Visualización de los productos:** Para la visualización de los productos separados mediante electroforesis se empleó la tinción de los geles de agarosa con bromuro de etidio a una concentración final de 0,2 μ g/ml. El ADN se puede visualizar tras exposición con luz ultra violeta ya que el bromuro de etidio se intercala entre las bases nitrogenadas de la hebra de ADN. Para ello, los geles de agarosa se preparan incluyendo en la disolución el volumen de bromuro de etidio indicado para alcanzar la concentración antes mencionada. La visualización se realizó en un transiluminador de luz ultra-violeta y se fotografiaron con el equipo Gel Logic 100 Imaging System (Carestream Health, Inc. Rochester, NY, EE. UU.).

3.4.5. Purificación y secuenciación

Los productos de PCR obtenidos se purificaron mediante columna de sílice empleando el sistema QIAquick PCR purification kit (Quiagen GmbH, Hilden, Alemania) o mediante reacción enzimática empleando el sistema ExoSAP-IT® purification kit (USB Corp. Cleveland, OH, EE.UU). La secuenciación de los productos de interés se llevó a cabo en el secuenciador automático ABI Prism 377 (PE, Norwalk, Conn. EE.UU).

3.5. Estructura poblacional

En el estudio de la estructura poblacional se emplearon diferentes técnicas entre las que se incluye el serotipado, la electroforesis en campo pulsado y la secuenciación de alelos múltiples (*multilocus sequence typing*, MLST).

3.5.1. Serotipado

Esta técnica se basa en la observación de la reacción de *Quellung*, que consiste en clasificar los aislados de *S. pneumoniae* en función de la aglutinación de los polisacáridos capsulares frente a antisueros específicos. La técnica se realizó tanto en el Laboratorio de Referencia de Neumococo perteneciente al Centro Nacional de Microbiología en el Instituto de Salud Carlos III en Majadahonda, Madrid, como en el Centro de Referencia Nacional de Estreptococos en Aquisgrán, Alemania. Los criterios utilizados que definen los conceptos de serotipo y serogrupo en *S. pneumoniae* son los internacionalmente aceptados

- **Serotipo:** tipo de antígeno que se encuentra en la cápsula de *S. pneumoniae*.
- **Serogrupo:** estructura antigénica que se comparte dentro de un grupo capsular. Como ejemplo, hablamos del serogrupo 19 que incluye los serotipos 19A y 19F.

A continuación se describe brevemente el protocolo seguido en el Centro de Referencia Nacional de Estreptococos en Aquisgrán: Se realiza una suspensión densa de células de *S. pneumoniae* en 300 μ l de suero salino al 0,9% y se depositan 5-8 μ l de ésta sobre un portaobjetos; se añaden 5-8 μ l de antisuero y se mezclan. Se coloca un cubreobjetos sobre la preparación y se observa la reacción de *Quellung* con el objetivo 100x y aceite de inmersión. Si se observa floculación de las células se considera reacción de aglutinación positiva. Para seleccionar los antisueros a emplear, se siguió el esquema en las aglutinaciones empleado en el Centro Nacional de Estreptococos alemán, cedido amablemente por el Dr. van der Linden (tab: 3.3).

Se realiza una primera aglutinación frente a sueros de los grupos principales y en función del grupo frente al que se observe una reacción positiva se seleccionan los antisueros a emplear para definir el serogrupo (tab: 3.3).

Con posterioridad, una vez descrito el serogrupo, se seleccionan los antisueros para la descripción del serotipo, siguiendo el esquema que se describe en la página web del *Statens serum institut* (<http://www.ssi.dk>).

Como control positivo de aglutinación se emplea un suero universal conocido como "Omnisera". En caso de no aglutinar frente a ningún suero de los grupos principales

Grupos Principales	R	P	Q	S	T	Omnisera
Serogrupos	3	1	6	5	2	
	4	7	1	8	11	
	9	14	8	10	2	
	1	19	2	15	0	
	2		3	17	2	
					2	
					3	
					3	

Tabla 3.3: Esquema seguido para la serotipificación

pero con aglutinación frente al "Omnisera", deben utilizarse antisueros de grupos menos frecuentes como los grupos I, C, D, E, F, G y H. (Statens Serum Institut, Copenhague, Dinamarca).

3.5.2. Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE)

La técnica de electroforesis en gel por campo pulsado se realizó inicialmente siguiendo el método descrito por McGee *et al* [142]. Sin embargo los resultados obtenidos mediante la digestión con *Sma*I endonucleasa no permitieron el análisis informático de los geles debido a que el lugar de reconocimiento de dicha enzima se encuentra en la secuencia de los genes *mef*. Por tanto se modificó el protocolo descrito por McGee *et al* [142] y se seleccionó como enzima de digestión un esquizomero de la endonucleasa *Sma*I llamado *cfi9I* (Fermentans GmbH, Alemania) en las mismas proporciones [132, 133]. El protocolo final se describe a continuación: Se realizó una extracción de ADN *in situ*: se inoculó una colonia de cultivo fresco en 10 mL de un medio de enriquecimiento (Brain Heart Infusion, BHI) (Oxoid Ltd, Basingstoke, R.U.) y se dejó incubar durante 4-6h para evitar la autólisis del cultivo. Se centrifugaron los 10 mL de cultivo a 12.000 rpm durante 10 minutos y el sedimento se resuspendió en 100 microl de tampón TN (Tris-HCl, Tris base 10mM, NaCl 150mM a pH 8,0). Dicha solución se mezcló con 100 μ L de agarosa D5 (Pronadisa, Madrid, España) fundida en tampón Tris Borato EDTA (TBE) 0,5x (44,5 mM Tris base, 44,5 mM ácido bórico y 1mM EDTA a pH 8,0), con lo que se obtuvieron los bloques de agarosa. Dichos bloques se sometieron a una lisis y desproteización celular empleando una solución de Sarcosil al 1% y de proteinasa K 50 μ g/ml que se completó hasta un volumen de 1ml con EDTA 0,5mM a pH 9,5. Los bloques se incubaron con esta solución durante 24h, a 56°C sin agitación.

Tras la lisis y desproteización se realizaron tres lavados de los bloques a 56°C y dos a temperatura ambiente con tampón Tris- Clorhídrico-EDTA (TE) (10mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH8,0) durante 15 minutos cada uno.

Finalmente se procedió a la digestión del ADN extraído en el bloque de agarosa añadiendo 2 μ l (2 Unidades Internacionales) de la enzima *cfi9I* (Fermentans GmbH, Alemania).

La separación de los fragmentos de ADN se realizó en un gel preparado con la misma agarosa que la empleada para hacer los bloques y con el mismo tampón (TBE 0,5x) al 1 % peso/volumen, a 14°C y 6V/cm² de corriente alterna en un sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad, La Jolla, CA, EE.UU). La electroforesis se realizó en dos rampas bajo las siguientes condiciones: rampa 1, un pulso de 1 a 30 segundos durante 17 horas y rampa 2, un pulso de 5 a 9 segundos durante 6 horas.

Los marcadores de peso molecular empleados fueron: Lambda Ladder PFG Marker (48,5-1018,5 Kb) y Low Range PFG Marker (0,13-194 Kb) (New England Biolabs Inc. Ipswich, MA, EE.UU).

La interpretación de los patrones de bandas obtenidos y análisis de los clones se realizó siguiendo la nomenclatura propuesta por la red de epidemiología molecular de neumococo (PMEN) descrita por McGee *et al.* en el año 2001.

3.5.3. Secuencia de alelos múltiples (*multi locus sequence typing, MLST*)

La técnica de *multi locus sequence typing* se realizó según el protocolo descrito por Enright *et al.* [141] y recogido en la página web <http://spneumoniae.mlst.net/>. Brevemente el protocolo incluye la amplificación y secuenciación de fragmentos intragénicos de los siete genes constitutivos de la bacteria o *housekeeping* mediante el empleo de los cebadores propuestos por Enright *et al.* Los genes constitutivos y los cebadores se resumen en la tabla 3.4.

Gen	Cebador
aroE (shikimato deshidrogenasa)	<i>aroE</i> -up, 5'-GCC TTT GAG GCG ACA GC-3'
	<i>aroE</i> -dn, 5'-TGC AGT TCA (G/A)AA ACA T(A/T)T TCT AA-3'
gdh (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa)	<i>gdh</i> -up, 5'-ATG GAC AAA CCA GC(G/A/T/C) AG(C/T) TT-3'
	<i>gdh</i> -dn, 5'-GCT TGA GGT CCC AT(G/A) CT(G/A/T/C) CC-3'
gki (glucosa kinasa)	<i>gki</i> -up, 5'-GGC ATT GGA ATG GGA TCA CC-3'
	<i>gki</i> -dn, 5'-TCT CCC GCA GCT GAC AC-3'
recP (transketolasa)	<i>recP</i> -up, 5'-GCC AAC TCA GGT CAT CCA GG-3'
	<i>recP</i> -dn, 5'- TGC AAC CGT AGC ATT GTA AC-3'
spi (peptidasa señal I)	<i>spi</i> -up, 5'-TTA TTC CTC CTG ATT CTG TC-3'
	<i>spi</i> -dn, 5'-GTG ATT GGC CAG AAG CGG AA-3'
xpt (xantina fosforibosil transferasa)	<i>xpt</i> -up, 5'-TTA TTA GAA GAG CGC ATC CT-3'
	<i>xpt</i> -dn, 5'-AGA TCT GCC TCC TTA AAT AC-3'
ddl (D-alanina-D-alanina ligasa)	<i>ddl</i> -up, 5'-TGC (C/T)CA AGT TCC TTA TGT GG-3'
	<i>ddl</i> -dn, 5'-CAC TGG GT(G/A) AAA CC(A/T) GGC AT-3'

Tabla 3.4: Genes constitutivos y cebadores de la técnica MLST

La amplificación se realizó con las condiciones descritas en el apartado 3.4.3 empleando la enzima TaKaRa Taq TM , 0,5 UI (TaKaRa Bio Inc. Shiga, Japón), con una temperatura de hibridación de 50°C durante 30 segundos. La purificación y secuenciación se realizaron según la técnica descrita en el apartado 3.4.5, y para la asignación de alelo y descripción de perfil alélico y secuencia tipo (ST) se empleó la aplicación de la

página web <http://spneumoniae.mlst.net/>.

- **Descripción de nuevas secuencias tipo:** A petición del supervisor que valora la aparición de nuevas secuencias tipo, se diseñó un cebador reverso nuevo (aroEdnlong) para la amplificación de un amplicón de mayor tamaño del gen *aroE*:

aroEdnlong:5'-CCT GAC TTC TAG CCC ATT T-3'

Las condiciones de reacción fueron las descritas para la técnica inicial con la única diferencia de la temperatura de hibridación, que se realizó a 54°C. Con este nuevo cebador el tamaño del amplicón es de 492pb.

La clasificación de las STs obtenidas y agrupamiento en complejos clonales o clones individuales se realizó mediante el algoritmo eBURST, versión V3, disponible en <http://eburst.mlst.net> [209, 210]. La representación de los resultados obtenidos mediante este algoritmo por MST *Minimum Spanning Tree* se llevo a cabo mediante el empleo de la herramienta informática *PHYLOViZ* [211].

3.6. REP-PCR (Diversilab®)

Se basa en la amplificación de secuencias de ADN que se encuentran flanqueadas por secuencias repetitivas a lo largo del genoma y palindrómicas (elementos REP), zonas de unión de los cebadores. Así, el número de productos obtenidos es proporcional al número de elementos REP y por tanto, característicos de cada especie, mientras que el tamaño de estos productos es característico de cada aislado y sirve para establecer relaciones filogenéticas. Esta técnica se realizó mediante la aplicación del sistema comercial semiautomático Diversilab® (BioMérieux), para lo cual se siguieron las instrucciones del fabricante

3.6.1. Extracción de ADN

Se utilizó un sistema de extracción en columna mediante el equipo comercial Ultra Clean (Mo Bio, Bacterial Barcodes) siendo necesario obtener extracciones de ADN con cantidades comprendidas entre 25 y 50 µg. La medición de la cantidad de ADN obtenida tras la extracción se realizó mediante el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, EEUU)

3.6.2. Amplificación

Se utilizó el kit comercial Streptococcus DiversiLab® fingerprinting (BioMérieux) que incluye los cebadores, el tampón de amplificación y una solución de cloruro de magnesio, todo ello en cantidades ajustadas para la reacción. Como polimerasa se utilizó la enzima AmpliTaq DNA Polymerase with Gene Amp (Applied Biosystems, Foster City, CA) Las condiciones de la amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante dos minutos seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 seg, hibridación a 50°C durante 30 seg y extensión a 70°C durante 90 seg para concluir con una extensión final a 70°C durante 3 minutos.

3.6.3. Detección de producto

Los diferentes fragmentos de ADN se separaron en un chip de detección de ADN por microfluidos y se detectaron mediante el sistema Agilent 2100 BioAnalyzer.

3.6.4. Análisis de resultados

El análisis se realizó en función de los resultados obtenidos mediante eBURST. Para el agrupamiento de los aislados se identificaron los patrones de geles virtuales aplicando la herramienta de análisis proporcionada por la el sistema Diversilab[®], el software DiversiLab[®] v3.1. Esta herramienta de análisis proporciona tres opciones para calcular los porcentajes de similitud entre las diferentes muestras, los métodos disponibles son el coeficiente de correlación de Pearson (PC), el coeficiente de correlación modificado de Kullback-Leibler (KL) y el coeficiente de correlación Extended Jaccard (XJ). Todos estos métodos se basan para calcular la similitud en las intensidades de los geles virtuales de cada muestra, y se diferencian entre sí la mayor o menor importancia que se atribuye en el análisis a la presencia o ausencia de picos y a la intensidad de los mismos. Así, con la aplicación del coeficiente de correlación de Pearson (PC), se le da más importancia en el análisis de las muestras a la intensidad de los picos. Está indicado realizar este tipo de análisis cuando hay diferencias importantes en la cantidad y posición de los picos más intensos. Es el método a elegir cuando existen varios patrones de gel virtual diferentes a simple vista y queremos agrupar los aislados. Se utiliza especialmente en muestras que provienen de microorganismos Gram negativos. Con la aplicación de los coeficientes modificado de Kullback-Leibler (KL) y el coeficiente de correlación Extended Jaccard (XJ) se da más importancia en el análisis a la presencia o ausencia de picos en la imagen de gel virtual. En concreto es más sensible, ya que aprecia más diferencias incluso en picos pequeños el coeficiente Extended Jaccard (XJ) en geles virtuales en los que los patrones son muy parecidos entre sí. Cualquiera de estos dos métodos es de aplicación en muestras en las que hay sólo uno o dos picos intensos y las diferencias se encuentran en los picos pequeños, patrones que suelen encontrarse en los microorganismos Gram positivos.

El análisis de las muestras de *S. pneumoniae* se realizó empleando dos índices de correlación, el de Pearson (PC) y el Extended Jaccard (XJ). Al igual que para el análisis de otros métodos de tipado molecular, para la interpretación de los patrones de bandas en los geles virtuales, y de los porcentajes de correlación obtenidos mediante la aplicación de los diferentes índices, se establecen los siguientes criterios:

- Dos aislados se consideran indistinguibles cuando el índice de correlación se encuentra alrededor del 97 % y no se observan diferencias en la imagen de gel virtual. En este caso, se asigna un mismo patrón a ambos aislados.
- Dos aislados se consideran relacionados entre sí cuando el índice de correlación esta alrededor del 95 % y se observan una o dos bandas de diferencia en la imagen de gel virtual. En este caso, a cada uno de ellos le corresponde un patrón, pero se encuentran en un mismo grupo.
- Dos aislados se consideran diferentes cuando el índice de correlación es menor del 95 % y se observan varias diferencias en la imagen de gel virtual y a cada uno de ellos se le asigna un patrón diferente, sin agruparse.

3.7. Detección de genes de resistencia

3.7.1. Detección de genes de resistencia a los macrólidos

Todas las reacciones de amplificación de los genes que confieren resistencia a los macrólidos se realizaron bajo las siguientes condiciones de reacción: una desnaturalización inicial a 94°C durante 12 minutos seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante un minuto, hibridación a la temperatura y durante el tiempo indicados para cada pareja de cebadores y elongación a 72°C durante 45 segundos, para terminar con una elongación final a 72°C durante 10 minutos.

3.7.1.1. Detección de los genes *erm*

Para la amplificación de los genes *erm(B)* y *erm(A)* se diseñaron los siguientes cebadores: *erm(B)*: *ermBF* 5'-GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA-3', y *ermBR* 5'-AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC-3'; *erm(A)*: *ermAF* 5'-AGA AGG TTA TAA TGA AAC AGA-3', y *ermAR* 5'-GGC ATG ACA TAA ACC TTC AT-3' con un tamaño de producto de 640 pares de bases y 210 pb respectivamente. La hibridación se realizó a 50°C durante 30 segundos.

3.7.1.2. Detección de los genes *mef*

Para la detección y diferenciación de los genes *mef(A)* y *mef(E)* se diseñó un esquema de PCR-multiplex para lo cual se utilizaron los siguientes cebadores *mefAF* 5'-AAT ACA ATT GGA AAC TT-3', *mefEF* 5'-AAG GAG TTG TGG TTC TGA-3', y un cebador común reverso *mefRF* 5'-AAT CGG TAA ATC ATT GG-3'. Los tamaños de producto esperados fueron 1,080 kb para el gen *mef(A)* y 480 kb para el gen *mef(E)*. La hibridación se realizó a 52°C durante 1 minuto. (Fig. 3.1).

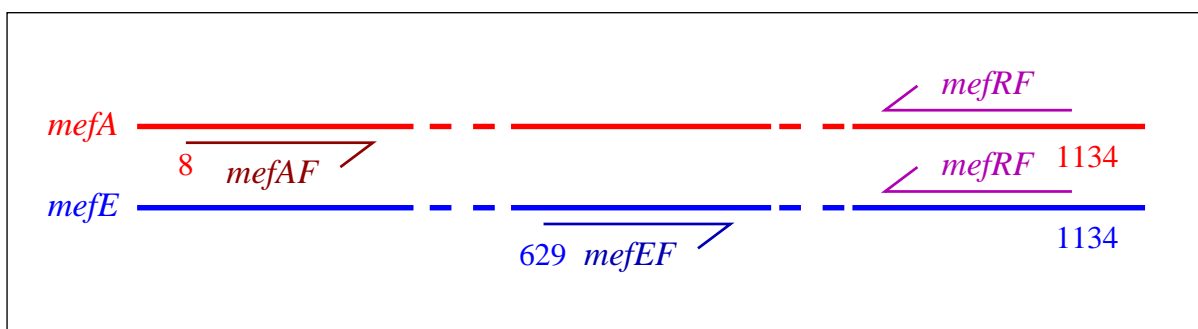


Figura 3.1: Esquema de PCR multiplex para la detección de los genes *mef*

3.7.1.3. Detección del gen *msr(D)*

La detección de dicho gen se realizó según la técnica descrita por Daly *et al.* [170]. Los cebadores empleados fueron: *msrDup*: 5'-TTG GAC GAA GTA ACT CTG-3' y *msrDdn*: 5'-GCT TGG CTC TTA CGT TC-3'. La hibridación se realizó a 50°C durante un minuto.

3.7.2. Detección de genes de resistencia a las tetraciclinas

La detección del gen *tet(M)* se realizó siguiendo la metodología descrito por Doherty *et al.* [212]. Los cebadores empleados fueron: tetMF 5'-AGT TTT AGC TCA TGT TGA TG-3' y tetMR, 5'-TCC GAC TAT TTG GAC GAC GG-3' bajo las siguientes condiciones de reacción: desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, hibridación a 55°C durante 1 minuto, elongación 72°C durante 1,5 minutos, para terminar con una elongación final a 72°C durante 10 minutos.

3.8. Análisis de estructura poblacional. Índices de diversidad

Con el objetivo de realizar un análisis pormenorizado de la estructura poblacional de los microorganismos estudiados se analizó su diversidad de forma cuantitativa mediante la aplicación de una serie de índices matemáticos, utilizando como elemento a medir las ST descritas mediante la técnica de MLST. Los índices empleados se describen a continuación y se incluyen sus formulas matemáticas

3.8.1. Índice de Diversidad Clonal (*CD*)

Este índice fue descrito por Ellstrand y Roose [213]. y se expresa como el cociente entre el número de STs diferentes descritas entre todos los aislados estudiados (*N*)

$$CD = \sum \frac{ST_i}{N}$$

3.8.2. Índice de Dominancia de Diversidad de Simpson (*D*)

Mediante la aplicación de este índice se expresa la probabilidad de tomar, en una selección al azar, dos aislados diferentes, que pertenezcan a diferentes STs. Para calcularlo se emplean el número de aislados con una ST concreta (n_i) y el número total de aislados (*N*) [214].

$$D = 1 - \sum \frac{n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

3.8.3. Índice de Selander y Levin (*H*)

Es similar al índice de Simpson, pero emplea frecuencias relativas de aparición de cada ST (f_i) [215].

$$H = 1 - \sum f_i^2$$

3.8.4. Índice de Shannon (H')

Se emplea para calcular cómo es de homogénea la distribución de las STs encontradas entre la población estudiada, empleando frecuencias relativas de aparición de cada ST (f_i) [216].

$$H' = - \sum f_i \log_2 f_i$$

Asimismo, se puede describir el valor máximo de diversidad de Shannon, H'_{\max} , considerando las STs distribuidas equitativamente entre los diferentes aislados con diferentes mecanismos de resistencia a los macrólidos, de forma que f_i tendría el mismo valor para cada ST, así, siendo n el número de STs diferentes, se definiría:

$$H'_{\max} = -n f_i \log_2 f_i$$

3.8.5. Índice de Evento (E')

Se describió para este trabajo y expresa la diversidad relativa de forma que permite establecer comparaciones con el índice de diversidad clonal (CD).

$$E' = \frac{H'}{H'_{\max}}$$

3.9. Elementos de transposición

Para el estudio y descripción de los elementos de transposición se emplearon las técnicas moleculares descritas en el apartado 3.4.

3.9.1. Detección de elementos genéticos asociados a la resistencia a los macrólidos

Se diseñaron PCRs multiplex para la detección del transposón Tn916 y de elementos genéticos que con frecuencia se asocian a éste en *S. pneumoniae*, como Tn917, MEGA (*Macrolide Element Genetic Assembly*) y MAS (*Macrolide-Aminoglycoside-Streptothricin*).

3.9.1.1. Detección de derivados de Tn916 y Tn917

La presencia de los transposones Tn916 y Tn917 se determinó mediante la amplificación de las integrasas y las excisionasas presentes en ellos, mediante las PCRs multiplex 1 y 2. Las secuencias de los cebadores, temperaturas de hibridación, tamaños de producto y los números de acceso en Genbank de las secuencias usadas como referencia se recogen en la tabla 3.5.

La reacción se realizó en el termociclador PTC-100 (MJ Research Inc, Watertown, Mass.) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 10 minutos seguida de 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación

a 54°C durante 30 segundos y elongación a 72°C durante 30 segundos, tras los ciclos de amplificación se realizó una elongación final a 72°C durante 10 minutos.

3.9.1.2. Detección de los elementos MEGA (*Macrolide Element Genetic Assembly*) y MAS (*Macrolide-Aminoglycoside-Streptothricin*)

La amplificación del elemento MEGA se realizó mediante la PCR simple 1, a su vez, el gen *msr(D)* detectado mediante la PCR simple 2 se utilizó también como marcador de la presencia del elemento anteriormente mencionado. La presencia del gen *tetM* se realizó mediante la PCR simple 3, y de los genes *sat4* y *aphA-3* mediante la PCR multiplex 3 que utilizó como marcador de la presencia del elemento MAS. Las secuencias de los cebadores, temperaturas de hibridación, tamaños de producto y los números de acceso en Genbank de las secuencias usadas como referencia se recogen en la tabla 3.5.

La mezcla de amplificación para la PCR simple 1 (amplificación de MEGA) contenía, para un volumen final de 25 μL : 20mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 25mM MgCl_2 , 400 μM de cada nucleótido, 100 μM de cada cebador, 5 U de la polimerasa TaKaRa TaqTM (Takara Bio Inc. Shiga, Japan) y 1 μl de ADN genómico. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador PTC-100 (MJ Research Inc., Watertown, Mass.) bajo las siguientes condiciones de reacción: desnaturalización inicial a 94°C durante 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 60°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 6 minutos, para finalizar con una elongación final a 72°C durante 10 minutos.

La amplificación de *msr(D)* mediante la PCR simple 2 se realizó como se describió en el apartado 3.7.1.3.

La mezcla de amplificación para la PCR multiplex 3 (amplificación de los genes *tetM*, *sat4* y *aphA-3*) para un volumen final de 20 μL estaba compuesta de: 20mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 25mM MgCl_2 , 100 μM de cada nucleótido, 100 μM de cada cebador, 5 U de la polimerasa TaKaRa TaqTM (Takara Bio Inc. Shiga, Japan) y 1 μl de ADN genómico. La reacción se realizó en el termociclador PTC-100 (MJ Research Inc, Watertown, Mass.) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 10 minutos seguida de 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 58°C durante 30 segundos y elongación a 72°C durante 30 segundos, seguido de una elongación final a 72°C durante 10 minutos.

3.9.1.3. Identificación de los elementos derivados de Tn916 (Tn6003, Tn6002, Tn2009 y Tn3872) mediante "mapeo" (*mapping*) por técnica de PCR *overlapping*

Se analizó tanto la presencia de un amplicón de 250pb como de 13kb amplificado en la región entre *orf20* y *orf19* del transposón Tn916 (PCR *mapping* 1) para determinar la presencia de los derivados Tn6003 y Tn6002. Las secuencias de los cebadores, temperaturas de hibridación, tamaños de producto y los números de acceso en Genbank de las secuencias usadas como referencia se recogen en la tabla 3.5.

Las condiciones de la amplificación empleadas fueron las mismas que las descritas para la amplificación del elemento MEGA (3.9.1.2) con una temperatura de hibridación de 52°C.

La descripción del elemento MEGA localizado en el *orf6* del transposón Tn916 (mediante la reacción *mapping 2*) que indica la presencia del transposón derivado Tn2009 se puso de manifiesto mediante la amplificación de la región comprendida entre el gen *tetM* y el gen *int* con un tamaño de producto esperado 11,2 kb.

La mezcla de reacción, para un volumen final de 25 μ L estaba compuesta de: 20mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 25mM MgCl₂, 400 μ M de cada nucleótido, 100 μ M de cada cebador, 5 U de la polimerasa TaKaRa LA TaqTM (Takara Bio Inc. Shiga, Japan) y 1 μ l de DNA genómico. La reacción se realizó en el termociclador PTC-100 (MJ Research Inc, Watertown, Mass.) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 10 minutos seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 56°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 6 minutos para concluir con una elongación final a 72°C durante 10 minutos.

Para comprobar la presencia de MEGA insertado en el transposón conjugativo Tn916 se realizó una PCR de mapeo u *overlapping (mapping 3)* utilizando los cebadores MEGAF e Int-R con las mismas condiciones de reacción descritas en el párrafo anterior salvo la temperatura de hibridación de 58°, con un tamaño de producto esperado de 9,2 kb (tabla: 3.5).

La presencia del transposón derivado Tn3872 se comprobó poniendo de manifiesto la localización del transposón Tn917 insertado en el transposón conjugativo Tn916 mediante PCR *overlapping (mapping 4)*, el tamaño de producto esperado fue de 6.8 kb (tabla: 3.5).

La mezcla de reacción y las condiciones de reacción fueron las anteriormente descritas para las PCRs *overlapping* con la temperatura de hibridación de 54°C.

Todos los productos obtenidos se secuenciaron utilizando los cebadores empleados para su amplificación y las secuencias obtenidas se compararon mediante herramientas bioinformáticas como el programa BLAST, con las depositadas en las bases de datos *on-line*.

3.9.1.4. Estudio del elemento MEGA. Mapa de restricción

En el caso de los aislados en los que mediante la amplificación del elemento MEGA se obtuvieron resultados no esperados se realizó una digestión del elemento mediante las enzimas de restricción *SpeI* y *HpaI* (Takara Bio Inc. Shiga, Japan). Los lugares de reconocimiento para la restricción del elemento MEGA, así como el número de restricciones y el tamaño esperado de los fragmentos generados se describen en la tabla 3.6.

La reacción de restricción se realizó incubando a 37°C durante 18h una solución que contenía 1 UI del enzima correspondiente, 2 μ l del buffer 10x (proporcionado por el fabricante), 1 μ g del ADN sustrato, completando con agua destilada estéril hasta 20 μ l.

3.9.2. Análisis Bioinformático

Todas las secuencias obtenidas mediante las diferentes técnicas se analizaron mediante los programas Chromas (versión 2.32, Technelysium Pty. Ltd. Tewantin, Australia) y Finchtv 1.3.1 de software libre, programado para la distribución Debian de Linux por Geospiza Inc. 2004-05. La comparación de secuencias se realizó mediante

PCR	Transposón	Cebador	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño de producto (pb)	Genebank	
Multiplex 1	Tn916	Int-F	5'-GCG TGA TTG TAT CTC ACT-3'	52	1.046	NC006372	
		Int-R	5'-GAC GCT CCT GTT GCT TCT-3'				
		Xis-F	5'-AAG CAG ACT GAC ATT CCTA-3'		194		
		Xis-R	5'-GCG TCC AAT GTA TCT ATA A-3'				
Multiplex 2	Tn917	tnpA1	5'-ATC GAT TCG GTA GTG CTA AT-3'	56	854	M111180	
		tnpA2	5'-CAA TAA CAT TGG CGT GTA TC-3'				
		tnpR1	5'-GTG AGT ACG GAT GAT CAA AA-3'		517		
		tnpR2	5'-TGA GGT AAC GGT AAA AGG TT-3'				
Multiplex 3	MAS	sat4-F	5'-AGG CTT CAT TAT GCC TAT CC-3'	56	531	U73026	
		sat4-R	5'-TGC AAG TTT TTA TGC TTT GCC-3'				
		aphA3-F	5'-AGA ATA TCA CCG GAA TTG AA-3'		729		AB247327
		aphA3-R	5'-GAT CCC CAG TAA GTC AAA AA-3'				
Simple 1	MEGA	Mega-F	5'-CCA TTT ACC CTG TGG GTA CG-3'	60	5.009	AF376746	
		Mega-R	5'-TTG TCT CAC TGC ACC AGA GG-3'				
Simple 2	MEGA	msr(D)-F	5'-TTG GAC GAA GTA ACT CTG-3'	50	370	AF376746	
		msr(D)-R	5'-GCT TGG CTC TTA CGT TC-3'				
Simple 3	MAS	tetM-F	5'-AGT TTT AGC TCA TGT TGA TG-3'	58	1.862	X90939	
		tetM-R	5'-TCC GAC TAT TTG GAC GAC GG-3'				
Mapping 1	Tn6003-Tn6002	orf20F	5'-TCC GAC AAC AGA CGT ACA GC-3'	52	13.000	NC006372	
		orf19R	5'-TCT TCA ACG CTG CTG GAG TA-3'				
Mapping 2 Mapping 3	Tn2009	tetM-F	5'-AGT TTT AGC TCA TGT TGA TG-3'	56	10.000	NC006372	
		Int-R	5'-GAC GCT CCT GTT GCT TCT-3'				
		MEGAF	5'-CCA TTT ACC CTG TGG GTA CG-3'		9.000		AF376746
		Int-R	5'-GAC GCT CCT GTT GCT TCT-3'				
Mapping 4	Tn3872	tnpR1	5'-GTG AGT ACG GAT GAT CAA AA-3'	54	6.820	M111180	
		Int-R	5'-GAC GCT CCT GTT GCT TCT-3'				

Tabla 3.5: Cebadores, temperaturas de hibridación y tamaños de producto diseñados para el estudio de los elementos genéticos asociados a la resistencia a los macrólidos

Enzima	Número de restricciones	Posición de reconocimiento en el elemento MEGA	Tamaño de fragmentos (pb)
<i>SpeI</i>	2	1194/1198 4887/4891	3.093
			1.194
			600
<i>HpaI</i>	1	3371	3.371
			2.129

Tabla 3.6: Características de las enzimas de restricción empleadas para el análisis del elemento MEGA

el programa BLAST, tanto en su versión para el software Windows como para Linux (www.ncbi.nlm.nih.gov) y los alineamientos entre diferentes secuencias se realizaron mediante el programa ClustalW 2 (versión para Windows) y ClustalX (versión para Linux).

3.9.3. Análisis estadístico

Se realizaron dos tipos de análisis estadístico: análisis de asociación para variables categóricas, mediante la prueba de χ^2 y análisis de asociación de tendencias mediante la prueba de Mantel-Haenszel para variables continuas. Se consideraron resultados estadísticamente significativos, cuando la probabilidad de asociación entre dos variables, P, mostraba un valor inferior a 0,05.

Resultados

*“No nos atrevemos a muchas cosas
porque son difíciles, pero son difíciles
porque no nos atrevemos a hacerlas”*

Séneca

4 Resultados

4.1. Resistencia a macrólidos y estructura poblacional en los aislados de *Streptococcus pneumoniae* pertenecientes a la colección prevacunal recogida entre los años 1999-2003 de diferentes áreas geográficas de España

En este apartado se incluye específicamente el estudio de 45 cepas de *S. pneumoniae* resistentes a eritromicina que presentaban el gen *mef*. Estas cepas fueron seleccionadas entre todas las resistentes a eritromicina (n= 244) obtenidas de una colección de 712 aislados recogidos entre los años 1999 y 2003 procedentes de un estudio multicéntrico realizado en España y coordinado por nuestro laboratorio.

4.1.1. Perfiles de sensibilidad

Los valores de sensibilidad de los aislados estudiados en la colección global (n=712) para los distintos antibióticos utilizando los criterios del CLSI del año 2007 fueron los siguientes: Entre los antibióticos β -lactámicos estudiados (penicilina y cefotaxima) se encontraron diferentes porcentajes de resistencia, de un 48,9 % para la penicilina (26,9 % intermedio; 22,0 % resistente) y de un 7,3 % para la cefotaxima (6,5 % intermedio; 0,8 % resistente). Con respecto a los antibióticos del grupo MLS (macrólidos, lincosamidas y estreptograminas) se estudió la sensibilidad a eritromicina, hallándose un 34,3 % de resistencia (0,8 % intermedio; 33,5 % resistente) y a clindamicina, siendo resistentes un 31,9 % (1,7 % intermedio; 30,2 % resistente) de los aislados estudiados.

Se estudiaron también otros antimicrobianos como la tetracilina, con un 25,8 % (1,9 % intermedio; 23,9 % resistente) y el levofloxacino, siendo resistentes un 2,4 % (0,4 % intermedio; 2 % resistente) en un rango de concentraciones entre 0,12-32 mg/L. En este trabajo, se incluyó el estudio de sensibilidad a la telitromicina (único cetólido comercializado hasta el momento) sin encontrarse resistencia o entre los aislados estudiados (fig. 4.1).

De esta colección inicial, se seleccionaron los aislados resistentes a eritromicina (n=244), en los que se determinó la CMI frente a diferentes antibióticos mediante el sistema de microdilución, siendo los porcentajes de resistencia obtenidos mayores que los obtenidos sobre la población total (fig. 4.2).

- Entre los antibióticos β -lactámicos se estudiaron penicilina, siendo resistente en este grupo de población el 69,6 % de los aislados (15,3 % intermedio; 54,3 % resistente) y la cefotaxima, aumentando el porcentaje de resistencia hasta un 30,7 % (19,6 % intermedio; 11,1 % resistente).

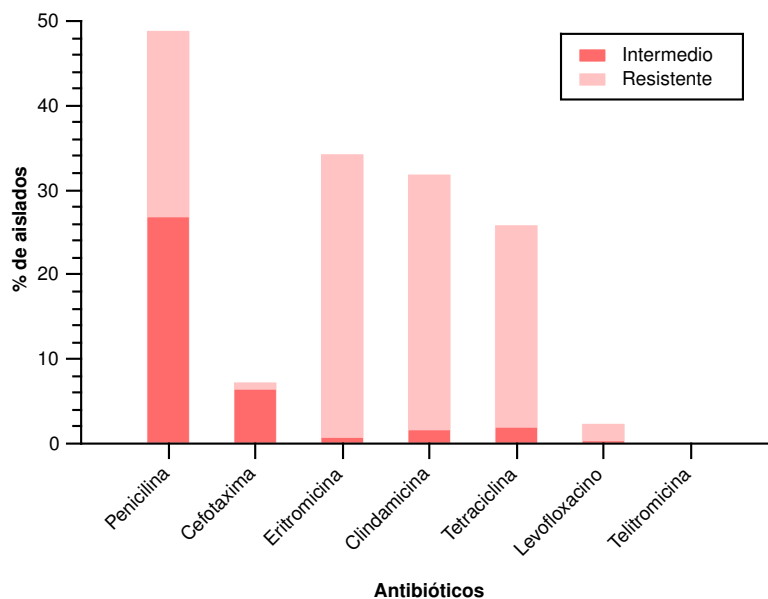


Figura 4.1: Resistencia a antimicrobianos entre los aislados de la colección prevacunal inicial (n=712)

- Se estudió también la sensibilidad a un segundo macrólido, la claritromicina (macrólido de 14 átomos), siendo resistentes el 100 % de los aislados.
- También se estudió el perfil de sensibilidad a la clindamicina, siendo resistentes el 93 % (4,9 % intermedio; 88,1 % resistente).
- Los porcentajes de resistencia a la tetraciclina y a levofloxacino aumentaron entre los aislados que eran resistentes a la eritromicina hasta un 69,6 % (15,3 % intermedio; 54,3 % resistente) y un 3,2 % (0,8 % intermedio; 2,4 % resistente) respectivamente.

De los 244 aislados resistentes a eritromicina, se seleccionaron los aislados con amplificación positiva para los determinantes genéticos de resistencia *mef*, tanto para la subclase *mef*(E) como para la subclase *mef*(A), siendo sus porcentajes de resistencia a diferentes antibióticos los siguientes

- Para penicilina y cefotaxima el porcentaje de resistencia fue de 82,2 % (35,5 % intermedio; 46,7 % resistente) y 22,2 % (17,7 % intermedio; 4,4 % resistente) respectivamente.
- El porcentaje de resistencia para la clindamicina fue de 62,2 %, sin encontrarse aislados intermedios y para la tetraciclina se encontró un 68,8 % de los aislados resistentes, (13,3 % intermedio; 55,5 % resistente).
- Entre estos aislados no se observaron resistencias ni a telitromicina (rango de concentraciones 0.03-1 mg/L) ni a levofloxacino (rango de concentraciones 0.25-2 mg/L)(fig. 4.3).

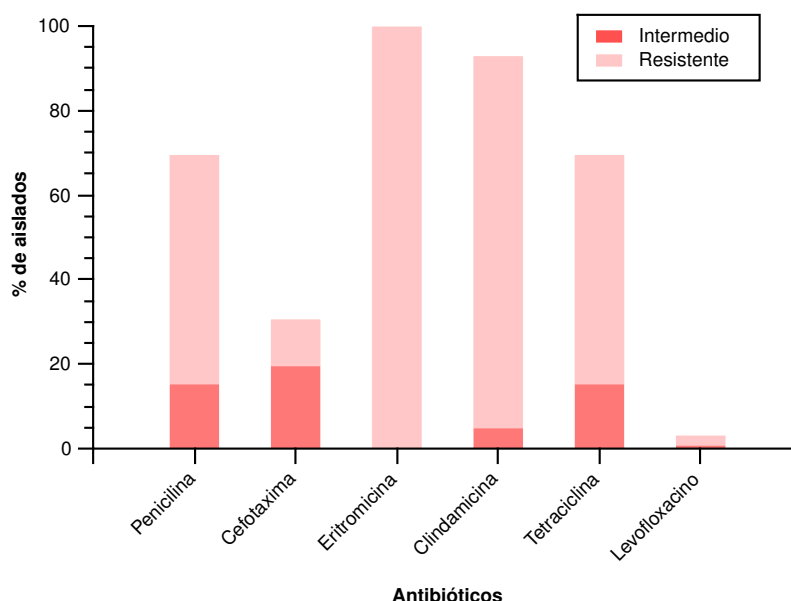


Figura 4.2: Resistencia a antibióticos de los aislados resistentes a eritromicina de la colección prevacunal (n=244)

4.1.2. Determinantes genéticos de resistencia y fenotipos asociados

4.1.2.1. Macrólidos

Entre los 244 aislados resistentes a la eritromicina, el 80,7% presentaban el gen *erm(B)* como único determinante genético de resistencia a los macrólidos, con un fenotipo de resistencia asociado MLS_B . El 18,4% de los aislados que portaban los genes *mef* (n=45), 44 aislados presentaba el gen *mef(E)* y sólo uno el gen *mef(A)*. Cabe resaltar, que entre los 44 aislados con amplificación positiva para el gen *mef(E)*, 28 de ellos (63,6%) presentaban a la vez el gen *erm(B)*, todos ellos con un fenotipo de resistencia asociado MLS_B constitutivo. Los 17 aislados restantes (amplificación positiva de los genes *mef*) presentaron el fenotipo de resistencia asociado M (tab. 4.1).

No se observó ninguna asociación temporal o geográfica de los aislados que presentaron amplificaciones duales o de aquellos que presentaron el gen *mef* como único determinante genético de resistencia. Por último, en dos aislados con valores de CMI para eritromicina y clindamicina de 0,5 mg/L no se observó amplificación positiva para ninguno de los genes asociados con la resistencia a los macrólidos. Estos aumento en la CMI podría deberse a mutaciones o inserciones ribosomales.

4.1.2.2. Tetraciclina

Se observó amplificación positiva para el gen *tetM* en el 71,1% de los aislados con amplificación positiva para el gen *mef*. Todos los aislados que portaban los genes de resistencia para los macrólidos *erm(B)* y *mef(E)* presentaron amplificación positiva para el

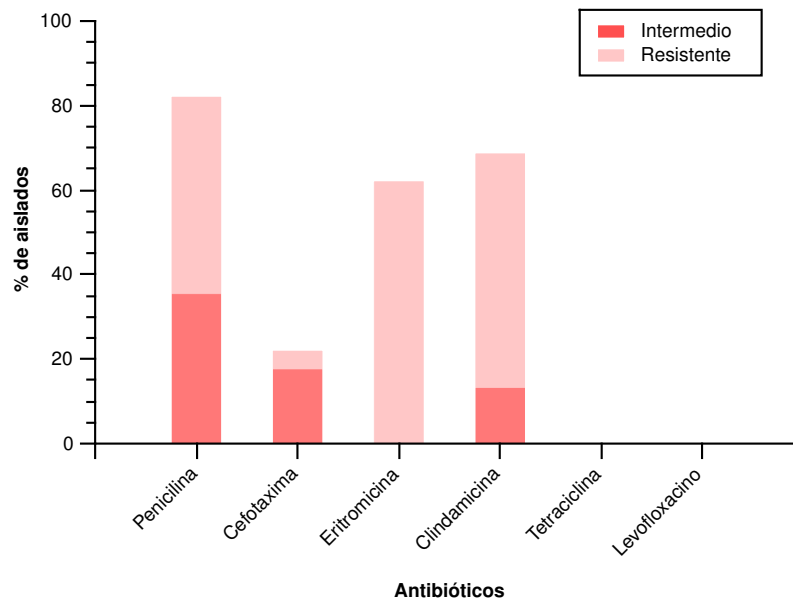


Figura 4.3: Resistencia a antibióticos entre los aislados con amplificación positiva para los genes *mef* de la colección prevacunal (n=45)

gen *tetM*, mientras que entre los aislados con amplificación positiva para los genes *mef*, sólo el 8,8% amplificó el gen *tetM*. La distribución de amplificaciones positivas para este gen en función del determinante genético de resistencia para los macrólidos, así como de la sensibilidad a la tetraciclina se muestra en la tabla 4.2.

Fenotipo	Genotipo - nº de aislados (%)			
	<i>erm(B)</i>	<i>erm(B)+mef(E)</i>	<i>mef(E)</i>	<i>mef(A)</i>
cMLS _B	197 (80,7)	28 (11,5)	-	-
iMLS _B	-	-	-	-
M	-	-	16 (6,5)	1 (0,4)

Nota: Los dos aislados que faltan hasta completar los 244 mostraron mutaciones ribosomales.

Tabla 4.1: Determinantes genéticos de resistencia a los macrólidos y fenotipos asociados entre los aislados resistentes a macrólidos de la colección prevacunal (n=244)

Genotipo resistencia macrólidos	Amplificación <i>tetM</i> (<i>tetM</i> + %)
<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E) (n=28)	100 %
<i>mef</i> (E) (n=16)	0 %
<i>mef</i> (A) (n=1)	100 %

Tabla 4.2: Distribución del gen *tetM* en función de los determinantes genéticos de resistencia a los macrólidos entre los aislados con amplificación positiva para el gen *mef* de la colección prevacunal (n=45)

4.1.3. Estructura poblacional en aislados con genes *mef*

4.1.3.1. Serotipos

La distribución de serotipos entre los 45 aislados seleccionados fue: 14; 22 % (n=10); 6B; 17,7 % (n=8); 19A; 13 % (n=6); 19F; 11 % (n=5); 11A; 6,6 % (n=3); 9V; 6,6 % (n=3); 15A; 6,6 % (n=3); 23F; 4,4 % (n=2); y un 11 % (n=5) distribuidos entre otros serotipos menos frecuentes (3, 31, 10A, 15C o 12F con un aislado para cada uno de ellos). Cabe destacar que nueve de los diez aislados pertenecientes al serotipo 14 eran portadores del gen *mef*(E) o *mef*(A) (fig 4.4).

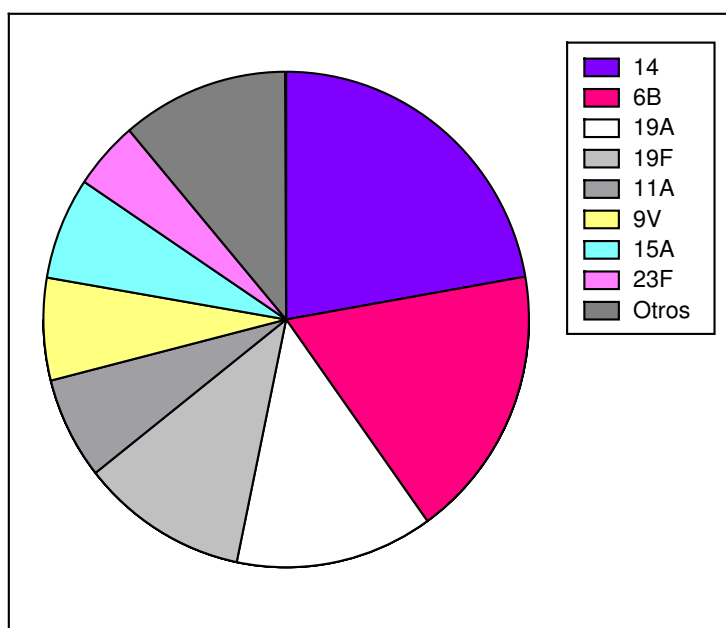


Figura 4.4: Distribución de serotipos entre los aislados de la colección prevacunal resistentes a eritromicina y con amplificación positiva para los genes *mef* (n=45)

4.1.3.2. Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

Entre la población analizada por PFGE, los aislados con amplificación positiva para los genes *mef*, empleando los criterios de Tenover [134] se diferenciaron 26 patrones que pudieron agruparse en 20 tipos diferentes. Mediante la clasificación de la red epidemiológica de neumococo (PMEN) [142] se observaron patrones correspondientes a los clones Spain^{9V}-3, England¹⁴-9, Spain^{6B}-2, Sweden^{15A}-25, Spain^{23F}-1, Poland^{6B}-20 y Norway^{NT}-42. El número de aislados de cada uno de ellos y su relación con los determinantes genéticos de resistencia se recoge en la tabla 4.3. El patrón de campo pulsado correspondiente al aislado portador del gen *mef*(A) fue el England¹⁴-9, mientras que todos los aislados agrupados por el patrón de PFGE Spain^{9V}-3 portaban el gen *mef*(E) como determinante genético de resistencia a los macrólidos. Los resultados correspondientes a PFGE se muestran en la tabla 4.3.

4.1.3.3. MLST y análisis por eBurst

Mediante la aplicación de la técnica de tipado MLST se describieron 30 secuencias tipo (ST) diferentes, entre las que se encontraban tres ST de nueva descripción, ST2636 y ST2637, variante de alelo única (*single locus variant, slv*) de la ST557 (previamente descrita) y la ST2638, variante de doble alelo (*double locus variant, dlv*) de la ST135, también previamente descrita.

Tras el análisis mediante eBurst de estas STs se observó que los aislados que portaban los genes *mef* se agrupaban en 4 complejos clonales y 19 clones individuales o *singleton clones*.

Dentro de estos cuatro complejos clonales se agruparon 18 aislados, 10 de ellos portaban únicamente el gen *mef*(E) y se identificaban por secuencia tipo (ST) con el clon internacional de resistencia Spain^{9V}-3. Los ocho aislados restantes se agruparon según las STs obtenidas en los clones internacionales de resistencia Spain^{6B}-2 (n=3), Sweden^{15A}-25 (n=2) y en el complejo clonal 6B, que agrupaba tres aislados en dos secuencias tipo, la ST135 y la ST1638. Todos estos ocho aislados presentaron amplificación positiva para los genes *erm*(B) y *mef*(E).

Los 19 clones individuales agruparon a los 27 aislados restantes. Se describieron algunos clones de multirresistencia internacional como el Spain^{23F}-1 (que incluyó dos aislados portadores de los genes *erm*(B) y *mef*(E)), Poland⁶-20 (que estaba formado por un único aislado con doble mecanismo de resistencia, *erm*(B)+*mef*(E) genes) y el clon England¹⁴-9 descrito en el único aislado portador del gen *mef*(A).

Otros clones representados por las STs ST276, ST549 y ST62 agrupaban más de un aislado por clon (4, 3 y 3 aislados cada una de ellas) mientras que otras STs estaban representadas por un sólo aislado de *S. pneumoniae*. La relación entre las STs obtenidas, el análisis por e-Burst y los determinantes genéticos de resistencia a los macrólidos se muestra en la tabla 4.3. La representación mediante MST (*Minimum Spanning Tree*) se muestra en la figura 4.5

Analizando la distribución de serotipos en función de los resultados obtenidos por MLST, los serotipos 6B, 14, 19A y 15A se encontraban distribuidos entre aislados que se agruparon en los clones internacionales de multirresistencia descritos con dichos serotipos, pero también se encontraron entre aislados agrupados como clones independientes

MLST		Serotipo	PFGE	Gen	Origen
ST	Grupo/Clon				
557 (n=7)	CC-Spain ^{9V} -3	14 (n=6), 19A (n=1)	Spain ^{9V} -3	<i>mef</i> (E)	Espuito (n=5), Oído (n=1), Hemocultivo (n=1)
44 (n=1)		14		<i>mef</i> (E)	Nasal
2636 (n=1)		19A		<i>mef</i> (E)	Espuito
2637 (n=1)		14		<i>mef</i> (E)	LBA
90 (n=1)	CC-Spain ^{6B} -2	6B	Spain ^{6B} -2	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	Espuito
1542 (n=1)		6B		<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	Espuito
1624 (n=1)		6B		<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	Espuito
135 (n=2)	ST135-ST2638	6B	6B-ST135-ST2638	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	Espuito (n=2)
2638 (n=1)		6B		<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	Nasal
63 (n=1)	CC-Sweden ^{15A} -25	15A	Sweden ^{15A} -25	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	Hemocultivo
1149 (n=1)		15A		<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	Conjuntival
¹ 276 (n=4)	ST276	19A	19A-ST276	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	Conjuntival
549 (n=3)	ST549	19F (n=2), 23F (n=1)	19F-23F-ST549	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	Oído (n=2), Catéter (n=1)
62 (n=3)	ST62	11A	11A-ST62	<i>mef</i> (E)	LBA, Cepillado alveolar, Conjuntival
81 (n=2)	Spain ^{23F} -1	23F, 19F	Spain ^{23F} -1	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	Asp. alveolar, Espuito
17 (n=1)	ST17	14	14-ST17	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	Espuito
73 (n=1)	ST73	15A	15A-ST63	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	Espuito
87 (n=1)	ST87	19F	19F-ST87	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	Nasal
260 (n=1)	ST260	3	3-ST260	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	Líquido pleural
271 (n=1)	ST271	19F	19F-ST271	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	Espuito
315 (n=1)	Poland ^{6B} -20	6B	Poland ^{6B} -20	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	Espuito
344 (n=1)	Norway ^{NT} -42	9V	Norway ^{NT} -42	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	Espuito
1486 (n=1)	ST1486	6B	6B-ST1486	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	Espuito
1577 (n=1)	ST1577	15C	15C-ST1577	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	Espuito
2639 (n=1)	ST2639	10A	10A-ST2639	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	Asp. alveolar
2820 (n=1)	ST2820	12F	12F-ST2820	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	Espuito
9 (n=1)	England ¹⁴ -9	14	England ¹⁴ -9	<i>mef</i> (A)	Oído
2819 (n=1)	ST2819	9V	9V-ST2819	<i>mef</i> (E)	Nasal
2708 (n=1)	ST2708	31	31-ST2708	<i>mef</i> (E)	Conjuntival
2822 (n=1)	ST2822	9V	9V-ST2822	<i>mef</i> (E)	Espuito

¹: s/v del clon Denmark¹⁴-32

CC: Complejo clonal

Tabla 4.3: Análisis poblacional de los aislados con amplificación positiva para los genes *mef* de la colección prevacunal (n=45)

4.1.4. Corresistencia, multirresistencia y su relación con la estructura poblacional

El análisis de la corresistencia y multirresistencia en los aislados con amplificación positiva para los genes *mef* (n=45) demuestra que la co-resistencia de eritromicina y penicilina (82,2%) se detectó entre los aislados agrupados en los complejos clonales Spain^{9V}-3, Spain^{6B}-2 y CC-6B (rango de CMI 0,12-4m g/L). El único aislado con un valor intermedio para la cefotaxima (MIC 4 mg/L), que también presentaba una CMI elevada (aunque sensible por punto de corte) para levofloxacino (2 mg/L), pertenecía al complejo clonal Spain^{9V}-3. Todos los aislados estudiados menos ocho, que pertenecían al complejo clonal Spain^{9V}-3, fueron resistentes a tetraciclina. El patrón de sensibilidad de los aislados agrupados en complejos clonales se muestra en la tabla 4.4.

Complejos Clonales	Número de aislados resistentes (I+R)					Genotipo
	Penicilina	Cefotaxima	Clindamicina	Tetraciclina	Levofloxacino	
Spain ^{9V} -3 (n=10)	2+8	3+1	0	2+0	0+1	10 <i>mef</i> (E)
Spain ^{6B} -2 (n=3)	0+3	1+0	0+3	0+3	0	3 <i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)
ST135-ST2638 (n=3)	3+0	0	0+3	0+3	0	3 <i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)
Sweden ^{15A} -25 (n=2)	2+0	0	0+2	0+2	0	2 <i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)

Tabla 4.4: Perfiles de resistencia a diferentes antimicrobianos entre los aislados agrupados en complejos clonales de la colección prevacunal

Entre los aislados agrupados en clones independientes (*singleton clones*) se pudieron apreciar diferencias con respecto a la co-resistencia y el genotipo de resistencia a los macrólidos que presentaban:

- Se observó un mayor proporción de corresistencia entre penicilina y eritromicina entre los aislados portadores de mecanismos duales *erm*(B) más *mef*(E) (89,2%) que entre los aislados portadores de los genes *mef*(A) o *mef*(E) (70,5%).
- Los porcentajes de resistencia a la cefotaxima fueron similares tanto para los aislados con doble amplificación de genes de resistencia a los macrólidos como para los aislados con amplificación positiva únicamente para los genes *mef*.
- Con respecto a la tetraciclina, se observó significación estadística mediante el test χ^2 ($P < 0,001$) entre los aislados con mecanismos duales *erm*(B) y *mef*(E) (92,8%), mientras que entre los aislados portadores de los genes *mef* el porcentaje de éstos resistentes a la tetraciclina fue de (29,4%). El patrón de sensibilidad de los aislados agrupados en clones independientes se muestra en la tabla 4.5.

Clones	Número de aislados resistentes (I+R)					Genotipo
	Penicilina	Cefotaxima	Clindamicina	Tetraciclina	Levofloxacino	
Denmark ¹⁴ -32 (n=4)	2+2	0	0+4	0+4	0	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)
ST549 (n=3)	1+0	0	0+3	0+3	0	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)
ST62 (n=3)	0	0	0	0	0	<i>mef</i> (E)
Spain ^{23F} -1 (n=2)	0+2	0+1	0+2	0+2	0	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)

Tabla 4.5: Perfiles de resistencia a diferentes antimicrobianos entre los aislados agrupados en clones independientes de la colección prevacunal

La multirresistencia se definió como resistencia simultánea a tres o más antibióticos

pertencientes a diferentes familias. Los fenotipos de multirresistencia más frecuentes fueron eritromicina, clindamicina y tetraciclina, 57,7 % (n=26); penicilina, eritromicina y tetraciclina, 48,8 % (n=22); penicilina, eritromicina y clindamicina 44,4 % (n=20); y penicilina, eritromicina, clindamicina y tetraciclina 44,4 % (n=20).

4.2. Resistencia a macrólidos y estructura poblacional en aislados de *Streptococcus pneumoniae* pertenecientes a la colección de hemocultivos (2000-2007) obtenidos en el Hospital Universitario Ramón y Cajal.

4.2.1. Perfiles de sensibilidad

Los resultados de sensibilidad a diferentes antimicrobianos frente a los 416 aislados incluidos en esta colección quedan recogidos en la figura 4.6.

- Los antibióticos β -lactámicos estudiados fueron penicilina y cefotaxima, con porcentajes de resistencia de 22,8 % (17,8 % intermedio; 5 % resistente) y 6,9 % (6,2 % intermedio; 0 % resistente) respectivamente.
- Se encontró un 18,2 % de aislados resistentes a eritromicina (n=78), sin encontrarse aislados con criterio de interpretación intermedio y observándose una tendencia a disminuir, a lo largo del periodo de estudio, estadísticamente significativa ($P=0,025$) –ver fig. 4.7–, mientras que el porcentaje de resistencia a la clindamicina fue menor, 17,3 % (72/416) sin encontrarse tampoco aislados con criterio de interpretación intermedio. La resistencia a tetraciclina fue del 18,3 % (1,7 intermedio; 16,6 % resistente) y para levofloxacino de 0,24 %.
- Se observó una tendencia a la disminución en las tasas de resistencia a lo largo del periodo de estudio. Esta tendencia fue estadísticamente significativa (según el test de Mantel-Haenszel) en el caso de la penicilina G ($P=0.0015$), de la cefotaxima ($P=0.009$) y de la eritromicina ($P=0.025$).

Entre los 78 aislados que fueron resistentes a la eritromicina se determinó la CMI frente a diferentes antibióticos mediante el sistema de microdilución comercial, siendo los resultados de resistencia obtenidos mayores que los obtenidos sobre la población total:

- Entre los antibióticos β -lactámicos estudiados, el porcentaje de resistencia a penicilina fue de 60,2 % (32 % intermedio; 28,2 % resistente), a cefotaxima 29,5 % (20,5 % intermedio; 9 % resistente).
- Se estudió el perfil de sensibilidad a claritromicina, siendo el 100 % de los aislados resistente a este macrólido de 14 átomos.
- La resistencia a tetraciclina entre los aislados resistentes a eritromicina ascendió a 80,7 % (6,4 % intermedio; 74,3 % resistente) y para levofloxacino sólo se encontró un aislado recogido en el año 2005 presentó una CMI de 8 mg/ml (fig. 4.8).
- Aunque se observó entre los aislados resistentes a eritromicina, una tendencia a disminuir en las tasas de resistencia a los antibióticos estudiados a lo largo del periodo de estudio (2000-2007), el test de Mantel-Haenszel no demostró significación

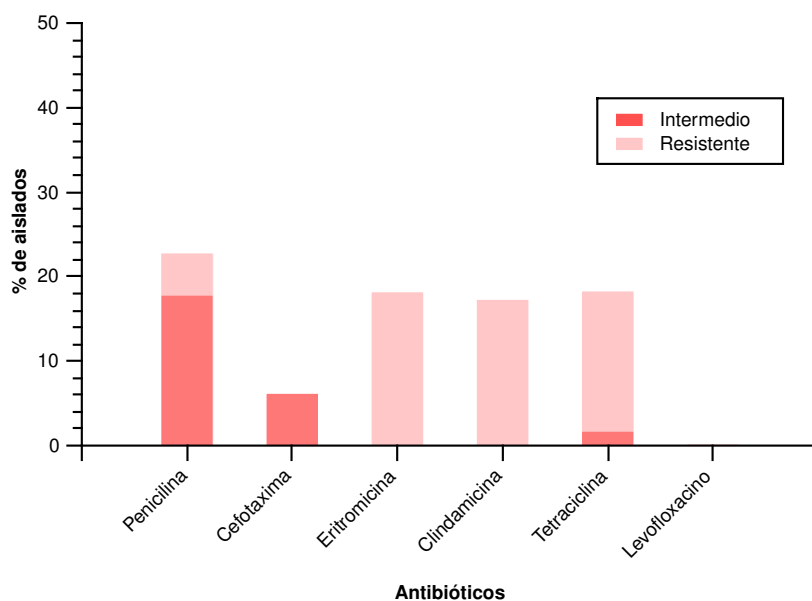


Figura 4.6: Resistencia a antibióticos de los aislados de la colección general de hemocultivos (n=416)

estadística.

4.2.2. Determinantes genéticos de resistencia y fenotipos asociados

4.2.2.1. Macrólidos

Entre los 78 aislados resistentes a los macrólidos, el 74,4 % (n=58 aislados) portaba el gen *erm(B)* como único determinante genético de resistencia, con un fenotipo de resistencia asociado MLS_B inducible en el 79,4 % de los aislados (46/58) y constitutivo en un 20,6 % (12/58).

El 7,7 % (n=6) portaban los genes *mef*, cinco de ellos aislados portaban el gen *mef(E)* y sólo uno el gen *mef(A)*, presentando todos ellos el fenotipo de resistencia asociado M.

En el 17,9 % (n=14) de los aislados resistentes a la eritromicina se observó amplificación positiva para los genes de resistencia *erm(B)* y *mef(E)*. En el 85,7 % de éstos (12/14) se observó un fenotipo de resistencia asociado MLS_B inducible, mientras que en el 14,3 % (2/14) fue constitutivo (tab: 4.6).

No se observó ninguna asociación temporal entre los aislados que presentaron ampliaciones duales ni tampoco entre los aislados que presentaron amplificación a un único determinante genético de resistencia.

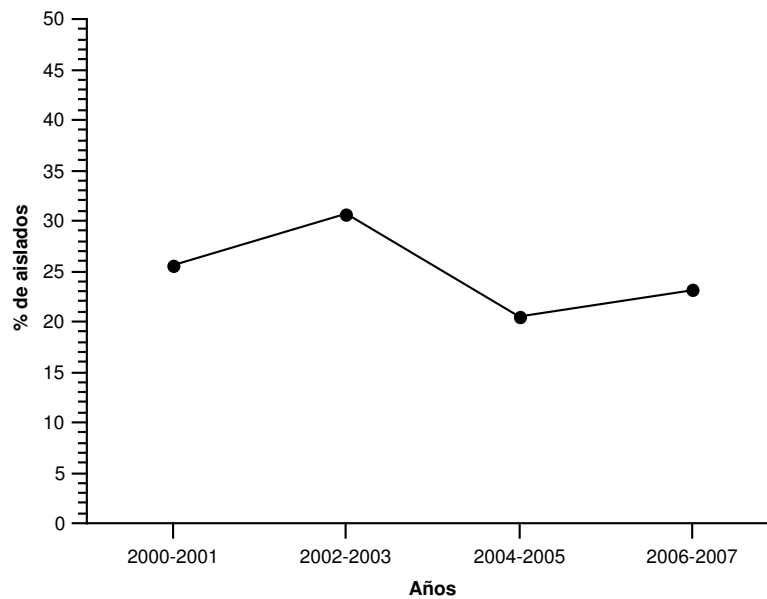


Figura 4.7: Tendencia de la resistencia a eritromicina a lo largo de los años en los que se coleccionaron los aislados procedentes de hemocultivos

Fenotipo	Genotipo - nº de aislados (%)			
	<i>erm(B)</i> (n=58)	<i>erm(B)+mef(E)</i> (n=14)	<i>mef(E)</i> (n=6)	<i>mef(A)</i> (n=1)
cMLS _B	12 (20,6)	2 (14,3)	-	-
iMLS _B	46 (79.4)	12 (85.7)	-	-
M	-	-	5 (6,4)	1 (1.2)

Tabla 4.6: Determinantes genéticos de resistencia a los macrólidos y fenotipos asociados entre los aislados resistentes a macrólidos de la colección de hemocultivos

4.2.2.2. Tetraciclina

Se observó amplificación positiva para el gen *tetM* en el 48,7% (38/78) de los aislados de esta colección. Entre los aislados que portaban el gen *erm(B)* (n=58), el 51,7% (30/58) presentó amplificación positiva para el gen *tetM*, siendo resistentes a tetraciclina el 91,3% (53/58) de ellos.

Entre los aislados que portaban los genes de resistencia para los macrólidos *erm(B)* y *mef(E)* (n=14) presentaron amplificación positiva para el gen *tetM* el 57,4% (8/14), siendo resistentes a tetraciclina en 78,5% (11/14) de ellos.

Por último, ninguno de los seis aislados de *S. pneumoniae* con amplificación positiva únicamente para los genes *mef* presentó amplificación positiva para el gen *tetM*, ni resistencia a la tetraciclina. La distribución de amplificaciones positivas para este gen en función del determinante genético de resistencia para los macrólidos, así como de la

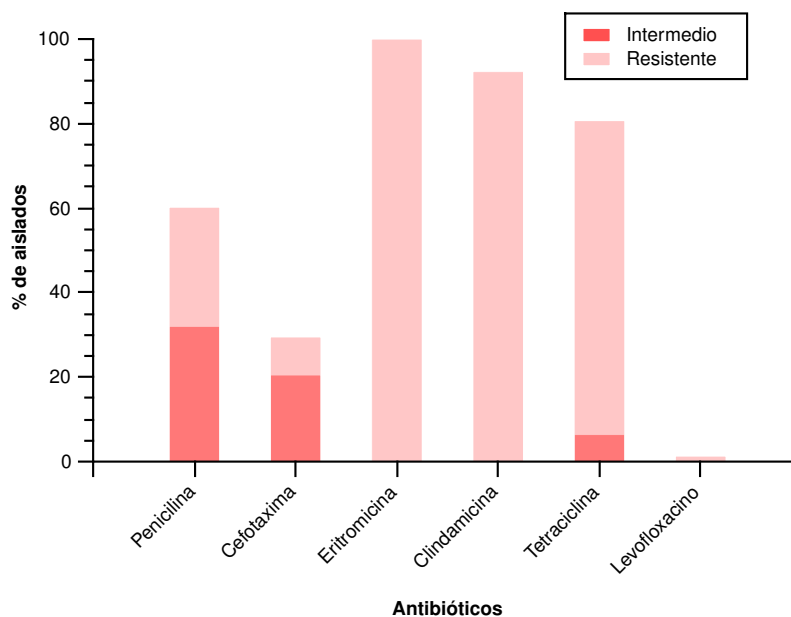


Figura 4.8: Resistencia a diferentes antibióticos de los aislados resistentes a eritromicina de la colección de hemocultivos (n=78)

sensibilidad a la tetraciclina se muestra en la tabla 4.7.

Genotipo resistencia macrólidos	Amplificación <i>tetM</i> (<i>tetM</i> + %)
<i>erm</i> (B) (n=58)	51,7% (30/58)
<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E) (n=14)	57,4% (8/14)
<i>mef</i> (E) (n=5)	0%
<i>mef</i> (A) (n=1)	0%

Tabla 4.7: Distribución del gen *tetM* en función de los determinantes genéticos de resistencia a los macrólidos entre los aislados de la colección de hemocultivos

4.2.3. Estructura poblacional en aislados con genes *mef*

4.2.3.1. Serotipos

Los serotipos en los que mayoritariamente se agruparon los aislados de *S. pneumoniae* pertenecientes a esta colección fueron: 14; 18% (n=14), 19A; 15,4% (n=12), 6B; 11,5% (n=9), 19F; 7,7% (n=6), 6A; 5% (n=4), 4; 5% (n=4), 11A; 5% (n=4) y 8; 5% (n=4). El 27% de los aislados restantes se agruparon entre otros serotipos como 23A (n=3), 9V, 15A, 15B, 16 y 23F representados por dos aislados cada uno de ellos y 1, 3, 10A, 18C, 24 y 33 representados por un aislado cada uno de ellos. No fue posible tipar dos de estos aislados. (fig. 4.9).

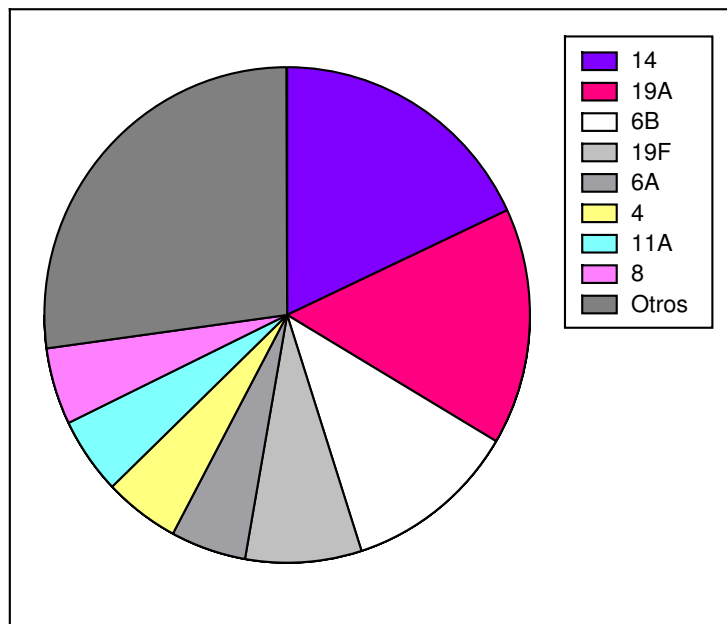


Figura 4.9: Distribución de serotipos de los aislados de la colección de hemocultivos

La presencia de los serotipos incluidos en la vacuna conjugada heptavalente (PCV-7) tuvo tendencia a disminuir a lo largo del periodo de estudio, con valores estadísticos (según el test de Mantel-Haenszel), próximos a la significación ($P=0,052$).

4.2.3.2. Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

Mediante la aplicación de los criterios de Tenover [134] se definieron 39 patrones diferentes. Con la aplicación de la clasificación de clones internacionales de multirresistencia (PMEN) [142] se definieron los clones internacionales de multirresistencia Spain^{9V}-3, Denmark¹⁴-32, Spain^{6B}-2, Sweden^{15A}-25, England¹⁴-9 y Tennessee¹⁴-18. La distribución de los patrones detectados por PFGE conforme a los genes de resistencia a los macrólidos se muestra en la tabla 4.8.

4.2.3.3. MLST y análisis por eBurst

Mediante la técnica de MLST los aislados de *S. pneumoniae* resistentes a eritromicina se agruparon en 27 secuencias tipo (ST) diferentes, sin describirse ninguna nueva. Aplicando el programa de análisis e-BURST los aislados se agruparon en cuatro complejos clonales (sin ST fundadora) y 19 clones independientes o *singleton clones*.

El complejo clonal que agrupó más número de aislados (16 aislados) fue el Spain^{9V}-3. De éstos 16 aislados, 12 pertenecían a la ST557, que es una variante doble (*double locus variant, dlv*) de la ST que define este complejo clonal (ST156), mientras que las cuatro ST restantes pertenecían a la ST2246, *slv* de la ST156.

Dentro de este complejo clonal, el 43,7% de los aislados (7/16) portaban el gen

erm(B), el 12,5% (2/16) el gen *mef(E)* y el 18,7% (3/16) portaban simultáneamente los genes *erm(B)* y *mef(E)*.

El segundo complejo clonal en número de aislados ($n=12$) fue el Denmark¹⁴-32. De éstos 12 aislados, sólo uno pertenecía a la ST que define este clon (ST230), mientras que los otros 11 (91,6%) pertenecían a la ST276 (*s/v* ST230). Todos ellos mostraron amplificación positiva para el gen *erm(B)*.

El tercer complejo clonal estaba formado por nueve aislados y pertenecía al clon Spain^{6B}-2. De éstos, ocho (88,8%) pertenecían a la ST90, que define dicho clon, y portaban el gen *erm(B)*, mientras que el aislado restante pertenecía a la ST1624 (*s/v* ST90) y mostró amplificación positiva para ambos genes, *erm(B)* y *mef(E)*.

El último complejo clonal estaba formado por dos aislados, ambos portaban el gen *mef(E)* y pertenecían a las ST62 y ST55.

Entre los 19 clones independientes se encontraron algunos clones internacionales de resistencia como Sweden^{15A}-25 ($n=7$), England¹⁴-9 ($n=2$) y Tennessee¹⁴-18 ($n=1$). Los genotipos *erm(B)* y el dual, *erm(B)* más *mef(E)* se encontraron en 18 de los 19 clones independientes. El clon restante, England¹⁴-9, estaba formado por dos aislados, portadores de los genes *mef(A)* y *mef(E)*, respectivamente. En la tabla 4.8 se muestran los resultados conforme a serotipos, análisis por e-BURST, PFGE y año de aislamiento y en la figura 4.10 se muestra la representación mediante MST (*Minimum Spanning Tree*) conforme al análisis por e-Burst y determinante genético de resistencia.

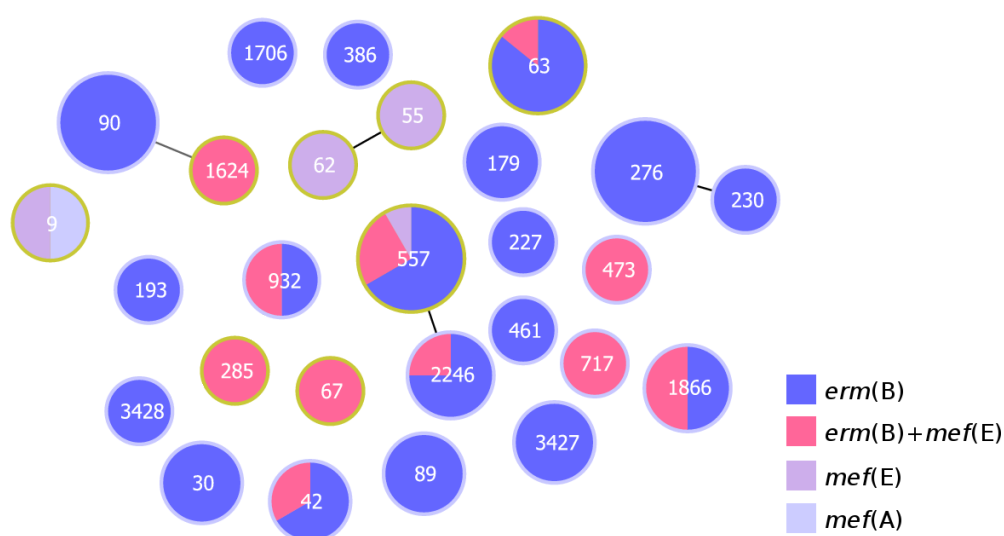


Figura 4.10: Relación entre el análisis por eBurst y lods determinantes genéticos de resistencia a macrólidos mediante *Minimum Spanning Tree* en los aislados de la colección de hemocultivos

ST	MLST		PFGE	Gen	Año
	Grupo/Clon	Serotipo			
557	Spain ^{9V} -3	14	Spain ^{9V} -3	<i>erm</i> (B)	2000 (n=1)
				<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	2001 (n=3)
				<i>mef</i> (E)	2002 (n=3)
		19F		<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	2003 (n=2)
				<i>mef</i> (E)	2002 (n=1)
				<i>mef</i> (E)	2003 (n=1)
2246	Spain ^{9V} -3	11A	Spain ^{9V} -3	<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	2003 (n=1)
				<i>erm</i> (B)	2003 (n=1)
				<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	2007 (n=1)
		9V		<i>erm</i> (B)	2004 (n=1)
276	Denmark ¹⁴ -32	19A	Denmark ¹⁴ -32	<i>erm</i> (B)	2000 (n=3)
					2001 (n=1)
					2002 (n=1)
					2004 (n=1)
					2005 (n=2)
					2007 (n=3)
230		24		<i>erm</i> (B)	2005 (n=1)
90	Spain ^{6B} -2	6B	Spain ^{6B}	<i>erm</i> (B)	2000 (n=3)
					2001 (n=2)
					2002 (n=3)
1624				<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	2003 (n=1)
62	Grupo 4	19A	19A-11A-ST62	<i>mef</i> (E)	2003 (n=1)
55		11A	19A-11A-ST55		2006 (n=1)
63	Sweden ^{15A} -25	15A	Sweden ^{15A} -25	<i>erm</i> (B)	2001 (n=1)
		15A			2005 (n=2)
		8			2007 (n=2)
		NT			2005 (n=1)
		15A			<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E) (n=1)
1866	ST1866	4	4-ST1866	<i>erm</i> (B)	2001 (n=2)
				<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	2002 (n=1)
				<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	2006 (n=1)
3427	ST3427	6A	6A-ST3427	<i>erm</i> (B)	2001 (n=1)
					2004 (n=1)
					2006 (n=1)
30	30A	16	16-19A-ST30	<i>erm</i> (B)	2002 (n=1)
		9V			2005 (n=1)
					2000 (n=1)
89	ST89	19F	19F-ST89	<i>erm</i> (B)	2002 (n=2)
					2005 (n=1)
42	ST42	23A	23A-ST42	<i>erm</i> (B)	2002 (n=2)
				<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	2007 (n=1)
179	ST179	19F	19F-ST179	<i>erm</i> (B)	2005 (n=1)
					2007 (n=1)
932	ST932	23F	23F-ST932	<i>erm</i> (B)	2006 (n=1)
				<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	2007 (n=1)
9	England ¹⁴ -9	14	England ¹⁴ -9	<i>mef</i> (E)	2006 (n=2)
				<i>mef</i> (A)	
193	ST-193	15B	15B-ST193	<i>erm</i> (B) (n=1)	2006 (n=1)
227	ST-227	1	1-ST193	<i>erm</i> (B) (n=1)	2005 (n=1)
386	ST-386	3	3-ST386	<i>erm</i> (B) (n=1)	2006 (n=1)
461	ST-461	10A	10A-ST461	<i>erm</i> (B) (n=1)	2000 (n=1)
1706	ST-1706	15B	15B-ST1706	<i>erm</i> (B) (n=1)	2005 (n=1)
3428	ST-3428	NT	ST3428	<i>erm</i> (B) (n=1)	2002 (n=1)
67	Tennessee ¹⁴ -18	14	Tennessee ¹⁴ -18	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E) (n=1)	2003 (n=1)
285	ST-285	18C	18C-ST227	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E) (n=1)	2006 (n=1)
473	ST-473	6A	6A-ST473	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E) (n=1)	2005 (n=1)
717	ST-717	33	33-ST717	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E) (n=1)	2003 (n=1)

Tabla 4.8: Análisis poblacional de los aislados con amplificación positiva para los genes *mef* de la colección de hemocultivos

4.2.4. Corresistencia, multirresistencia y su relación con la estructura poblacional

Entre los aislados de *S. pneumoniae* recogidos de hemocultivos entre los años 2000 y 2007 (n=416) se observó multirresistencia en 38 aislados siendo los fenotipos más frecuentes: eritromicina, clindamicina y tetraciclina 3,4 % (n=14); penicilina, eritromicina, clindamicina y tetraciclina 3,1 % (n=13) y penicilina, eritromicina y tetraciclina 2,2 % (n=9).

Entre los 78 aislados que formaban la población de *S. pneumoniae* resistentes a eritromicina, la co-resistencia con penicilina fue mayor entre los aislados agrupados mediante e-BURST en complejos clonales (79,5%), que entre los agrupados como clones independientes (41 %).

La corresistencia entre eritromicina y tetraciclina también fue similar entre los aislados agrupados en complejos clonales, 82,0 % (32/39) y entre los agrupados como clones, 86,2 % (25/29) y clones independientes, y 70,0 % (7/10). Con respecto a la cefotaxima sólo se observó co-resistencia en dos aislados, con una CMI de 4 mg/ml cada uno, perteneciendo cada uno de ellos a un complejo clonal diferente.

- Entre los aislados clasificados en complejos clonales (n=39), las tasas de corresistencia con penicilina como con tetraciclina que se encontraron entre los aislados que presentaron amplificación positiva para el gen *erm(B)* (n=31) fueron (80,6 % (25/31) y 93,5 % (29/31) respectivamente. Entre los aislados que presentaron amplificación positiva para los genes *erm(B)* y *mef(E)* (n=4) las tasas de corresistencia con penicilina y tetraciclina respectivamente fueron (100 % y 75 % (3/4) respectivamente, encontrándose sólo co-resistencia con penicilina (50 %) en el caso de los aislados con amplificación positiva para los genes *mef*. Cabe destacar que los aislados pertenecientes al complejo clonal 4 (ST55 y ST62) no presentaron resistencia ni frente a penicilina ni frente a tetraciclina
- Entre los aislados agrupados como clones independientes (n=39), considerando tanto los clones que agruparon más de un aislado (n=29 aislados) como los clones formados por un único aislados (n=10 aislados), las mayores tasas de co-resistencia tanto a penicilina como a tetraciclina se encontraron también entre los aislados portadores de los genes *erm(B)* y *mef(E)* (n=9), 44,4 % (4/9) y 66,6 % (6/9) respectivamente, seguida de los aislados que presentaban el gen *erm(B)* (n=28), 39,1 % (11/28) y 89,3 % (25/28) respectivamente. Por último, sólo se observó co-resistencia con penicilina (50 %) en el caso de los aislados con amplificación positiva para los genes *mef* (n=2), siendo el aislado resistente (CMI 0,12 mg/L) el aislado portador del gen *mef(E)* 4.9.
- Entre los aislados pertenecientes al clon Sweden^{15A}-25 (n=4), sólo el 25 % presentó co-resistencia con la penicilina, mientras que 100 % fue resistente a la tetraciclina. El aislado identificado como perteneciente al clon internacional de multirresistencia Tennessee¹⁴-18 presentó co-resistencia tanto con penicilina como con tetraciclina 4.10.
- Por último, la asociación entre la resistencia a eritromicina y tetraciclina fue estadísticamente significativa mediante el test de la χ^2 ($P < 0,001$), en comparación con la resistencia a tetraciclina entre los aislados sensibles a eritromicina

Clones	Número de aislados resistentes (I+R)					Genotipo
	Penicilina	Cefotaxima	Clindamicina	Tetraciclina	Levofloxacino	
Sweden ^{15A} -25 (n=7)	2+0	0	0+7	0+7	0	6 <i>erm</i> (B) 1 <i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)
ST1866 (n=4)	0+1	0+1	0+4	0+3	0	2 <i>erm</i> (B) 2 <i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)
ST89 (n=3)	1+2	0	0+3	0+3	0	3 <i>erm</i> (B)
ST3427 (n=3)	0+1	0+1	0+3	0+3	0	3 <i>erm</i> (B)
ST42 (n=3)	0	0	0+3	0+2	0	3 <i>erm</i> (B) 1 <i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)
ST30 (n=3)	1+1	0+1	0+3	0+3	0	3 <i>erm</i> (B)
ST179 (n=2)	0	0	0+2	0+2	0	2 <i>erm</i> (B)
ST932 (n=2)	1+1	1+0	0+2	0+2	0	1 <i>erm</i> (B) 1 <i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)
England ¹⁴ -9 (n=2)	1+0	0+1	0	0	0	1 <i>mef</i> (E) 1 <i>mef</i> (A)

Tabla 4.9: Perfiles de resistencia a diferentes antimicrobianos entre los aislados agrupados en clones de la colección de hemocultivos

Singleton Clones	Número de aislados resistentes (I+R)					Genotipo
	Penicilina	Cefotaxima	Clindamicina	Tetraciclina	Levofloxacino	
SC (n=10)	4+0	0	0+10	1+6	0	6 <i>erm</i> (B) 4 <i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)

Tabla 4.10: Perfiles de resistencia a diferentes antimicrobianos entre los aislados agrupados en *singleton clones* de la colección de hemocultivos

4.3. Estudio de la estructura poblacional mediante el sistema semiautomático DiversiLab®

Para completar el análisis de la estructura poblacional y obtener una imagen de ésta mediante otra técnica de tipado se empleó el sistema comercial semiautomático DiversiLab®. Este sistema se basa en la realización de repPCR.

Para la realización de la técnica de las dos colecciones anteriormente analizadas, se seleccionaron aislados representativos, tanto por su pertenencia a complejos clonales o clones representativos definidos por MLST como por los determinantes genéticos de resistencia que presentaban.

- De la colección que incluía *S. pneumoniae* prevacunales se seleccionaron 43 aislados, de los cuales 27 presentaban como genotipo de resistencia a macrólidos ambos genes *erm(B)* y *mef(E)*, 15 presentaban únicamente el gen *mef(E)* y también se incluyó el único aislado de esta colección con el gen *mef(A)*.
- De la colección procedente de hemocultivos se incluyeron 49 *S. pneumoniae*, de los cuales 29 presentaban el determinante genético de resistencia *erm(B)*, 14 la presencia concomitante de ambos genes *erm(B)* y *mef(E)*, 5 eran portadores del gen *mef(E)* y también se incluyó el único aislado de esta colección que presentaba el determinante genético de resistencia a los macrólidos *mef(A)*.

El análisis se realizó en función de los resultados obtenidos mediante eBURST. Para el agrupamiento de los aislados se identificaron los patrones de geles virtuales utilizando la aplicación informática de análisis del sistema Diversilab®. De los tres tipos de análisis para calcular los porcentajes de similitud entre las diferentes muestras que proporciona este sistema, se emplearon dos, el análisis de correlación de Pearson (PC) y el análisis Extended Jacard (XJ). El análisis se realizó de forma global con todos los aislados escogidos de cada colección y, de forma individual para cada una de las colecciones con cada complejo clonal, los clones formados por más de un aislado y los singleton clones.

4.3.1. Colección prevacunal

4.3.1.1. Análisis global

Mediante el análisis global de los 43 aislados seleccionados empleando el método de correlación de Pearson se describieron 15 patrones diferentes, 6 de los cuales se organizaron en dos grupos. El primer grupo (grupo 1) se describió formado por tres patrones (patrón 4, 5 y 6). El patrón que más aislados agrupó fue el 6, que incluyó 8 aislados, tres de ellos pertenecientes al clon Denmark¹⁴-32 y dos al clon Spain^{6B}-2. El patrón 4 agrupó seis aislados, entre ellos los tres que definieron el complejo clonal ST135-ST2638. El último patrón perteneciente a este grupo fue el patrón 5 que agrupó dos aislados uno perteneciente al complejo clonal Spain^{9V}-3 y el otro al clon Spain^{23F}-1.

El grupo 2 estaba formado también por tres patrones, el 7, 8 y 9. El más numeroso fue el 7, que agrupó a cuatro aislados, que al igual que los dos aislados que formaban el patrón 9, pertenecían al complejo clonal Spain^{9V}-14. El patrón 8 estaba formado por los tres aislados que formaban el clon ST549.

Entre el resto de patrones sólo los patrones 1 y 10 agruparon aislados pertenecientes

a un mismo clon o grupo clonal; al clon ST62 y al complejo clonal Spain^{9V}-3 respectivamente.

Entre los aislados que formaban el resto de patrones, no se encontró relación por ST, clomplejo clonal o clon (fig. 4.11).

Empleando el análisis XJ, se describieron 29 patrones diferentes, organizándose 6 de ellos en tres grupos diferentes. Formando el primer grupo se encontraron los patrones 1 y 2, cada uno de ellos compuesto por dos aislados, no relacionados entre sí. Sin embargo 2 de los aislados integrados en este grupo (pertenecientes a dos patrones diferentes) formaban parte del clon Denmark¹⁴-32 (representados por cuatro aislados). El grupo dos estaba formado por los patrones 5 y 6. El patrón más numeroso fue el 6 que comprendía 4 aislados, entre ellos 2 de los 3 aislados que formaban el complejo clonal ST135-ST2638. En el patrón 5, formado por dos aislados se encontraba el tercer representante de este complejo clonal.

El tercer grupo estaba formado por 2 patrones que a su vez contenían 2 aislados cada uno, sin relación epidemiológica o clonal por MLST entre ellos.

Entre el resto de los patrones descritos, cabe destacar que el patrón 12 agrupó 2 de los 3 aislados que pertenecían al clon ST62 y que en el resto de patrones no se encontró relación clonal entre los aislados que los formaban (en el que caso de que fuera más de uno) mientras que aislados de un mismo clon se clasificaron como patrones diferentes (fig. 4.12).

4.3.1.2. Análisis por complejos clonales y clones

4.3.1.2.1. Complejo clonal Spain^{9V}-3 Se estudiaron 10 aislados, todos ellos con el gen *mef(E)*. Empleando el coeficiente de correlación de Pearson (PC) se separaron en dos patrones principales; el primero de ellos formado por 4 aislados, tres de ellos pertenecientes a la ST557 y el restante a la ST2636. De los 4, 2 presentaban el serotipo 14 y los otros 2 el 19A. El patrón 2 estaba formado por 6 aislados, 5 de ellos pertenecientes a la ST557 con serotipo 14 y el sexto aislado perteneciente a la ST44, igualmente de serotipo 14 (fig. 4.13).

Según al análisis XJ, se definieron 4 patrones. El patrón 1 agrupó los mismos aislados que el patrón 2 definido por PC, el patrón 2 estaba formado por 2 aislados pertenecientes a las ST557 y ST2637 y a los serotipos 14 y 19A respectivamente. El patrón 3 se definió por un aislado de ST557 y serotipo 14 y el patrón 4 por un aislado de ST2636 y serotipo 19A (fig. 4.14).

4.3.1.2.2. Complejo clonal Spain^{6B}-2 Dentro de este complejo clonal se estudiaron 3 aislados, pertenecientes al serotipo 6B con el mecanismo dual *erm(B)+mef(E)*, tanto por PC como por XJ se definieron 2 patrones de gel virtual, uno agrupando los 2 aislados con ST1624 y ST1542 (ambos *dlv* de la ST90 que define el clon), y otro patrón, para el aislado perteneciente a la ST90.

4.3.1.2.3. Complejo clonal ST135-ST2638 Empleando los dos tipos de análisis PC y XJ, los 3 aislados agrupados en este complejo clonal se clasificaron en un mismo patrón

de gel virtual, aún perteneciendo 2 de ellos a la ST135 y el restante ST2638. Los 3 aislados pertenecían al serotipo 6B y portaban los genes *erm(B)* y *mef(E)*.

4.3.1.2.4. Complejo clonal Sweden^{15A-25} Los 2 aislados estudiados presentaron un patrón diferente cada uno de ellos, analizando los patrones de gel virtual por los métodos PC y XJ. Ambos pertenecen al serotipo 15A, presentaban el mecanismo dual de resistencia *erm(B)+mef(E)*, y la única diferencia era la ST a la que pertenecían, uno de ellos ST63 (que define el clon Sweden^{15A-25}) y el otro ST1149, *s/v* de ST63.

4.3.1.2.5. Clon Denmark¹⁴⁻³² Los 4 aislados agrupados en este clon (ST276), pertenecían al serotipo 19A, portaban mecanismos duales de resistencia a los macrólidos y se clasificaron como un único patrón de gel virtual por rep-PCR, analizados tanto por PC como por XJ.

4.3.1.2.6. Clon ST549 Los 3 aislados que formaban este clon se agruparon en un mismo patrón de rep-PCR, perteneciendo 2 de ellos al serotipo 23F y otro al 19F, mediante análisis por PC. Sin embargo, analizando los patrones de gel virtual por XJ, los 2 aislados pertenecientes al serotipo 23F conformaron un patrón de gel virtual y el aislado de serotipo 19F se clasificó en un patrón diferente. Estos tres aislados tenían los genes *mef(E)* y *erm(B)*.

4.3.1.2.7. Clon ST62 Se estudiaron 3 aislados, todos ellos pertenecientes al serotipo 11A y portadores del gen *mef(E)* que se agruparon mediante análisis de geles virtuales en un único patrón, mediante el análisis por PC. Mediante análisis por XJ, se definieron 2 patrones, uno formado por 2 de los aislados que formaban el único patrón definido por PC, y un segundo patrón, formado por un aislado con una imagen de gel virtual en la que se apreciaban diferencias en las bandas (fig. 4.15).

4.3.1.2.8. Clon Spain^{23F-1} Los 2 aislados estudiados pertenecían ambos a la ST81 (que define el clon), pertenecían al serotipo 23F y portaban ambos determinantes genéticos de resistencia *mef(E)* y *erm(B)*. Presentaron el mismo patrón de gel virtual empleando ambos métodos de análisis PC y XJ.

4.3.1.2.9. Clones independientes Se incluyeron 13 singleton clones representados por un sólo aislado. El análisis realizado mediante el método PC definió 6 patrones diferentes y un grupo representado por 2 patrones, no encontrando una relación entre los aislados incluidos en cada uno de los patrones con los serotipos o genes de resistencia.

El patrón más numeroso (P4) estaba compuesto por 5 aislados, 4 de ellos con los determinantes genéticos de resistencia *erm(B)* y *mef(E)* y el quinto correspondió al aislado representante del clon England¹⁴⁻⁹, perteneciente al serotipo 14 y único aislado de esta colección con el gen *mef(A)*.

El segundo patrón según número de aislados (P1) agrupaba 3 aislados, todos ellos portadores de los genes *erm(B)* y *mef(E)*, uno de ellos representante del clon Poland^{6B-}

20. Este patrón formaba un grupo con un patrón formado por un único aislado que también presentaba ambos mecanismos genéticos de resistencia.

Un tercer patrón agrupó 2 aislados, cada uno de ellos portador de mecanismos duales y del gen *mef(E)*.

Por último, se definieron dos patrones independientes más, formado por un aislado cada uno de ellos, entre los que se encontraba el aislado representante del clon Norway^{NT}-42 (fig. 4.16).

Mediante el método de análisis XJ, se definieron nueve patrones diferentes, dos de ellos (P1 y P2) agruparon 3 aislados cada uno.

El patrón 1 agrupó 3 aislados de diferentes ST (ST2322, ST271 y ST315), todos ellos con los genes *erm(B)* y *mef(E)*, entre los que se encontraba el clon Poland^{6B}-20. De los 3 aislados que formaron el patrón P2, dos de ellos tenían los genes *erm(B)* y *mef(E)*, perteneciendo a la ST260 y ST87, mientras que el tercer aislado era el único portador del gen *mef(A)*, perteneciente al clon England¹⁴-9, que se define por la ST9.

El resto de los aislados considerados dentro de un mismo patrón por el método XJ se asignaron también al mismo patrón por el método PC.

El resto de los patrones definidos estaban formados por un único aislamiento y sólo se definió un grupo entre los patrones P5 y P6 (fig. 4.17).

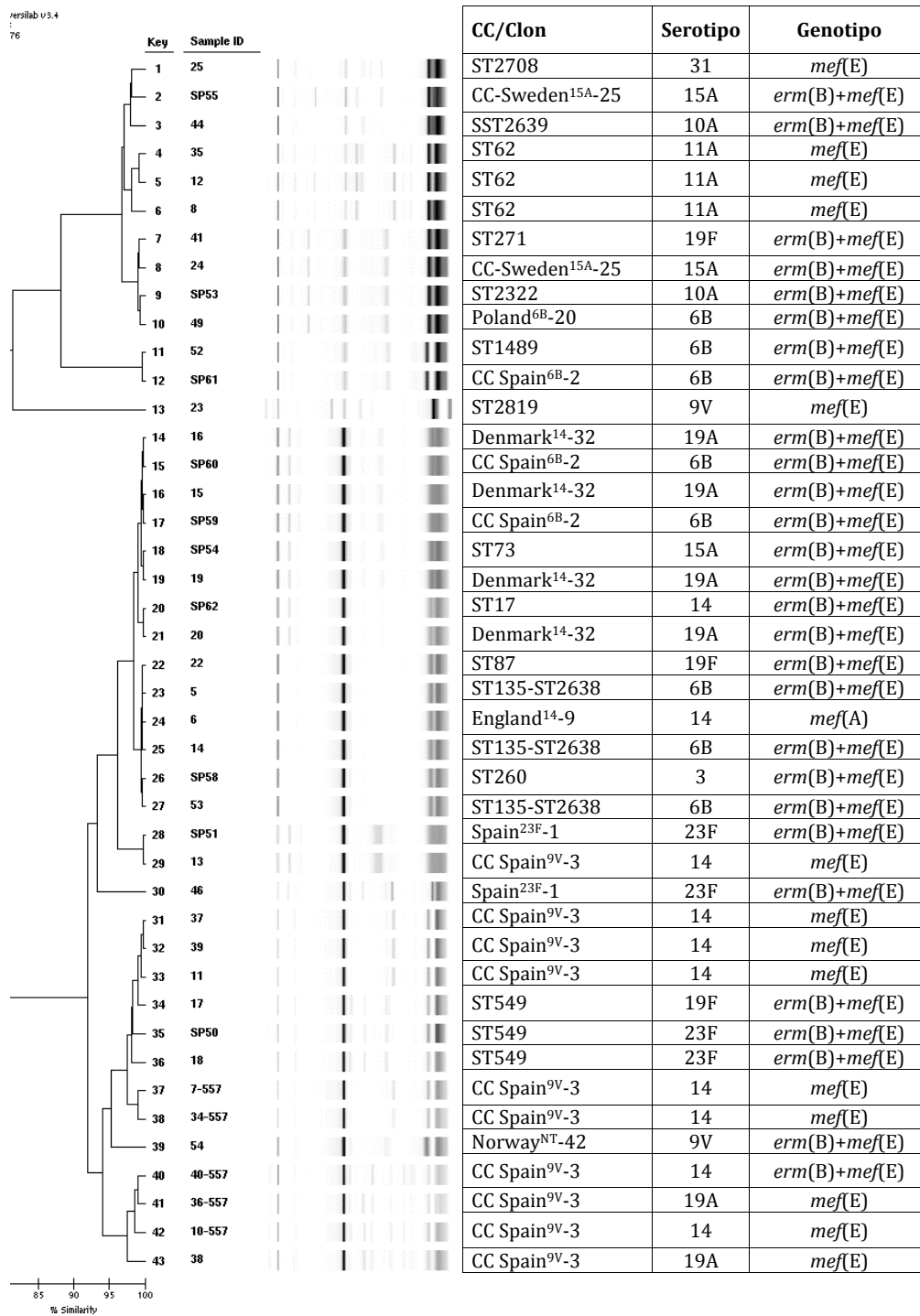


Figura 4.11: Análisis global de los resultados obtenidos mediante DiversiLab[®] por el método PC de la colección prevacunal

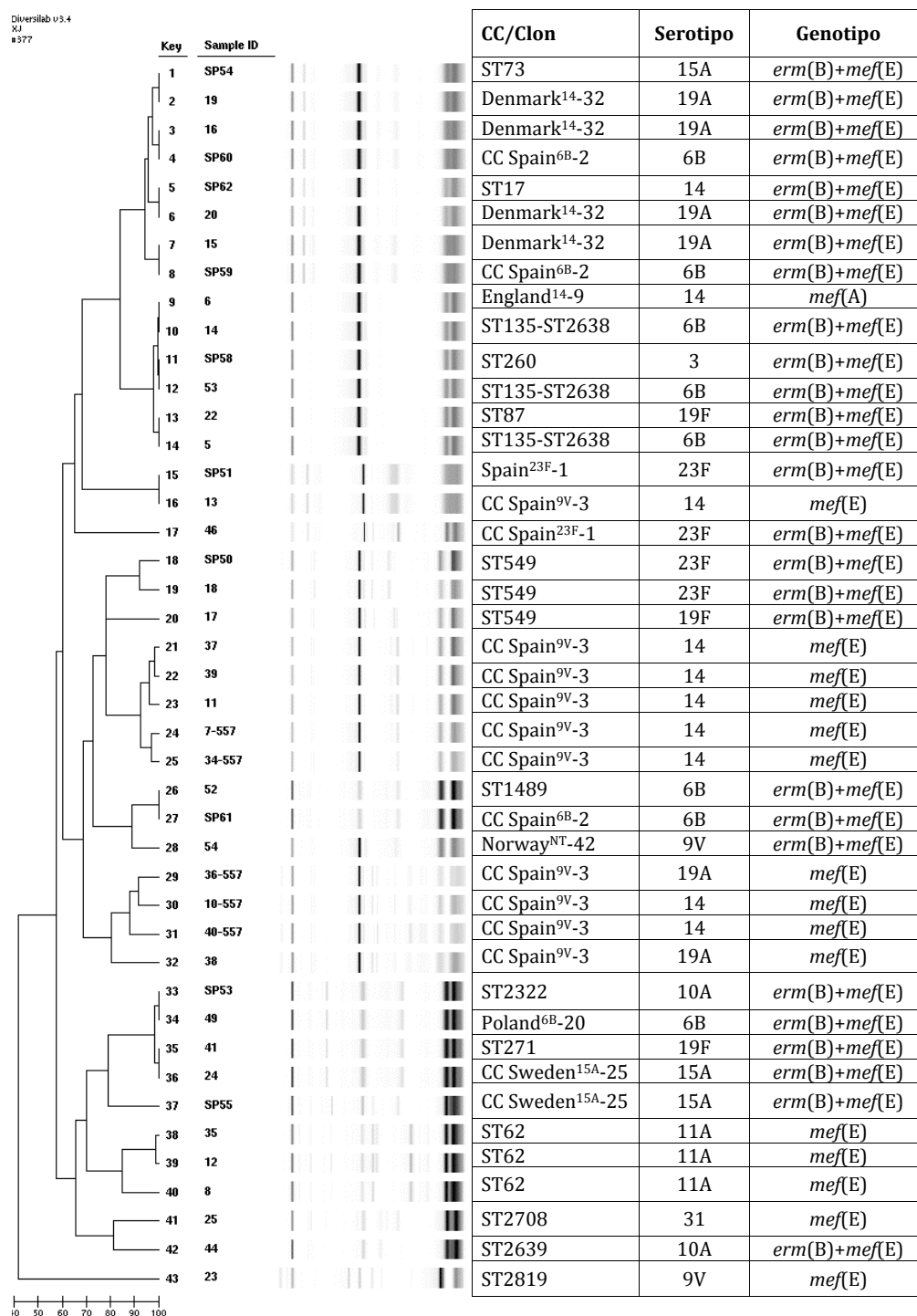


Figura 4.12: Análisis global de los resultados de DiversiLab[®] por el método XJ de la colección prevacunal

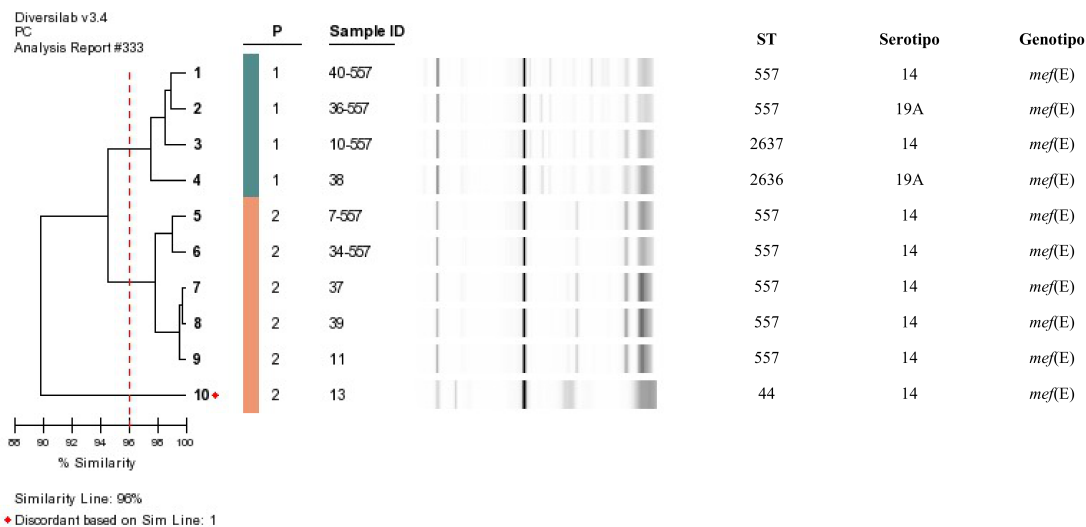


Figura 4.13: Colección prevacunal CC Spain^{9V}-3. Análisis por el método PC

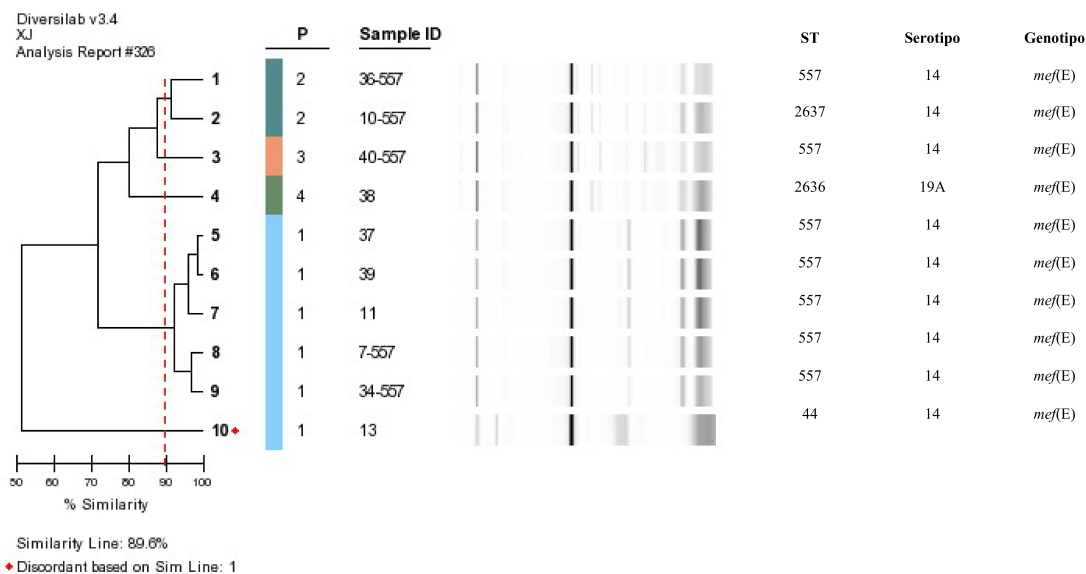


Figura 4.14: Colección prevacunal CC Spain^{9V}-3. Análisis por el método XJ

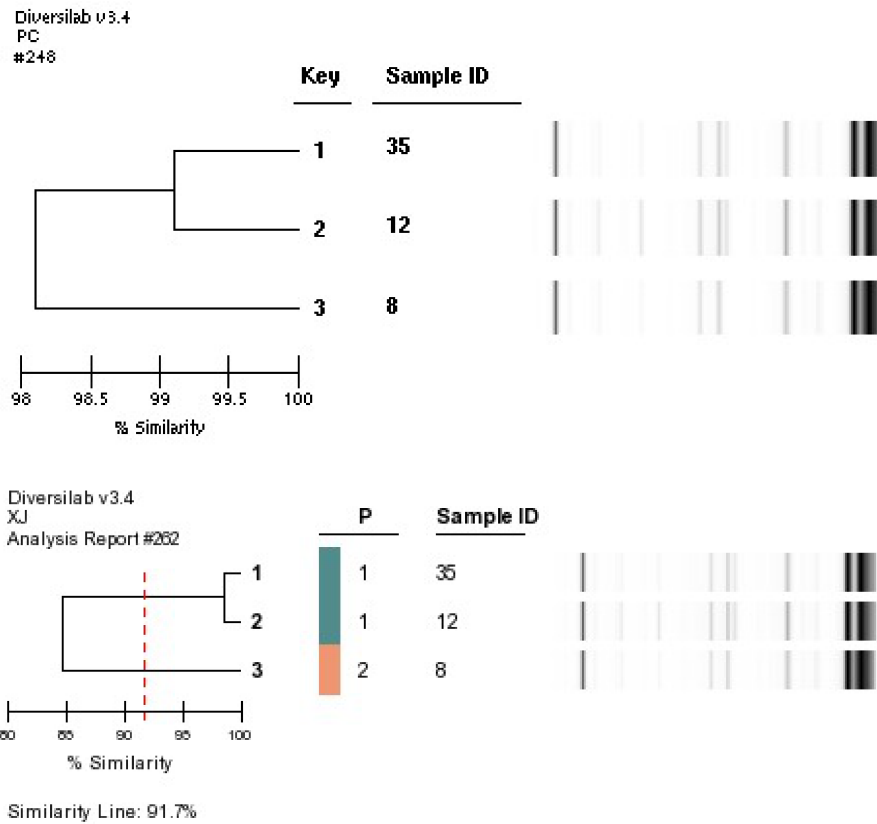


Figura 4.15: Colección prevacunal Clon ST62. Análisis por los métodos PC y XJ

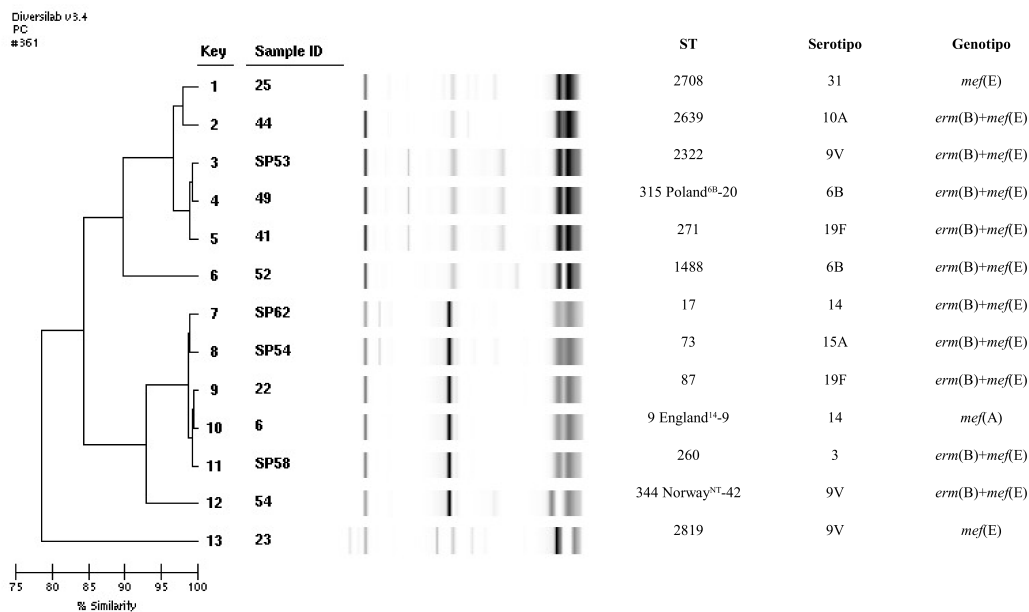


Figura 4.16: Colección prevacunal *singleton clones*. Análisis por el método PC

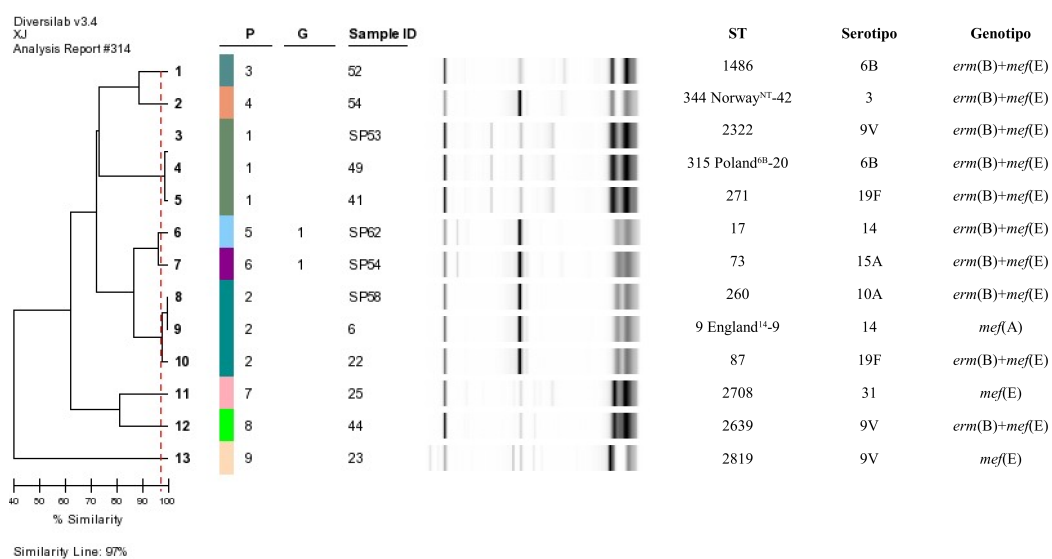


Figura 4.17: Colección prevacunal *singleton clones*. Análisis por el método XJ

4.3.2. Colección de Hemocultivos

4.3.2.1. Análisis global

Se realizó un análisis global de los 49 aislados seleccionados de la colección de hemocultivos mediante los dos métodos descritos anteriormente.

Empleando el método PC se describieron 26 patrones y dos grupos. El primer grupo estaba formado por dos patrones (patrón 7 y 8) que englobaban cada uno de ellos 3 y 2 aislados respectivamente. Cuatro de los 5 aislados formadores de este grupo pertenecían al complejo clonal Spain^{9V}-14. El grupo dos estaba formado por 4 aislados, 3 de ellos pertenecientes al complejo clonal Spain^{9V}-14 divididos en 2 patrones de 2 aislados cada uno.

Entre los patrones de DiversiLab[®] que englobaban más de un aislado se asociaron miembros de clones y complejos clonales. El patrón 1 agrupó cuatro de los cinco aislados que formaban el clon Sweden^{15A}-25. A su vez el patrón 2 agrupó los 2 aislados que formaron el complejo clonal ST55-ST62. Asimismo los patrones 4 y 6 agruparon los 3 aislados que formaban el clon ST1866 (patrón 4) el complejo clonal Spain^{23F}-1 (patrón 6) mientras que de los tres aislados que formaban el patrón 5, dos pertenecían al clon Denmark¹⁴-32. El resto de los aislados se clasificaron como patrones independientes aunque existiera relación clonal por eBURST entre ellos (fig. 4.18).

Empleando el método XJ se observó mucha menos agrupación que mediante el método anteriormente descrito ya que entre los 49 aislados se describieron 41 patrones diferentes y dos grupos. El primer grupo estaba formado por 2 patrones que agrupaban los 3 aislados pertenecientes al clon ST1866. El grupo 2 estaba formado por 2 patrones, formados a su vez por un aislado cada uno, siendo éstos los 2 aislados formadores del complejo clonal ST55-ST62.

El patrón 3 agrupó dos aislados pertenecientes al clon Sweden^{15A}-25 y los aislados restantes se distribuyeron en patrones independientes cada uno de ellos (fig. 4.19).

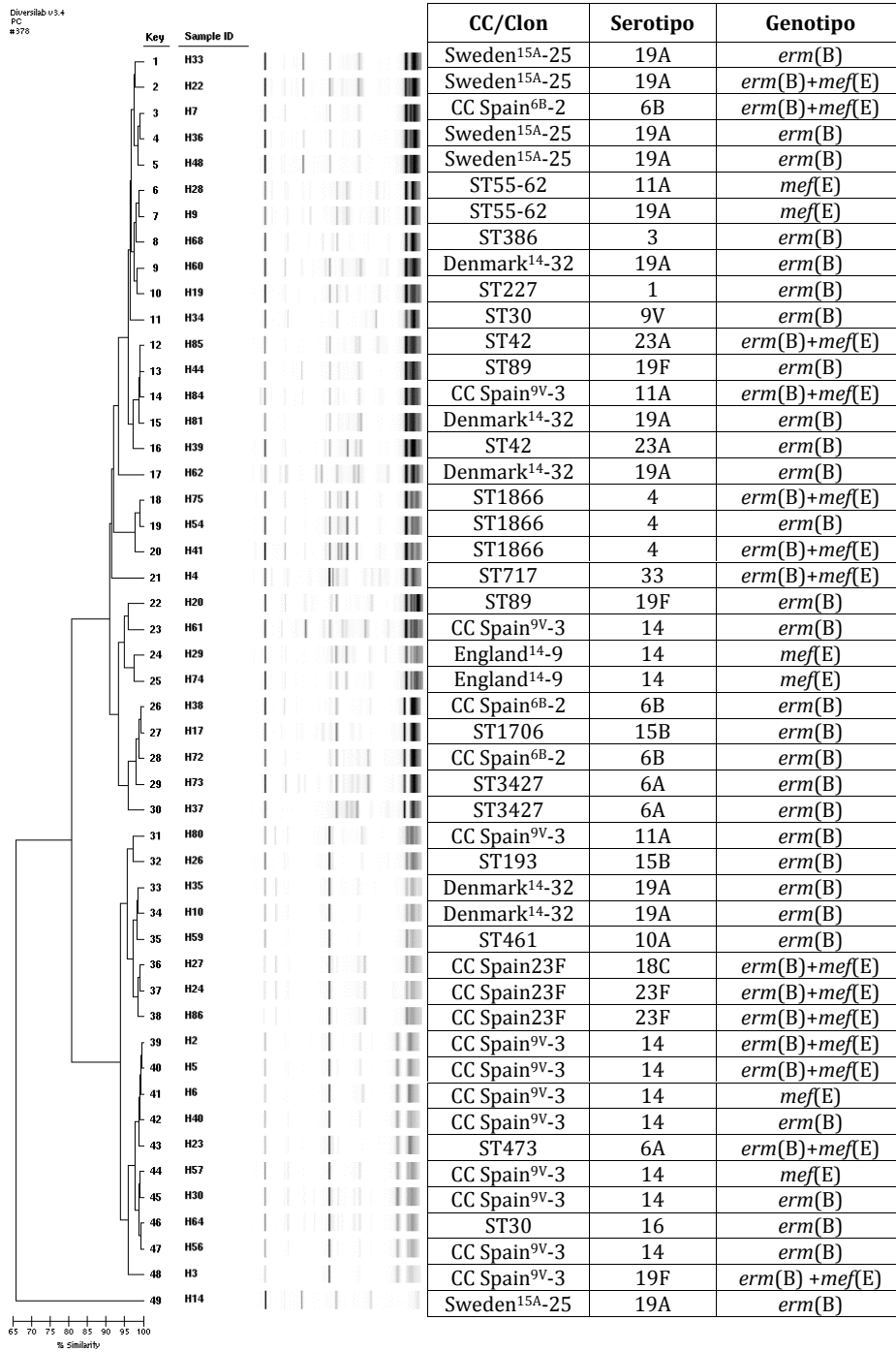


Figura 4.18: Análisis global de los resultados de DiversiLab[®] por el método PC de la colección de hemocultivos

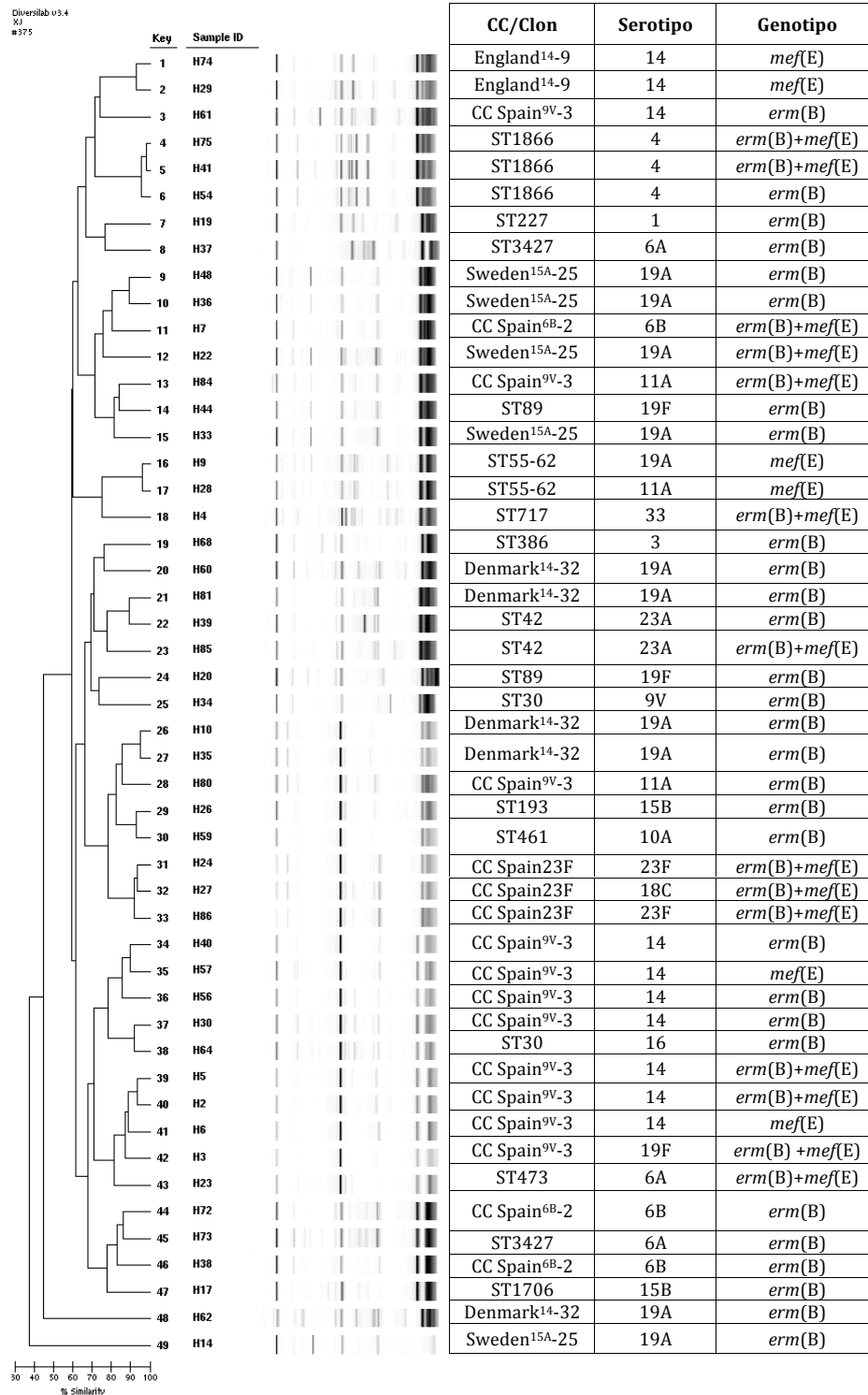


Figura 4.19: Análisis global de los resultados de DiversiLab[®] por el método XJ de la colección de hemocultivos

4.3.2.2. Análisis por complejos clonales y clones

4.3.2.2.1. Complejo clonal Spain^{9V}-3 Dentro de este complejo clonal se estudiaron 11 aislados, de los cuales, 8 pertenecían a la ST557 y 3 a la ST2246.

Mediante el análisis por el método PC se observó la presencia de 9 patrones y tres grupos. El patrón 1 estaba formado por 3 aislados, todos ellos pertenecientes a la ST557, de serotipo 14 y uno de ellos portador del gen *erm*(B), otro de ellos portador del gen *mef*(E), mientras que el tercero era portador de ambos mecanismos de resistencia *erm*(B) y *mef*(E). El resto de los patrones encontrados estaban formados por un aislado cada uno de ellos (fig. 4.20).

El grupo más numeroso en número de aislados fue el grupo dos en el que los 3 aislados del patrón uno formaron un grupo con el aislado del patrón 4, perteneciente también a la ST557, de serotipo 14 y con el gen *mef*(E) como determinante genético de resistencia.

El grupo uno estaba formado por dos aislados, de ST557, serotipo 14 y cada uno de ellos portando el gen *erm*(B) y la combinación de genes *mef*(E) y *erm*(B) respectivamente.

El último grupo encontrado fue el grupo tres, formado por 2 aislados, uno de ellos de ST557, serotipo 14 y portador *erm*(B) y *mef*(E) y el otro aislado de ST2246, perteneciente al serotipo 9V y portador del gen *erm*(B). Los aislados restantes se clasificaron como patrones independientes.

Mediante el análisis realizado por el método XJ, se clasificaron los once aislados pertenecientes a este complejo clonal en 8 patrones, 3 de los cuales (patrones 1, 2 y 3) agruparon dos aislados cada uno.

Los aislados del patrón uno pertenecían todos a la ST557, al serotipo 14 y eran portadores de los genes *erm*(B)+*mef*(E).

Los aislados formadores del patrón 2 pertenecían a las ST2246 y ST557 y a los serotipos 11A y 14 respectivamente, siendo portadores ambos del gen *erm*(B).

Los 2 aislados formadores del patrón tres pertenecían a la ST557, a los serotipos 14 y 19A y eran portadores del gen *mef*(E) y de los genes *erm*(B)+*mef*(E) respectivamente (fig. 4.21).

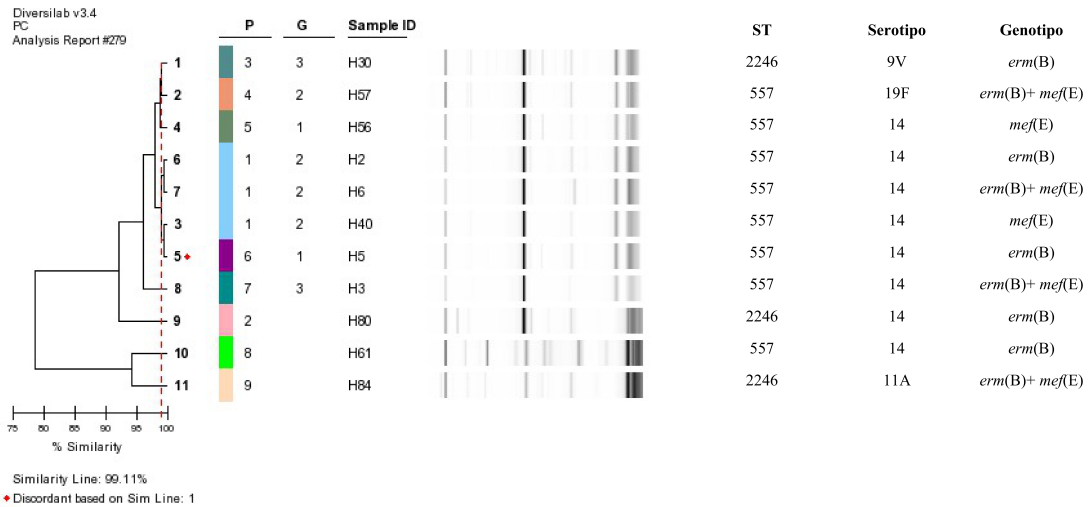


Figura 4.20: Colección hemocultivos CC Spain^{9V}-3. Análisis por el método PC

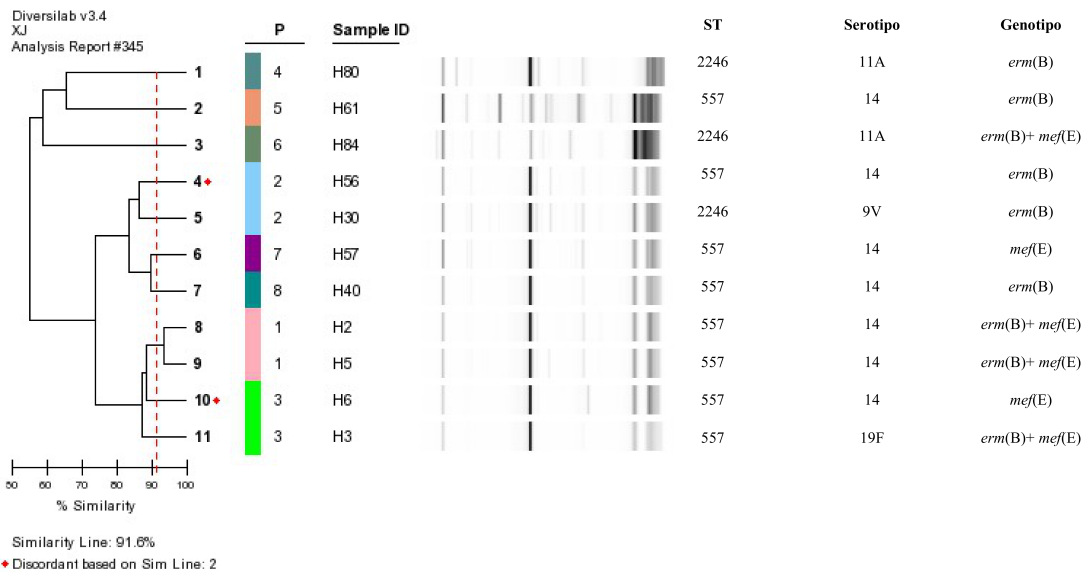


Figura 4.21: Colección hemocultivos CC Spain^{9V}-3. Análisis por el método XJ

4.3.2.2.2. Complejo clonal Denmark¹⁴-32 Entre los 5 aislados que formaban este complejo clonal, cuatro pertenecían a la ST276 y al serotipo 19A y uno a la ST230 y al serotipo 24. Todos ellos portaban el gen *erm*(B). Empleando el análisis por PC se observaron 3 patrones diferentes de gel virtual, en el patrón uno se agruparon 2 aislados de ST y serotipos diferentes (ST276 y ST230 y serotipos 19A y 24 respectivamente), el patrón 2 agrupando 2 aislados y un tercer patrón formado por un único aislado con las mismas características que los formadores del patrón dos. un aislado de ST276 y el aislado ST230 y un tercer patrón formado por un aislado ST276.

A pesar de pertenecer los 5 aislados a la misma ST y serotipo, mediante el análisis XJ, se describió un grupo formado por 2 patrones (3 y 4) de un aislado cada uno de ellos, los 3 aislados restantes se clasificaron como patrones independientes.

4.3.2.2.3. Complejo clonal Spain^{6B}-2 Mediante análisis por PC, se observaron 2 patrones entre los 3 aislados que formaban este complejo clonal. Uno agrupando los pertenecientes a la ST90, de serotipo 6B y portadores del gen *erm*(B), y otro definido por el aislado restante, perteneciente a la ST1624, de serotipo 6B también y portador de los genes *erm*(B) y *mef*(E). Sin embargo, mediante el análisis por XJ, los tres aislados se clasificaron como patrones independientes.

4.3.2.2.4. Complejo clonal Spain^{23F}-1 De los 3 aislados que formaban este complejo clonal, 2 pertenecían a la ST932 y presentaban el serotipo 23F, mientras que el tercero pertenecía a la ST285 y al serotipo 18C y todos estos aislados eran portadores de los genes *erm*(B) y *mef*(E).

Mediante el análisis por PC se asignó un mismo patrón a estos 3 aislados, mientras que mediante XJ, cada aislado conformaba un patrón, pero todos ellos se clasificaban en un mismo grupo.

4.3.2.2.5. Complejo clonal ST62-ST55 Los 2 aislados que forman este complejo clonal se agruparon bajo un mismo patrón de rep-PCR tanto mediante análisis por el método PC como por el XJ, a pesar de pertenecer cada uno a una ST (ST62 y ST55) y a un serotipo diferente (19A y 11A). Ambos contenían el gen *mef*(E).

4.3.2.2.6. Clon Sweden^{15A}-25 Mediante análisis por PC entre los 5 aislados formadores de este clon se describieron 3 patrones diferentes de gel virtual, 2 de los cuáles, a su vez, conformaron un grupo (G1).

El patrón uno (P1) fue el más numeroso, formado por 3 aislados, de ST63, serotipos 19A y 15A, 2 de ellos portadores del gen *erm*(B) y uno de ambos genes *erm*(B) y *mef*(E).

El patrón 2 (P2) se definió por un sólo aislado de ST63, no tipable y el gen *erm*(B), que formó un grupo con el patrón uno, y por último, el patrón 3 (P3) estaba formado por el aislado de ST63, serotipo 8 y portador del gen *erm*(B) (figs. 4.22 y 4.23).

Sin embargo, mediante el análisis por XJ, cada uno de los cinco aislados formadores del clon se clasificó como un patrón diferente de gel virtual (fig. 4.23).

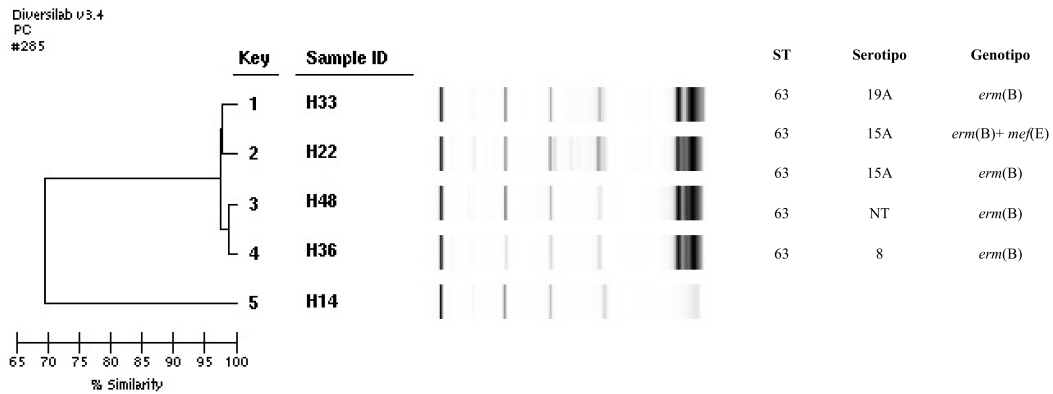


Figura 4.22: Colección hemocultivos Clon Sweden^{15A}-25. Análisis por el método PC

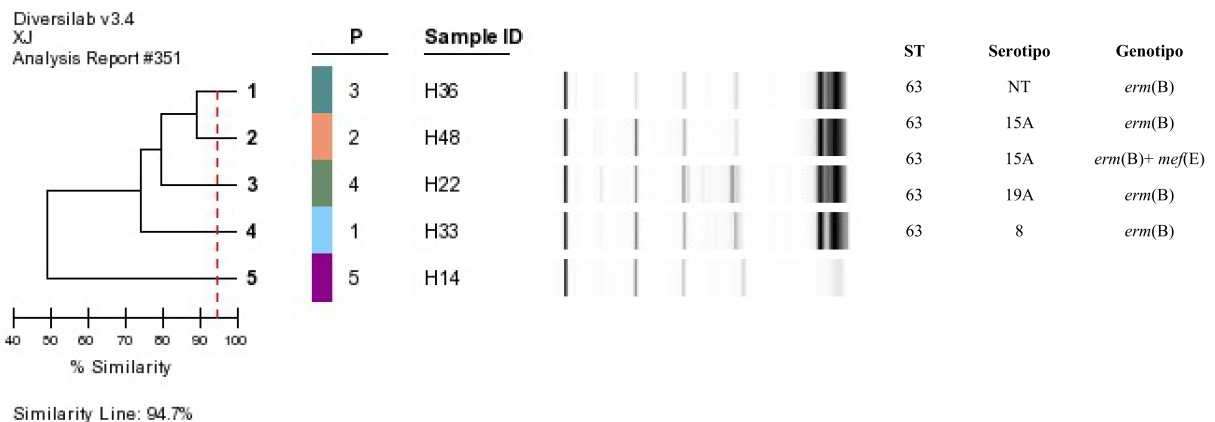


Figura 4.23: Colección hemocultivos Clon Sweden^{15A}-25. Análisis por el método XJ

4.3.2.2.7. Clon ST1866 Mediante análisis por PC, los 3 aislados pertenecientes a este clon, de serotipo 4 se agruparon bajo un mismo patrón, a pesar de existir diferencias en los determinantes genéticos de resistencia que portaban, al contener dos de ellos el gen *erm(B)* y el aislado restante la combinación de genes *erm(B)+mef(E)*.

El análisis por XJ describió 2 patrones diferentes, uno de ellos (P1) agrupando a los dos aislados *erm(B)+mef(E)* y el segundo (P2) formado por el aislado *erm(B)*, que a su vez formaron un único grupo.

4.3.2.2.8. Clon ST89 A pesar de mostrar el mismo serotipo (19F) y ser portadores ambos del gen *erm(B)*, los 2 aislados pertenecientes a este clon se agruparon en un patrón diferente cada uno por rep-PCR, que formaba un grupo mediante análisis por PC y no formaban ningún grupo mediante análisis por XJ.

4.3.2.2.9. Clon England¹⁴-9 Los 2 aislados, de serotipo 14 y portadores cada uno de los genes *mef(E)* y *mef(A)* se clasificaron en patrones diferentes tanto por PC como por

XJ.

4.3.2.2.10. Clon ST3427 Tanto mediante análisis PC como XJ, los 2 aislados formadores de este clon, ambos de serotipo 6A y portadores del gen *erm(B)*, se agruparon como patrones diferentes.

4.3.2.2.11. Clon ST42 Mediante análisis PC, los 2 aislados formadores de este clon, ambos de serotipo 23A y portadores del gen *erm(B)* y de los genes *erm(B)* y *mef(E)* respectivamente, se agruparon como un único patrones (P1) mientras que por XJ ambos aislados se clasificaron en dos patrones diferentes (P1 y P2).

4.3.2.2.12. Clon ST30 Tanto mediante análisis PC como XJ, los 2 aislados formadores de este clon, ambos portadores del gen *erm(B)* y de los serotipos 16 y 9V, se agruparon en patrones diferentes (P1 y P2).

4.3.2.3. Clones independientes

Se estudiaron siete aislados que formaban clones independientes. Mediante análisis por PC, se clasificaron en 7 patrones diferentes de gel virtual, y se diferenciaron dos grupos (G1 y G2), ambos formados por 2 patrones (fig. 4.24).

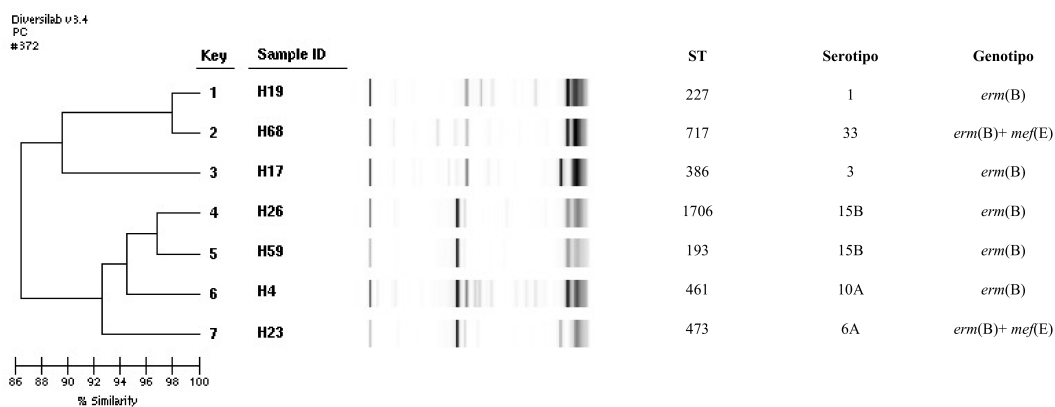


Figura 4.24: Colección hemocultivos *singleton clones*. Análisis por el método PC

Mediante análisis por XJ se clasificaron en siete patrones diferentes, sin formar agrupaciones (fig. 4.25).

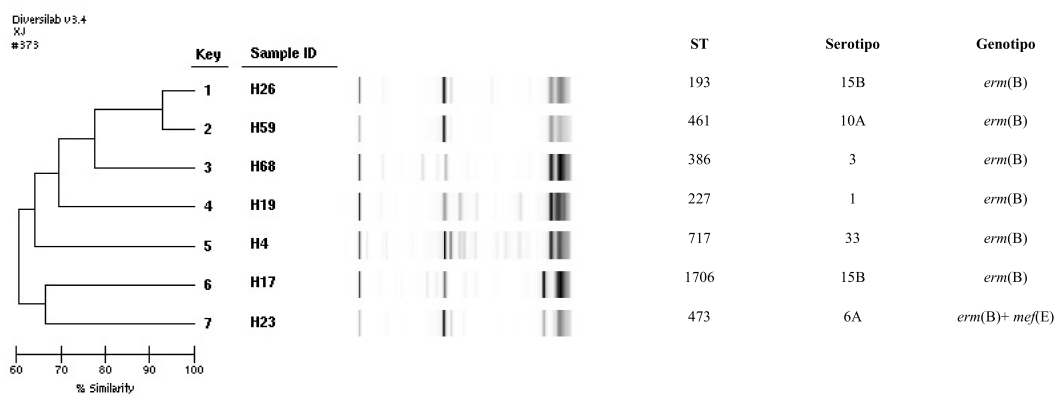


Figura 4.25: Colección hemocultivos *singleton clones*. Análisis por el método XJ

4.4. Cálculo de la diversidad genética mediante índices matemáticos

Mediante el cálculo por métodos matemáticos de la diversidad genética, aplicados a ambas colecciones (prevacunal y de hemocultivos) recogidas en diferentes periodos de tiempo es posible evaluar la posibilidad que tendrían estos aislados de *S. pneumoniae* resistentes para provocar infecciones invasivas, y poder calcular matemáticamente cómo influiría la distribución diferente de los determinantes genéticos de resistencia a macrólidos, incluyendo mecanismos duales, en este tipo de infecciones.

Mediante la aplicación del índice de diversidad clonal (CD) que expresa una proporción simple entre el número de STs halladas entre el número de aislados que expresan un mecanismo genético de resistencia a los macrólidos determinado, tanto entre la colección de aislados procedentes de hemocultivos, como en la colección prevacunal, los aislados con mayor diversidad genética son los que contienen ambos genes de resistencia *erm*(B) y *mef*(E) $CD = 0,78$ y $CD = 0,75$ respectivamente. (tab. 4.11).

Mediante la aplicación del índice de Simpson (D) y de Selander-Levin (H), que calcula la probabilidad de tomar al azar dos aislados que pertenezcan a la misma ST mediante frecuencias relativas, se confirmaría que los aislados con mecanismos de resistencia duales serían los que mayor diversidad genética presentan, tanto en la colección de hemocultivos ($D = 0,96$ y $H = 89$) como en la colección prevacunal ($D = 0,97$ y $H = 0,94$), cabe destacar que el cálculo del índice de Selander-Levin (H) muestra valores cercanos para los aislados de la colección de hemocultivos, presentando mecanismos duales y el gen *erm*(B) como único determinante genético de resistencia a los macrólidos.

Aplicando el índice de Shannon (H') se observa que tanto entre la colección de aislados procedentes de hemocultivos, como en la colección prevacunal, los aislados de *S. pneumoniae* portadores del gen *erm*(B), como único gen de resistencia o acompañado del gen *mef*(E), la homogeneidad en la distribución de la diversidad genética es notablemente mayor ($H' = 3,32$ entre los aislados con mecanismos duales procedentes de hemocultivos y $H' = 4,21$ entre los aislados prevacunales con el mismo genotipo de resistencia a los macrólidos) (tab. 4.11). Estos resultados son acordes a los proporcionados mediante la aplicación del índice de Evento (E), que expresa valores mayores entre los aislados con mecanismos duales en ambas colecciones.

Estos resultados sugieren que el número de aislados de *S. pneumoniae* que podrían causar infección invasiva es similar entre los aislados que contienen el gen *erm*(B) y los genes *erm*(B) y *mef*(E), y que en caso de los aislados portadores del gen *mef*(E), el número de aislados sería menor. Los resultados obtenidos mediante la aplicación de los índices de Simpson (D) y Selander-Levin (H) apoyan esta conclusión, expresando valores menores de probabilidad de diversidad en la población procedente de hemocultivos (aislados conteniendo el gen *mef*(E) sólo ($D = 0,87$ y $H = 0,72$; aislados conteniendo el gen *erm*(B) sólo $D = 0,92$ y $H = 0,90$ y aislados con mecanismos duales $D = 0,96$ y $H = 0,89$) (tab. 4.11 y figs. 4.26 y 4.27).

Si se comparan los resultados obtenidos mediante el cálculo de los índices empleados, entre la población de aislados procedentes de hemocultivos, y por tanto invasivos, y los aislados procedentes de la colección prevacunal, no invasivos, la distribución de la diversidad es mayor entre los aislados no invasivos (prevacunales), con valores para el índice de evento (E) de $E = 0,54$ (prevacunal) y $E = 0,39$ (hemocultivos) para los aislados

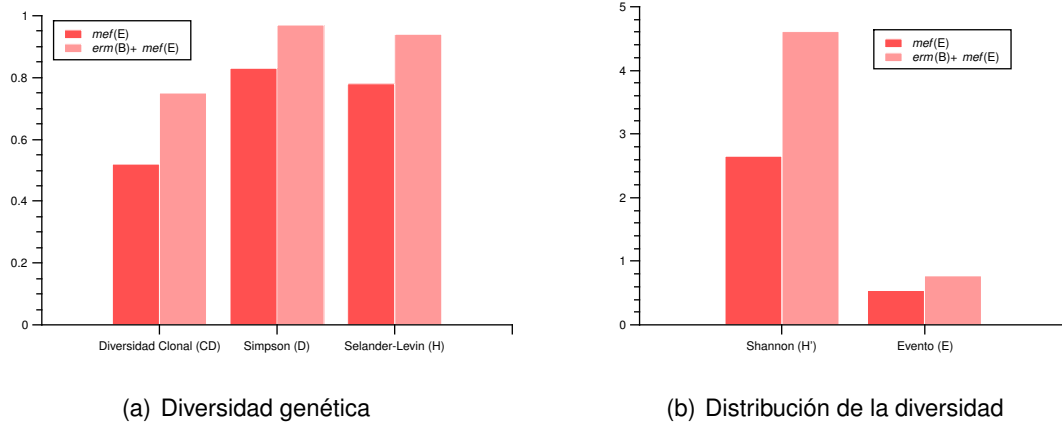


Figura 4.26: Diversidad genética y distribución de la diversidad entre los aislados no invasivos

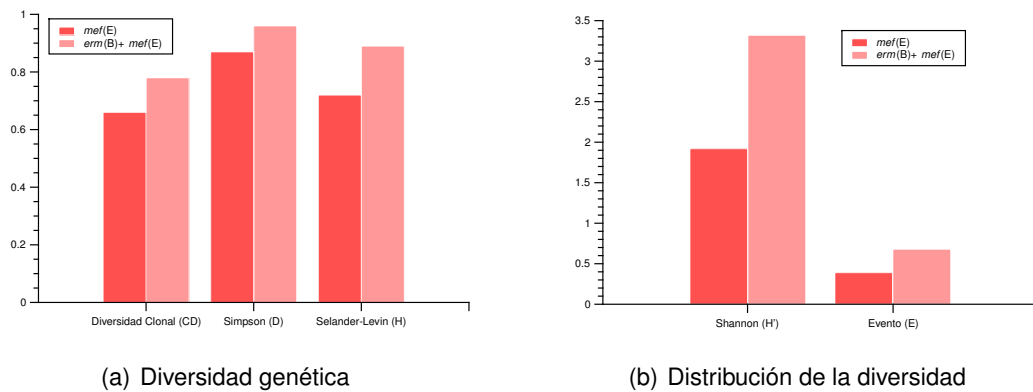


Figura 4.27: Diversidad genética y distribución de la diversidad entre los aislados invasivos

portadores del gen *mef(E)* como único determinante genético de resistencia y valores de $E = 0,77$ (prevacunales) y $E = 0,68$ (hemocultivos) entre los aislados portadores de mecanismos duales. Los resultados obtenidos mediante la aplicación de diferentes índices matemáticos se muestran en la tabla 4.11.

índices	Aislados invasivos				Aislados no invasivos		
	m	e+m	e	m+[e+m]	m	e+m	m+[e+m]
Diversidad clonal (CD)	0.66	0.78	0.32	0.70	0.52	0.75	0.66
Simpson (D)	0.87	0.96	0.92	0.94	0.83	0.97	0.97
Selander-Levin (H)	0.72	0.89	0.90	0.89	0.78	0.94	0.94
Shannon (H')	1.92	3.32	3.75	3.54	2.65	4.21	4.58
Evento (E)	0.39	0.68	0.70	0.84	0.54	0.77	0.88

m: mef

e+m: $erm(B)+mef(E)$

e: $erm(B)$

m+[e+m]: $mef(E)+[erm(B)+mef(E)]$

Tabla 4.11: Índices de diversidad y distribución de la diversidad entre los aislados invasivos y no invasivos

4.5. Elementos de transposición

Los resultados se analizaron por separado en función del genotipo de resistencia a los macrólidos y de la amplificación positiva del gen de resistencia a la tetraciclina, *tetM*, dada la relación entre la presencia o ausencia de este gen y los transposones conjugativos.

4.5.1. Colección prevacunol

Se estudiaron 45 aislados seleccionados, de los cuales 28 presentaban amplificación positiva para los genes *erm(B)* y *mef(E)* al igual que para el gen *tetM*. Entre los 17 aislados que presentaban amplificación positiva para los genes *mef*, 16 aislados *mef(E)* y un aislado *mef(A)*, en 13 no se observó amplificación positiva para el gen *tetM*, observándose amplificación positiva para dicho gen en los cuatro restantes, entre los que se incluía el aislado portador del gen *mef(A)*.

4.5.1.1. Detección de derivados de Tn916 y Tn917

Entre los aislados con amplificación positiva para ambos genes *erm(B)* y *mef(E)* (n=28) se detectó la presencia de los genes *int* y *xis* (que codifican para la integrasa y la excisionasa del transposón Tn916) en 20 de los 28 aislados (71,4%), mientras que en 7 de éstos (25%) sólo se detectó la presencia del gen *xis*. No se detectó ninguno de los dos genes marcadores del transposón Tn916 en un aislado (3,6%). Con respecto a la presencia de los genes marcadores del transposón Tn917, *tnpA* y *tnpR* no se observó amplificación positiva para el gen *tnpA* mientras que el gen *tnpR* fue detectado en 9 de éstos aislados (32,1%) (tab. 4.12).

Entre los 13 aislados portadores del gen *mef(E)* y con amplificación negativa para el gen *tetM* únicamente se observó amplificación positiva para los dos genes marcadores de la presencia del transposón Tn916, *int* y *xis* en dos aislados (15,4%). Se observó amplificación positiva sólo para el gen de la integrasa en otros dos aislados (15,4%) y el resto (n=9, 69,2%) no presentó amplificación positiva ni para el gen de la integrasa ni para el de la excisionasa. Con respecto a la detección de los genes *tnpA* y *tnpR*, marcadores de la presencia del transposón Tn917, no se detectó amplificación positiva en ninguno de los 13 aislados.

Entre los 4 aislados con amplificación positiva para *mef* (4 de ellos *mef(E)* y uno *mef(A)*), y para *tetM* sólo se observó amplificación positiva para los genes *int* y *xis* en el aislado portador del gen *mef(A)*. No se observó amplificación de los genes *tnpA* y *tnpR* en ninguno de estos aislados (tab. 4.13).

4.5.1.2. Detección de los elementos MEGA y MAS

4.5.1.2.1. Detección del elemento MEGA Entre los aislados con mecanismos duales (n=28) se produjo amplificación positiva para el elemento MEGA y del gen *msr(D)* en todos ellos al igual que en el caso de los aislados *mef(E)* positivos y *tetM* negativos (n=13) (tab. 4.12). Sin embargo entre los aislados *mef* positivos con amplificación positiva también para el gen *tetM* (n=4), un 25% (n=1) presentó amplificación positiva para

el elemento MEGA y para el gen *msr(D)*, mientras que dos de ellos (50%) presentaron un patrón de bandas degradado en la amplificación del elemento MEGA y amplificación negativa para el gen *msr(D)*. El estudio del elemento MEGA de estos aislados mediante mapas de restricción se describirá más adelante. Por último, el aislado portador del gen *mef(A)* no presentó amplificación positiva para el elemento MEGA (tab. 4.13).

4.5.1.2.2. Detección del elemento MAS Entre los aislados con amplificación positiva para los genes *erm(B)* y *mef(E)* (n=28) se observó amplificación de los genes *aphA3'* en el 17,8% (n=5) y *sat* en el 10,7% (n=3) de los mismos (tab. 4.12).

Entre el resto de aislados (portadores de genes *mef*) no se observó amplificación positiva para ninguno de los marcadores del elemento MAS (tab. 4.13).

4.5.1.3. Identificación de elementos derivados de Tn916 (Tn6003, Tn6002, Tn2009 y Tn3872) mediante "mapeo" (*mapping*) por técnica de PCR *overlapping*

4.5.1.3.1. Mapping 1 Mediante la reacción mapping 1 se detecta el amplicón formado por la región *orf19-orf20* del transposón Tn916. Sí este amplicón es normal (1,2 kb) indica que no hay elementos insertados en esa región. Sí este amplicón es de 13 kb sugiere la inserción del elemento MAS en esa región y por tanto la posible presencia de los transposones derivados Tn6003 y Tn6002.

Entre los aislados con mecanismos duales (n=28) se detectó la presencia de un amplicón de 13 kb en 11 aislados (39,3%) y 14 (50%) presentan amplicones tanto de 13 kb como de 1,2 kb sugiriendo la existencia de más de una copia del transposón Tn916. Los 3 aislados restantes (10,7%) presentaron bandas múltiples de amplificación para esta reacción, lo que podría interpretarse como modificaciones en las secuencias de hibridación de los cebadores (tab. 4.12).

Entre los aislados con amplificación positiva para el gen *mef(E)* y negativa para *tetM* (n=13) sólo se observa amplificación de 1,2 kb en los 2 aislados (15,4%) en los que se detectó la presencia de ambos genes *int* y *xis*.

Entre los aislados con amplificación positiva para los genes *mef* y *tetM* (n=4) sólo hubo amplificación de 1,2 kb en el aislado portador del gen *mef(A)*, que a su vez había presentado amplificación positiva para *int* y *xis* (tab. 4.13).

4.5.1.3.2. Mapping 2 Mediante esta reacción se detecta si hay inserciones en la región comprendida entre *tetM* (*orf12* del transposón Tn916) e *int*. El tamaño de producto esperado sin inserciones es de 5,8 kb y con la inserción de MEGA (cuyo tamaño es de 5,5 kb) indicaría la existencia de Tn2009 y el tamaño del amplicón esperado sería de 11,3 kb.

Entre los 28 aislados con mecanismos duales para los genes de resistencia a los macrólidos, 8 de ellos (28,6%) presentaron amplicones de 11,3 kb indicando la posible existencia del elemento Tn2009. Los 20 restantes (71,4%) presentaron amplicones de 5,8 kb. Dado que la amplificación para el elemento MEGA en estos 20 aislados fue positiva, este resultado indica que dicho elemento no se encuentra asociado a Tn916 en estos aislados (tab. 4.12).

Entre los 13 aislados con amplificación positiva para *mef(E)* y negativa para *tetM* sólo hubo amplificación positiva en los 2 aislados positivos para *int* y *xis* y el tamaño del amplicón fue de 5,8 kb por lo que se indica que el elemento MEGA (presente en los 13 aislados) no se encuentra insertado en Tn916 en los dos aislados en los que se infiere su presencia mediante los genes *int* y *xis*.

Entre los 4 aislados con amplificación positiva para los genes *mef* y *tetM*, en el único aislado en el que se sugeriría la presencia de Tn916 (que es el aislado positivo para el gen *mef(A)*) el amplicón de la región entre *tetM* e *int* fue de 5,8pb como se esperaba, ya que este aislado no presentaba el elemento MEGA (tab. 4.13).

4.5.1.3.3. Mapping 3 Mediante esta amplificación se comprueba si el elemento MEGA se encuentra insertado dentro de la secuencia de Tn916 mediante la presencia de un amplicón de 9 kb.

Entre los aislados con mecanismos duales, se observa la presencia de este amplicón en 9 aislados (32,1 %) de los cuales 2 no presentaban amplificación compatible con la presencia de MEGA en Tn916 mediante la reacción *mapping 2*. En contraste, uno de los aislados en los que el resultado de la reacción *mapping 2* sí que indicaría la presencia de MEGA dentro de la secuencia de Tn916 no dio amplificación positiva en esta reacción (tab. 4.12).

Entre los aislados *mef(E)* positivos y *tetM* negativos no se observa amplificación positiva en esta reacción confirmando que el elemento MEGA no se encuentra ligado a Tn916. En el caso del aislado portador de *mef(A)* y con amplificación positiva de *tetM* tampoco se observó amplificación positiva para esta reacción, resultado esperable dado que dicho aislado no es portador de MEGA (Tab. 4.13).

4.5.1.3.4. Mapping 4 Un resultado positivo para esta reacción indicaría la inserción de Tn917 en la secuencia de Tn916, es decir, la presencia de Tn3872.

Entre los aislados duales sólo hubo amplificación positiva en 5 (17,9 %) de los 9 aislados con presencia del gen *tnpR*, de forma que en los 4 aislados restantes Tn917 se encontraría independiente de Tn916 (tab. 4.12).

En el resto de los aislados de la colección prevacunal estudiados no se observa amplificación positiva en esta reacción, resultado consistente con la ausencia de amplificación de los genes marcadores de la presencia de Tn917 *tnpA* y *tnpR* (tab. 4.13).

CC/Clon	Serotipo	Aislado	Tn916 (multiplex-1)		Tn917 (multiplex-2)		MEGA		tefM (simple 3)	MAS (multiplex-3)	Tn6002- Tn6003 (mapping-1)		Tn2009 (mapping-2- mapping-3)		Tn3872 (mapping-4)
			int	xis	tpa	tpR	MEGA (simple 1)	msr(D) (simple 2)			aphA-3	sat	orf19-orf20 (13kb)	tetMF-intR (11,3kb)	
CC ST135-ST2638	6B	5	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	
CC ST135-ST2638	6B	53	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	
CC ST135-ST2638	6B	14	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	
Clon Denmark ¹⁴ -32	19A	16	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
Clon Denmark ¹⁴ -32	19A	20	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
Clon Denmark ¹⁴ -32	19A	19	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
Clon Denmark ¹⁴ -32	19A	15	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
Clon ST549	23F	SP50	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
Clon ST549	19F	17	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
Clon ST549	19F	18	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
CC Sweden ^{15A} -25	15A	SP55	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
CC Sweden ^{15A} -25	15A	24	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
CC Spain ^{6B} -2	6B	SP59	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
CC Spain ^{6B} -2	6B	SP60	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
CC Spain ^{6B} -2	6B	SP61	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	
Clon Spain ^{23F} -1	23F	46	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
Clon Spain ^{23F} -1	19F	SP51	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
Clon Poland ^{6B} -20	6B	49	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
SC Norway ^{NT} -42	9V	54	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
SC	3	SP58	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
SC	15A	SP54	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	
SC	14	SP62	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
SC	6B	52	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
SC	19F	22	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
SC	19F	41	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
SC	15C	42	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
SC	12F	43	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	
SC	10A	44	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	

Tabla 4.12: Amplificaciones para la descripción de elementos de transposición entre los aislados de la colección prevacunal con genotipo de resistencia a los macrólidos *erm(B)+mef(E)*. Se muestran resultados positivos únicamente para las reacciones que indican inserciones de elementos en Tn916 con el tamaño de producto de PCR esperado.

4.5.2. Colección de hemocultivos

Se estudiaron 20 aislados seleccionados, de los cuales 14 presentaban amplificación positiva para los genes *erm*(B) y *mef*(E) y a su vez de estos, 9 presentaron amplificación positiva para el gen *tetM*, mientras que entre los 6 aislados que presentaban amplificación positiva para los genes *mef* ninguno fue positivo para *tetM*.

4.5.2.1. Detección de derivados de Tn916 y Tn917

Entre los aislados con amplificación positiva para ambos genes *erm*(B) y *mef*(E) y positiva para *tetM* (n=9) se detectó la presencia de ambos genes *int* y *xis* (que codifican para la integrasa y la excisionasa del transposón Tn916) en 7 de éstos (77,8%) mientras que en los dos aislados restantes no se observó amplificación para ninguno de los dos genes. En cuanto a la presencia de Tn917, 3 de éstos 9 aislados (33,3%) mostraron amplificación positiva tanto para *tnpA* como para *tnpR*, mostrando a su vez, también positiva para *int* y *xis*.

Entre los aislados con amplificaciones duales y *tetM* negativo (n=5) 3 de ellos (60%) mostraron amplificación positiva para ambos genes marcadores de Tn916 mientras que para los dos genes marcadores de la presencia de Tn917 sólo mostraron amplificación positiva 2 (40%) en los que a su vez también se detectó la presencia de los genes *int* y *xis*.

Entre los 6 aislados con amplificación positiva para el gen *mef* uno de ellos mostró amplificación positiva para el subtipo *mef*(A) y los cinco restantes lo hicieron para el subtipo *mef*(E). En ninguno de ellos se encontró amplificación positiva para el gen *tetM*. Únicamente se encontró amplificación positiva con respecto a los genes *int* y *xis* en uno de estos aislados, sin encontrarse amplificación positiva para los marcadores de Tn917 (tab. 4.14).

4.5.2.2. Detección de los elementos MEGA y MAS

4.5.2.2.1. Detección del elemento MEGA Entre los aislados con mecanismos duales (n=14) se produjo amplificación positiva para el elemento MEGA y del gen *msr*(D) en todos ellos al igual que en el caso de los aislados *mef*(E) positivos (n=6). No se produjo amplificación para ninguna de las dos reacciones en el aislado portador del subtipo *mef*(A) (tab. 4.14).

4.5.2.2.2. Detección del elemento MAS Entre los aislados con amplificación positiva para los genes *erm*(B) y *mef*(E) y amplificación positiva para el gen *tetM*, sólo se observó amplificación positiva para el gen *aphA3'* en dos aislados (que a su vez presentaron marcadores de la presencia de Tn916 y Tn917). Entre el resto de aislados con mecanismos duales y amplificación negativa para el gen *tetM*, sólo se observó amplificación positiva para el gen *aphA3'* en uno de ellos. Con respecto a los aislados portadores de genes *mef* sólo se observó amplificación positiva para *aphA3'* en el mismo aislado con marcadores de Tn916. No se observó amplificación positiva para el resto de los genes marcadores del elemento MAS (*sat* y *cat*) en ninguno de los aislados procedentes de hemocultivos (tab. 4.14).

CC/Clon	Serotipo	Aislado	Tn916 (multiplex-1)		Tn917 (multiplex-2)		MEGA		tefM (simple 3)	MAS (multiplex-3)	Tn6002-Tn6003 (mapping-1)		Tn2009 (mapping-3)		Tn3872 (mapping-4)	
			<i>int</i>	<i>xis</i>	<i>trpA</i>	<i>trpR</i>	MEGA (simple 1)	<i>msr(D)</i> (simple 2)			<i>aphA-3</i>	<i>sat</i>	<i>orf19-orf20</i> (13kb)	tefMF-intR (11,3kb)	MEGAF-intR (9,2kb)	tnpR1-intR (6,8kb)
CC Spain ^{9V} -3	14	34	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CC Spain ^{9V} -3	14	36	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CC Spain ^{9V} -3	14	37	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CC Spain ^{9V} -3	19A	38	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CC Spain ^{9V} -3	19A	39	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CC Spain ^{9V} -3	14	40	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CC Spain ^{9V} -3	14	7	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CC Spain ^{9V} -3	14	13	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CC Spain ^{9V} -3	14	10	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CC Spain ^{9V} -3	14	11	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Clon ST62	11A	12	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Clon ST62	11A	35	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Clon ST62	11A	8	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SC	9V	50	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
SC	9V	23	-	-	-	-	*	-	+	-	-	-	-	-	-	-
SC	31	25	-	-	-	-	*	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Clon England ¹⁴ -9	14	6	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

* : Productos de amplificación degradados.

Tabla 4. 13: Amplificaciones para la descripción de elementos de transposición entre los aislados de la colección prevacunal con genotipo de resistencia a los macrólidos *mef(E)*. El aislado 6 mostró amplificación positiva para el gen *mef(A)*. Se muestran resultados positivos únicamente para las reacciones que indican inserciones de elementos en Tn916 con el tamaño de producto de PCR esperado.

4.5.2.3. Identificación de elementos derivados de Tn916 (Tn6003, Tn6002, Tn2009 y Tn3872) mediante “mapeo” (*mapping*) por técnica de PCR *overlapping*

4.5.2.3.1. Mapping 1 Mediante la reacción *mapping 1* se detecta el amplicón formado por la región *orf19-orf20* del transposón Tn916. Si este amplicón es normal (1,2 kb) indica que no hay elementos insertados en esa región. Si este amplicón es de 13 kb sugiere la inserción del elemento MAS en esa región y por tanto la presencia de los transposones derivados Tn6003 y Tn6002.

Entre los aislados con mecanismos duales y *tetM* positivo (n=9) se detectó la presencia de un amplicón de 1,2 kb en los 7 aislados con presencia de Tn916 sin amplificación positiva en los dos restantes. Entre los aislados con amplificaciones duales y *tetM* negativos (n=5) se observó un amplicón de 1,2 kb en los 3 aislados con presencia de Tn916 y entre los aislados portadores de los genes *mef* se observó amplificación positiva para esta reacción sólo en el aislado con amplificación positiva para los genes *int* y *xis* (tab. 4.14).

4.5.2.3.2. Mapping 2 Mediante esta reacción se detecta si hay inserciones en la región comprendida entre *tetM* (*orf12* del transposón Tn916) e *int*. El tamaño de producto esperado sin inserciones es de 5,8 kb y con la inserción de MEGA (5,5 kb) indicaría la existencia de Tn2009 y el tamaño del amplicón esperado sería de 11,3 kb.

En el caso de los aislados con mecanismos duales y amplificación positiva para *tetM* (n=9) no se observa resultado positivo en los 2 aislados en los que no se encontraron marcadores de Tn916, 6 de ellos amplifican el tamaño de amplicón esperado y 1 de ellos presenta una amplificación de 11,3 kb sugiriendo la posible presencia del elemento Tn2009.

Un perfil similar se observa entre los resultados obtenidos de los aislados con mecanismos duales y amplificación negativa para el gen *tetM* (n=5), de forma que no hay amplificación en los dos únicos aislados que no presentaban marcadores de Tn916 y entre los 3 restantes, en dos se encontró el tamaño de amplicón esperado y en el aislado restante se encontró un amplicón que sugirió la inserción de MEGA dentro del elemento Tn916 pudiendo inferirse la presencia de Tn2009.

Con respecto a los aislados portadores de genes *mef* sólo se observa amplificación en el único aislado con marcadores positivos para Tn916 observándose una doble amplificación, un amplicón de 11,3 kb y un segundo amplicón del tamaño esperado en ausencia de inserciones (5,8 kb). Dado este resultado, podría sugerirse la existencia de más de una copia del transposón Tn916 (tab. 4.14).

4.5.2.3.3. Mapping 3 En el caso de esta amplificación hubo resultados discordantes con respecto a los obtenidos mediante la reacción *mapping 2*.

El aislado con mecanismos duales y *tetM* positivo en el que además se observó un amplicón de 11,3 kb mediante la reacción *mapping 2* en esta reacción muestra amplificación y un amplicón compatible con la inserción de MEGA en Tn916. Entre los 6 aislados con tamaño de amplicón para *mapping 2* de 5,8 kb, tres de ellos no amplifican esta reacción (lo que indicaría que el elemento MEGA no está insertado en el transposón Tn916)

y los otros tres presentan dobles amplicones, de tamaño esperado y tamaños inferiores, lo que podría sugerir la existencia de más de una copia del transposón Tn916 en estos aislados y posibles inserciones en éste. Esto necesitará de estudios más profundos en este campo para demostrarse.

Entre el resto de aislados, ya sea los portadores de mecanismos duales y *tetM* negativo, como los portadores de genes *mef*, sólo se encontró reacción de amplificación positiva para esta reacción, como cabía esperar, en los dos aislados (uno de cada grupo) en los que, el amplicón amplificado mediante la reacción *mapping* 2 fue de 11,2 kb, sugiriendo esto la inserción del elemento MEGA en el Tn916 (tab. 4.14).

4.5.2.3.4. Mapping 4 El hecho de que no se encontrara un resultado positivo para esta reacción en ninguno de los aislados procedentes de la colección de hemocultivos indicaría que no hay inserción de Tn917 en la secuencia de Tn916, es decir, no se observa la presencia de Tn3872 (tab. 4.14).

4.5.3. Análisis de los aislados pertenecientes al complejo clonal mayoritario

Con objeto de poder asociar los resultados obtenidos mediante el estudio de las estructuras relacionadas con el transposón conjugativo Tn916 y los aislados, tanto de la colección prevacunal como de hemocultivos, del complejo clonal que más aislados agrupaba, se seleccionaron los 17 aislados pertenecientes al CC Spain^{9V}-3. 10 de estos aislados procedieron de la colección prevacunal y eran portadores del gen *mef*(E) como único determinante genético de resistencia, mientras que los 7 restantes procedieron de la colección de hemocultivos y eran todos ellos portadores de los mecanismos duales de resistencia a la eritromicina *erm*(B)+*mef*(E). Los aislados de la colección prevacunal (n=10), ninguno de ellos presentó amplificación positiva para el gen *tetM* y sólo uno de ellos presentó amplificación positiva para los genes *int* y *xis*, sugiriendo la presencia del transposón conjugativo Tn916. Este aislado también amplificó la reacción *mapping* 1 con un tamaño de 1,2 kb y para la reacción *mapping* 2 presentó un amplicón de tamaño compatible con la posible inserción del elemento MEGA en Tn916. Sin embargo, la reacción *mapping* 3 fue negativa, así como la *mapping* 4 al no presentarse amplificación para los genes *tnpA* ni *tnpR*.

Otro aislado de este grupo presentó amplificación positiva para el gen *xis*, y negativa para todo el resto de reacciones de screening molecular.

Entre los aislados portadores de los genes *erm*(B) y *mef*(E) (n=7), sólo se observó amplificación positiva para el gen *tetM* en 4 de ellos. De estos 4, 2 presentaron amplificación positiva tanto para los genes *int* y *xis* como para los genes *tnpA* y *tnpR*. A su vez ambos presentaron amplificación positiva para la reacción *mapping* 1 con el tamaño de 1,2 kb y uno de ellos presentó amplificación de 10 kb para la reacción *mapping* 2. Sin embargo para la reacción *mapping* 3 ambos aislados presentaron amplificación positiva, sugiriendo la inserción de MEGA en Tn916 y la posibilidad de que el aislado que no amplificó para *mapping* 2 presentara más de una copia del transposón. No se observó amplificación positiva para la reacción *mapping* 4 sugiriendo la no presencia del elemento conjugativo Tn3872.

CC/Clon	Serotipo	Aislado	Genes de resistencia a macrólidos		Tn916 (multiplex-1)		Tn917 (multiplex-2)		MEGA		MAS		Tn6002-Tn6003 (mapping-1)		Tn2009 (mapping-3)		Tn3872 (mapping-4)	
			<i>erm(B)</i>	<i>mef(E)</i>	<i>int</i>	<i>xis</i>	<i>trpA</i>	<i>trpR</i>	MEGA (simple 1)	<i>msr(D)</i> (simple 2)	<i>temM</i> (simple 3)	<i>aphA-3</i>	<i>sat</i>	<i>orf19-orf20</i> (13kb)	<i>tetMF-intR</i> (11,3kb)	MEGAF-intR (9,2kb)	<i>trpR1-intR</i> (6,8kb)	
CC Spain ^{9V} -3	14 H2	H2	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CC Spain ^{9V} -3	14 H57	H57	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CC Spain ^{9V} -3	14 H5	H5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
CC Spain ^{9V} -3	11A H84	H84	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
CC Spain ^{6B} -2	6B H7	H7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Clon Spain ^{23F} -1	23F H86	H86	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Clon ST1866	4 H75	H75	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Clon ST42	23A H85	H85	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
SC	33 H4	H4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CC Spain ^{9V} -3	19F H3	H3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Clon Spain ^{23F} -1	18C H27	H27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Clon Sweden ^{15A} -25	15A H22	H22	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Clon Tennessee ¹⁴ -18	14 H8	H8	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Clon ST1866	4 H41	H41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
CC Spain ^{9V} -3	14 H6	H6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CC Spain ^{9V} -3	11A H28	H28	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Clon England ¹⁴ -9	14 H74	H74	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Clon England ¹⁴ -9	14 H29	H29	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CC ST62-ST55	19A H9	H9	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
SC	6A H23	H23	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

* : Amplificación *mef(A)* D : Amplificación doble

Tabla 4. 14: Amplificaciones para la descripción de elementos de transposición entre los aislados de la colección de hemocultivos. Se muestran resultados positivos únicamente para las reacciones que indican inserciones de elementos en Tn916 con el tamaño de producto de PCR esperado.

Los 2 aislados con amplificación positiva para el gen *tetM* restantes no presentaron resultados positivos en ninguna de las demás reacciones estudiadas.

Entre los 3 aislados con amplificación negativa para el gen *tetM*, uno de ellos presentó amplificación positiva tanto para los genes *int* y *xis* como para los genes *tnpA* y *tnpR*. A su vez presentó amplificación positiva para la reacción *mapping 1* con el tamaño de 1.200pb y amplificación de 10kb para la reacción *mapping 2*, mostrándose amplificaciones dobles en la reacción *mapping 3*. Con respecto a la reacción *mapping 4*, no se observaron resultados positivos.

Otro de estos 3 aislados presentó amplificación positiva para el gen *xis*, sin observarse la presencia de ningún gen más y el aislado restante no presentó amplificación positiva para ninguna de las reacciones estudiadas (tab. 4.15).

Genotipo	Tn916 (multiplex-1)		Tn917 (multiplex-2)		MEGA		MAS (multiplex-3)		Tn2009 (<i>mapping-2</i> <i>mapping-3</i>)		Tn3872 (<i>mapping-4</i>)
	<i>int</i>	<i>xis</i>	<i>tnpA</i>	<i>tnpR</i>	MEGA (simple 1)	<i>msr(D)</i> (simple 2)	<i>aphA-3</i>	<i>sat4</i>	<i>tetMF-intR</i>	MEGAF- <i>intR</i>	<i>tnpR1-int-R</i>
<i>mef(E)</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>mef(E)</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>mef(E)</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>mef(E)</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>mef(E)</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>mef(E)</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>mef(E)</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>mef(E)</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>mef(E)</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>mef(E)</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>mef(E)</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>mef(E)</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>erm(B)+mef(E)</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>erm(B)+mef(E)</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
<i>erm(B)+mef(E)</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>erm(B)+mef(E)</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-

Tabla 4.15: Elementos de transposición entre los aislados pertenecientes al Complejo clonal Spain^{9V}-3

4.5.4. Análisis de los aislados pertenecientes al serotipo 19A

Dada la relevancia del serotipo 19A en el contexto de la implantación de la vacunación heptavalente, se seleccionaron todos los aislados de ambas colecciones pertenecientes a este serotipo. Se seleccionaron 7 aislados, 6 pertenecientes a la colección prevacunal y uno a la de hemocultivos. De éstos aislados seleccionados, 5 eran portadores de los genes *erm(B)+mef(E)* (4 prevacunales y el aislado del hemocultivo), siendo todos positivos para la amplificación del gen *tetM* a excepción del aislado procedente de hemocultivos.

Entre los 4 aislados de este grupo con amplificación positiva para el gen *tetM*, 2 presentaron amplificación positiva tanto para *int* como para *xis* y los 2 restantes presentaron amplificación positiva únicamente para el gen *xis*. Uno de ellos mostró la presencia del gen *tnpR*, mientras que la presencia del gen *aphA3'* se detectó en 2 de ellos y la del gen *sat* en 3 de ellos.

Mediante la reacción *mapping* 1 se observó que presentaron amplificación positiva con un tamaño de amplicón de 1,2 kb en 3 de ellos y el aislado restante lo hizo para un amplicón de 13 kb, aunque no podemos inferir la presencia del elemento MAS ya que sus marcadores no amplificaron en este aislado. El resto de las amplificaciones no mostraron resultados positivos.

Con respecto al aislado con mecanismos duales y amplificación negativa para el gen *tetM* (además procedente de hemocultivos) todas las reacciones probadas fueron negativas, al igual que en caso de los 2 aislados con el determinante *mef(E)* no presentaron amplificación positiva para el gen *tetM* ni para ninguna de las reacciones estudiadas (tab. 4.16).

Genotipo	Tn916 (multiplex-1)		Tn917 (multiplex-2)		MEGA		<i>tetM</i> (simple 3)	MAS (multiplex-3)		Tn2009 (<i>mapping</i> -2 <i>mapping</i> -3)		Tn3872 (<i>mapping</i> -4)
	<i>int</i>	<i>xis</i>	<i>tnpA</i>	<i>tnpR</i>	MEGA (simple 1)	<i>msr(D)</i> (simple 2)		<i>aphA-3</i>	<i>sat4</i>	<i>tetMF-intR</i>	MEGAF- <i>intR</i>	<i>tnpR1-int-R</i>
<i>mef(E)</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>mef(E)</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>erm(B)+mef(E)</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>erm(B)+mef(E)</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>erm(B)+mef(E)</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>erm(B)+mef(E)</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-

Tabla 4.16: Elementos de transposición entre los aislados pertenecientes al serotipo 19A

4.5.5. Mapa de restricción del elemento MEGA

Los dos aislados en los que la amplificación del elemento MEGA presentó amplicones no esperados se sometieron a digestión enzimática con las enzimas *HpaI* y *SpeI* obteniéndose mapas de restricción degradados con respecto a los obtenidos con los aislados control *S. pneumoniae* SPnMA y *S. pneumoniae* SPnME. En la figura 4.28 se muestran el gel de electroforesis con los resultados de la digestión de los aislados control. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular. En los carriles 2-4 se muestran las digestiones con *SpeI* y en los carriles 5-7 las digestiones con *HpaI*.

En la figura 4.29 se pueden observar las digestiones de los dos aislados problema. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular. De los carriles 2-9 se muestran digestiones con *SpeI* de diferentes aislados con amplificación esperada para el elemento MEGA. En los carriles 10 y 11 se muestran las digestiones de los aislados 23 y 25 (aislados problema) con ambas enzimas *SpeI* y *HpaI*. En los carriles 12-15 se muestran digestiones con ambas enzimas; 12-13 de aislados control y 14-15 de dos aislados con amplificaciones esperadas para MEGA.

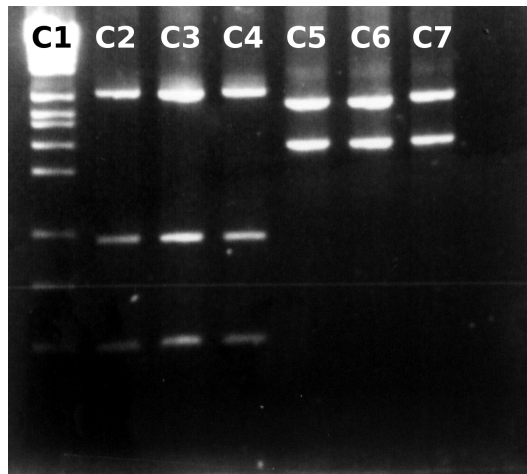


Figura 4.28: Digestión de los aislados control de *mef* con las enzimas *SpeI* y *HpaI*

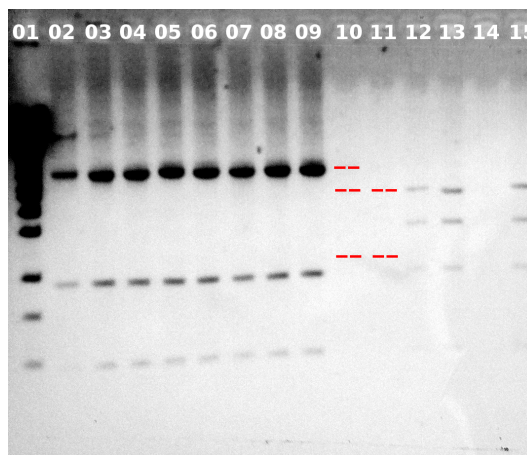


Figura 4.29: Digestión de los aislados problema con las enzimas *SpeI* y *HpaI*

Discusión

*“Todo nuestro conocimiento arranca del sentido,
pasa al entendimiento y termina en la razón”*

Kant

5 Discusión

5.1. Resistencia a macrólidos y estructura poblacional en los aislados de *S. pneumoniae*

5.1.1. Perfiles de sensibilidad y coresistencia

S. pneumoniae continua siendo una de las causas más importantes de patología infecciosa. La evolución de la resistencia de este microorganismo a diferentes antimicrobianos ha estado influida por distintos factores, incluyendo la introducción sucesiva de diferentes antimicrobianos y las estrategias de prevención (vacunas) que han condicionado una evolución dinámica tanto a nivel poblacional (dispersión de determinados clones) como a nivel genético (diversificación intraclonal) aprovechando la capacidad de transformación que posee este microorganismo.

Desde el primer aislado resistente a penicilina, detectado en Australia en 1967 [154], la resistencia a los antibióticos β -lactámicos fue aumentando progresivamente, en especial a la penicilina y más tarde a las cefalosporinas orales, comprometiendo la eficacia de las cefalosporinas de tercera generación como la cefotaxima o la ceftriaxona, todos ellos antibióticos de elección en el tratamiento de las infecciones invasivas y respiratorias producidas por *S. pneumoniae*. A pesar de que la resistencia a la penicilina no es el objeto de este trabajo, es importante comprender los datos sobre su evolución, así como discutir la misma en nuestros aislados ya que su evolución se encuentra estrechamente ligada a la de la resistencia a los macrólidos. En estudios epidemiológicos realizados tanto en los Estados Unidos como en Europa se observó un incremento progresivo de los aislados con resistencia a la penicilina durante los años noventa. En los EEUU aumentó desde un 5% en 1991 hasta un 25% en 1997 [217] y en algunos países europeos, como Francia, se produjo un ascenso desde un 7,7% en 1992 hasta un 35,8% en 2001. En todos los estudios realizados en los años posteriores (década de los años 2000) se observó una tendencia general al descenso de los aislados resistentes con un marcado aumento de los aislados intermedios. Una vez introducida la vacuna conjugada heptavalente (PCV7) se observó una disminución de los aislados de *S. pneumoniae* tanto altamente resistentes como de resistencia intermedia a la penicilina.

En España, la situación no fue diferente con un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,001$) de la resistencia a la penicilina; desde un 6% en 1979 hasta un 44,4% en 1989. Este aumento se estabilizó en la década de los noventa (43,7% de aislados resistentes en 1998) [163]. A partir de 1999 se produjo una disminución marcada obteniéndose cifras del 22,3% de aislados resistentes a penicilina en el año 2008 y que podría asociarse a la utilización de la vacuna PCV7 a partir de 2001. No obstante, es de destacar que un par de años antes ya se observaban tendencias a la disminución de la resistencia a la penicilina [163].

Parte de los aislados objeto de nuestro estudio se sitúan temporalmente en los años

previos a la introducción de la vacuna PCV7 ya que la colección prevacunal se recoge entre los años 1999 y 2003. En España se comercializó esta vacuna en el año 2002, aunque su aplicación de forma sistemática se produjo unos años más tarde. De hecho en la Comunidad Autónoma de Madrid formó parte del calendario vacunal infantil oficial desde el año 2006 hasta el año 2010 en que se reemplazó por la vacuna conjugada trece-valente (PCV13). Este periodo de tiempo se encuentra dentro de los años en los que se recogieron y estudiaron los aislados invasivos (hemocultivos) de nuestro hospital.

Si observamos los resultados globales de resistencia (aislamientos clasificados en categorías intermedia y resistente) a la penicilina y a la cefotaxima en los aislados de la colección prevacunal (n=712) (fig. 4.1), observamos un elevado porcentaje de aislados resistentes a la penicilina, (48,9%) con una alta proporción de aislados intermedios (26,9%), similar a la proporción de los resistentes (22,0%). En cuanto a la cefotaxima, el porcentaje de no-sensibilidad en estos aislados fue del 7,3%, siendo mayoritariamente de la categoría intermedia (6,5%). Nuestros resultados confirman la tendencia hacia el estancamiento o incluso a la disminución de la resistencia a los antibióticos β -lactámicos que se ha descrito en la literatura, incluso con anterioridad a la introducción de la vacuna PCV7. Este hecho podría explicarse por un mejor empleo de los antibióticos β -lactámicos en los tratamientos de las infecciones de vías respiratorias altas y a una mayor tendencia al empleo de forma empírica de fluoroquinolonas “respiratorias”. No obstante, a la vista de los resultados obtenidos en el estudio poblacional de estos aislados no es descartable un aparente recambio clonal que se discutirá más adelante.

Con respecto a la colección de hemocultivos (n=416) se observa durante el periodo “postvacunal” una proporción de cepas no-sensibles (intermedios y resistentes) tanto a la penicilina (22,8%) como a la cefotaxima (6,9%) con una marcada proporción de aislados categorizados como intermedios (17,8% y 6,2% respectivamente). Estas cifras reflejan la repercusión en las cepas invasivas de la introducción de la vacuna PCV7, aunque pudiendo considerarse como factor importante, el uso de otros grupos de antimicrobianos, como las fluoroquinolonas, que podría haber favorecido la diversificación en el uso de antimicrobianos y por tanto disminuir la presión de selección de los antibióticos β -lactámicos, así como la introducción de la vacuna PCV7 (fig. 4.6).

El primer aislado resistente a la eritromicina se aisló en Canadá y el hallazgo se publicó en la revista *The Lancet* en 1967 [218], no obstante con anterioridad, en 1964 se habían detectado tres aislados con una CMI para eritromicina ≥ 5 mg/L en una publicación sobre tratamiento de la exacerbación de la bronquitis crónica [154].

A pesar de ello, a lo largo de la década de los años setenta sólo se produjeron comunicaciones esporádicas de aislados resistentes a la eritromicina, manteniéndose estables y bajas las tasas de resistencia. El aumento más significativo de la resistencia a la eritromicina se observó a partir del final de la década de los ochenta. En España, en el Hospital de Bellvitge (Barcelona) se documentó un aumento de la resistencia a eritromicina desde un 0% en 1980 hasta un 9,4% en 1990 [219]. Algunos autores asocian este aumento tan llamativo con la modificación en las guías de tratamiento de la neumonía comunitaria publicadas en esas fechas, en las que se aconsejaba el empleo de eritromicina mejor que β -lactámicos ya que así se cubría la posibilidad de neumonía por *Legionella pneumophilla* y *Mycoplasma pneumoniae* [220].

Durante la década de los noventa la resistencia a los macrólidos aumentó de forma significativa en diferentes estudios a lo largo del mundo. Según datos del estudio de

vigilancia epidemiológica *Alexander Project*, las resistencias globales en los años 1996-1997 estaban entre 16,5-21,9 % aumentando a 24,6 % entre 1998-2000 [221].

Igualmente, los datos de los años comprendidos entre 1999 y 2004 proporcionados por el estudio PROTEKT (*Prospective Resistant Organism Tracking and Epidemiology for the Ketolide Telithromycin*) muestran unas tasas de resistencia globales a eritromicina de 31,0 % entre 1999-2000 hasta un 37,2 % en el periodo 2003-2004 [222].

Cabe destacar, sin embargo importantes diferencias geográficas entre estos datos globales en el inicio de la década de los 2000, encontrándose las mayores cifras de resistencia en algunas zonas de Asia (80 %) y las menores en los países del norte de Europa (18 %). El aumento de la resistencia a los macrólidos y su mantenimiento temporal presenta elevada repercusión clínica [223]. Existen estudios en los que se relaciona la resistencia a eritromicina con la mayor frecuencia de bacteriemias por *S. pneumoniae* [171].

La situación en España se conoce gracias a los datos obtenidos y coleccionados por la Dra. Fenoll en el Centro Nacional de Referencia de Neumococo en el Centro de Microbiología del Instituto Carlos III; se encontraron tasas inferiores al 5 % hasta el año 1986 con un incremento progresivo hasta el 28 % en 2001 pero disminuyendo a un 21,8 % en 2008 [162]. Tras la introducción de la vacuna PCV7 se produjo una disminución en la resistencia entre los aislados procedentes de población pediátrica desde un 42,9 % en 2003 hasta un 20,8 % en 2006 sin darse esta disminución entre los aislados procedentes de población adulta, con fluctuaciones entre el 21 % y 25 % [162].

Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran, entre los años 1999-2003 y 2000-2007, una elevada prevalencia de resistencia a la eritromicina, 34,3 % entre los aislados de la colección prevacunal disminuyendo hasta un 18,2 % en la colección de hemocultivos. En España la Dra. Fenoll refiere, para aislados invasivos, una proporción de resistencia del 28 % en el año 2001 y del 21,8 % en 2008. En nuestra serie de hemocultivos se observa también disminución de la resistencia a lo largo de los años que comprende, 2000-2007, pero más sostenida (25,6 % entre los años 2000-2001 y 23,1 % entre los años 2006-2007), ver fig 4.7. Por otra parte, el mantenimiento de las tasas de resistencia a los macrólidos a pesar de la implantación de la vacunación se asocia a la dispersión de clones que portan más de un mecanismo genético de resistencia a los macrólidos [224, 225], como ocurre entre los aislados estudiados en este trabajo.

Con respecto a la corresponsencia entre eritromicina y penicilina, esta ya se detectó en los primeros aislados resistentes a la eritromicina en los años ochenta. En aquel momento no parecía que la aparición concomitante de ambos tipos de resistencia estuviera relacionada ya que hasta ese momento, los aislados resistentes a la eritromicina eran resistentes además a otros tipos de antibióticos como tetraciclinas o cotrimoxazol, pero no necesariamente a penicilina. Por otra parte, en los estudios de portadores entre los aislados resistentes a macrólidos no era frecuente encontrar resistencia a penicilina [226, 227, 154]. Gracias a estos datos se postuló que la resistencia a la penicilina y a la eritromicina en *S. pneumoniae* habían surgido de forma independiente. Estos datos, obtenidos durante los años ochenta, contrastan con los recogidos durante la década de los años 90 y 2000, ya que se observó un aumento progresivo de los aislados resistentes a ambos antibióticos. En España se observó igualmente un aumento de este tipo de aislados, procedentes de pacientes pediátricos, de un 24 % en 1997 a un 35 % en 2003 [163], considerándose que la resistencia a los macrólidos surgió a partir de las cepas resistentes a la penicilina. Tras la introducción de la vacuna PCV7 en 2001

se observó una disminución de este tipo de aislados (11,5% en 2008). En los aislados procedentes de la población adulta, también se observó una disminución de estas resistencias en la década de los años 2000, pero menos marcada, pasando de un 18,9% en 1997 a un 11,5% en 2008 [162].

La permanencia de clones con resistencia a eritromicina en un contexto de reducción de resistencia a penicilina puede haber sido favorecida por dispersión de ciertos clones (incluyendo serotipos no-vacunales) que portan plataformas genéticas que codifican resistencia de carácter múltiple. Entre estos mecanismos podrían estar involucrados los transposones conjugativos que derivan de la familia del transposón Tn916 [228] y cuya aparición en las colecciones objeto de este estudio se discutirá más adelante.

Entre los aislados resistentes a la eritromicina de la colección prevacunal (n=244) se encontró que la resistencia global para la penicilina fue de un 69,9%, categorizados la mayoría de ellos como resistentes (54,3%) y el 15,3% categorizados como intermedios. Esta alta proporción de resistentes es superior a la que se obtiene de la población general (en la que no se diferencia resistencia o sensibilidad a la eritromicina), ya que los aislados categorizados como intermedios son mayoritarios (26,9%), lo que podría deberse a la dispersión de determinados clones con alta resistencia a la penicilina, quizá favorecido por el consumo de macrólidos. Con respecto a la cefotaxima, el porcentaje de resistencia entre los aislados resistentes a la eritromicina también fue mayor que entre los aislados de la colección general (30,7% vs 7,3% en la colección general) aunque en este caso se mantuvo una mayor proporción de aislados categorizados como intermedios (19,6% intermedios y 11,1% resistentes). (fig. 4.2).

Entre los aislados resistentes a la eritromicina de la colección de hemocultivos (n=78) también se observa una mayor proporción de resistencia tanto a la penicilina como a la cefotaxima que entre la población general. No se observa una disminución significativa de la resistencia ya que el 60,2% de los resistentes a eritromicina de la colección de hemocultivos fueron resistentes a penicilina (32,0% intermedio y 28,2% resistente) y el 29,5% fueron resistentes a la cefotaxima (20,5% intermedios y 9% resistentes). En este caso, predominaron los aislados intermedios sobre los resistentes (fig. 4.8). La permanencia de alta resistencia a los β -lactámicos en cepas invasivas podría haber sido favorecida por la permanencia de clones con resistencia a macrólidos y β -lactámicos. La colección de hemocultivos procede casi en su totalidad de población adulta, lo que explicaría el hecho de no observar disminución en las tasas de aislados con resistencia simultánea a los macrólidos y los β -lactámicos a pesar de la introducción de la vacuna conjugada heptavalente. También es importante tener en cuenta que entre los aislados de la colección de hemocultivos se observa un aumento del serotipo 19A, cuya presencia se ha relacionado con la no disminución de la resistencia y la multiresistencia [229].

La resistencia a la tetraciclina en *S. pneumoniae* aparece por vez primera en 1963 en Australia y se detecta a lo largo de toda la década de los años sesenta paralelamente al empleo de este antibiótico para el tratamiento de las exacerbaciones de la bronquitis crónica [154]. Sería importante considerar el papel de la selección "histórica" por tetraciclina de clones y plataformas de resistencia que servirían después para la vehiculación de resistencia a macrólidos. Aunque la resistencia a la tetraciclina no parece relevante actualmente desde el punto de vista terapéutico en nuestro entorno geográfico (a excepción de aminociclinas y derivados de tetraciclina como tigeciclina), si lo es desde el punto de vista epidemiológico. La dispersión y mantenimiento de ciertos clones resistentes a

macrólidos se asocia a la presencia de aislados que contienen derivados del transposón conjugativo Tn916 que portan como determinante genético de resistencia a la tetraciclina el gen *tetM*, pudiendo emplearse esta característica como marcador inicial de la presencia de estos elementos de conjugación. En nuestro estudio la tasa de resistencia a la tetraciclina entre los aislados resistentes a eritromicina fue elevada en ambas colecciones (69,6% en la colección prevacunal y 80,7% en la colección de hemocultivos) lo que hace sospechar sobre la probable presencia de diferentes elementos de trasposición entre nuestros aislados. La presencia del gen *tetM* y de derivados de Tn916 en estos aislados se discutirá más adelante.

La resistencia a las fluoroquinolonas en *S. pneumoniae* se encuentra directamente relacionada con el consumo de este tipo de antibióticos [230] y a pesar de mantenerse, por el momento, estable en España, encontrándose tasas no elevadas (2,6% en 2002 y 2,3% en 2006) [231] se han descrito varios casos de fracasos terapéuticos en otras zonas geográficas al emplear las fluoroquinolonas de forma empírica para tratamiento de la neumonía comunitaria causada por *S. pneumoniae*. En todos estos casos entre los factores de riesgo destacaba el tratamiento previo con fluoroquinolonas, EPOC, hospitalización previa y residir en centros de atención a pacientes crónicos [232]. En nuestro trabajo, un 2,4% de los aislados de la colección prevacunal fueron resistentes a levofloxacino (0,4% intermedio y 2% resistente) mientras que de la colección de hemocultivos sólo se encontró un aislado (0,2%) resistente a levofloxacino. En España la dispersión de esta resistencia en aislados recogidos en el año 2006 tras la comercialización de la vacuna PCV7) a los clones Spain^{9V}-3 y Sweden^{15A}-25 [231]. En nuestra serie únicamente se describieron dos aislados con valores de CMI que, aunque dentro del criterio de interpretación "sensible", pudieran indicar la presencia de mutaciones puntuales en las topoisomerasas. Por otra parte, cabe resaltar que en la Comunidad de Madrid se ha descrito un aumento de resistencia a levofloxacino debido a aislados de *S. pneumoniae* de serotipo 8 [233]. Aunque estos aislados se encontraron vinculados a los clones Spain^{9V}-3 y Sweden^{15A}-25 y ST276, que, también se encuentran presentes de forma mayoritaria entre los aislados de este estudio, en nuestro caso sólo se observa *switching* capsular hacia el serotipo 8 en dos aislados de la colección de hemocultivos, pertenecientes al clon Sweden^{15A}-25 y con CMI para levofloxacino en el límite del punto de corte descrito por el CLSI, 2 mg/mL.

Según diferentes autores el hecho de que no se haya producido un aumento significativo de la resistencia a este grupo de antibióticos, a pesar de que las quinolonas son uno de los tratamientos de elección para la neumonía comunitaria, puede deberse al coste biológico que supone para *S. pneumoniae* acumular mutaciones puntuales en las topoisomerasas [234, 235].

5.1.2. Determinantes genéticos de resistencia y fenotipos asociados

Desde la aparición de los primeros aislados resistentes a eritromicina se postuló una relación a nivel de mecanismo molecular entre las resistencias a los macrólidos y a las tetraciclinas [236]. Gracias a la demostración en 1980 de que varios genes que confieren resistencia a diferentes grupos de antimicrobianos podían transferirse mediante conjugación [237] fue posible llegar a la identificación poco tiempo después (1986) de los transposones conjugativos (ICEs) responsables de esta transmisión de multiresistencia en *S.*

pneumoniae [195, 238]. En dichos elementos se identificó como gen responsable de conferir resistencia a la eritromicina en *S. pneumoniae* al gen *ermAM* que se localizó en el trasposón Tn1545 [195]. Sin embargo con el aumento de las tasas de resistencia a los macrólidos y de la investigación de estos mecanismos pudo describirse que el gen mayoritario que codifica para la metilasa en neumococo es el gen *erm(B)* y que además existe otro mecanismo de resistencia por bombas de eflujo que a su vez viene codificado por los genes *mef*.

La resistencia mediada por metilasas [*erm(B)*] se dispersó inicialmente por transferencia horizontal y fue más prevalente entre los aislados resistentes en Europa [193, 239, 206] mientras que las bombas de expulsión fueron más prevalentes en los Estados Unidos [202, 239]. No obstante a lo largo de los años noventa en algunos países europeos se observó un aumento de los mecanismos mediados por expulsión [240, 241, 242].

Entre los aislados pertenecientes a la colección prevacunal se observó que la mayoría de los aislados resistentes a eritromicina eran portadores del gen *erm(B)* (80,7%), acorde con la epidemiología descrita en España y Francia para los años en los que se recogieron los aislados estudiados, mientras que el 18,4% (n=45) restante eran portadores de los genes *mef*, en concreto 44 de ellos eran portadores del gen *mef(E)* y sólo uno amplificó para el gen *mef(A)* (tab. 4.1), porcentaje menor que lo descrito para otros países europeos como Alemania (46,2%), Austria (41,7%) o Italia (25,0%) [243].

Cabe resaltar que entre estos 44 aislados portadores del gen *mef(E)*, 28 de ellos portaban a su vez el gen *erm(B)*, por lo que mostraban un fenotipo de resistencia asociado cMLS_B. La aparición de aislados con mecanismo dual (que portan dos mecanismos genéticos diferentes de resistencia) ya se había descrito en países asiáticos [244, 245] y normalmente se asociaban a la dispersión de un clon concreto. En nuestro caso, como se discutirá más adelante, los aislados con mecanismo dual no provienen de la dispersión de un clon concreto, sí no que reflejan una estructura poblacional policlonal. La aparición de aislados que presentan más de un mecanismo genético de resistencia a los macrólidos en nuestro estudio refleja un fenómeno global, de forma que su prevalencia tanto en Europa como en los EEUU se ha ido incrementando en detrimento de los aislados que contienen los genes *mef* como único determinante genético de resistencia [199, 246, 96]. Aún así, el patrón básico anteriormente descrito parece mantenerse, esto es, la presencia en algunas zonas de Europa del gen *erm(B)* como único determinante de resistencia de forma mayoritaria [247], y por el contrario, en EEUU de los genes *mef* como determinantes mayoritarios de resistencia [225], seguidos en ambos casos por los aislados con mecanismos duales.

La dispersión de aislados con mecanismos duales en diferentes áreas geográficas se ha asociado por una parte, al clon internacional de multirresistencia Taiwán^{19F}-14 y por otra a la aparición de complejos clonales como el CC81 y CC271. El clon Taiwán^{19F}-14 se asocia a los serotipos 19F y 19A y por este motivo la introducción de la vacuna PCV7 se podría relacionar con este aumento ya que el serotipo 19A no se encuentra en su cobertura (si en la vacuna PCV13); en cuanto al 19F, a pesar de estar incluido, es el que menor inmunogenicidad presenta de entre los serotipos incluidos en PCV7. Aún así, podría discutirse que la vacuna fuese el único factor predisponente al aumento de los aislados con mecanismos duales ya que en algunos estudios estos aislados se asocian a otros serotipos como el 23F o el 14 [246], aunque la aparición de diferentes serotipos podría explicarse por fenómenos de *switching* capsular. La dispersión de los complejos

clonales CC81 y CC271 se asocia a la dispersión del trasposón Tn2010 [199, 225], lo que sugiere la adquisición del elemento MEGA, y por tanto del gen *mef*(E) en un aislado portador previamente de elementos derivados de Tn916 que ya transportaban el gen *erm*(B) [167].

En la colección de hemocultivos, recogida en un periodo de tiempo en el que la vacuna PCV7 ya estaba implantada en la Comunidad Autónoma de Madrid, se observa una distribución análoga a la expuesta en cuanto a la proporción de aislados con los genes de resistencia descritos; entre los aislados resistentes a eritromicina (n=78) se encontró que la mayoría (74,7%) era portadores del gen *erm*(B), sólo un 7,7% amplificó únicamente para los genes *mef* [cinco aislados para el gen *mef*(E) y un aislado para el gen *mef*(A)] mientras que un 17,9% de los aislados eran portadores de ambos mecanismos genéticos de resistencia (tab: 4.6).

Esta distribución se mantiene esencialmente constante para nuestras colecciones de aislados respiratorios prevacunales y de cepas invasivas; curiosamente observamos un ligera mayor prevalencia de aislados con mecanismos duales en la colección de hemocultivos. Probablemente se debería a una más larga exposición previa a antibióticos en las enfermos que, frecuentemente tras colonización crónica, llegan a episodios invasivos, o bien al efecto de la PCV7. Desde el punto de vista genético, podría relacionarse con la dispersión de elementos conjugativos derivados del trasposón Tn916, como del trasposón Tn2010 [248].

5.1.3. Estructura poblacional en aislados con genes *mef*

Los serotipos 6A, 6B, 9V, 15A, 19F, 19A y 23F, que tradicionalmente se asociaron con la resistencia a diferentes grupos de antibióticos en *S. pneumoniae*, son los conocidos como “serotipos pediátricos” ya que eran los más frecuentemente aislados en los estudios de portadores nasofaríngeos. Los serotipos incluidos en la vacuna PCV7 son 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Dicha vacuna se diseñó de forma que incluía los serotipos que mayoritariamente causaban enfermedad neumocócica invasiva ya que en los EEUU en los años noventa, los serotipos 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19A y 19F suponían el 91% de estos casos y a su vez se trataba de los serotipos que se asociaban con mayor número de resistencias [249]. Tras la introducción de la vacuna PCV7 se observó una disminución significativa tanto en el número de casos como de aislados procedentes de enfermedad neumocócica invasiva, especialmente en niños menores de 5 años, así como en la incidencia de los serotipos incluidos en esta vacuna [47].

El fenómeno de la disminución en la incidencia de los serotipos incluidos en la vacuna a expensas del aumento de otros no incluidos ha sido fácilmente monitorizado y cuantificado en los EEUU gracias al modelo de implantación de la vacunación que se ha seguido. Entre los serotipos que han aumentado en incidencia desde la aplicación de la vacuna PCV7 en EEUU se encuentran 1, 5, 7F, 33F, los serotipos derivados del serogrupo 15 y sobre todo el 19A [250]. El aumento de este último se describió entre la población pediátrica (en niños menores de cinco años se observó un ascenso desde un 2,6% en los años 1998-1999 a un 47,2% entre 2006 y 2007) pero se ha observado también entre la población adulta (en el grupo de población comprendido entre 18-64 años se observó un aumento desde 2,9% a 16,6% en los mismos periodos de tiempo) y entre los mayores de 65 años (de 3,7% a 14,9% en los mismos periodos de tiempo) [47]. Este

aumento del serotipo 19A parece deberse a una suma de diferentes factores como la selección de determinados clones multiresistentes (que se discutirá más adelante) y el fenómenos de *switching* capsular [250, 251] sobre clones que previamente ya circulaban. Estas hipótesis se avalarían al tener en cuenta estudios en los que ya estaba presente el serotipo 19A previa a la implantación de la vacunación y tras ello no ha habido cambios significativos en su incidencia [252].

En España la implantación de la vacuna no ha sido tan uniforme como en EEUU, siendo la Comunidad de Madrid la única en la que se incluía dentro del calendario vacunal obligatorio hasta la entrada en vigor de la ley 4/2012 de la CM en julio de 2012, por la que se retira del mismo para todos los nacidos a partir del 10 de mayo de 2012. A pesar de ser obligatorio, se estima que la vacunación es generalizada en el resto del país. Es difícil cuantificar estos datos, y por tanto poder establecer asociaciones directas con los cambios poblacionales que se observan [50]. Aún así, en los estudios llevados a cabo se han observado cambios similares a los que se han producido en los EEUU, es decir, una marcada disminución en la incidencia de los serotipos incluidos en la vacuna [162].

Los serotipos incluidos en la vacuna heptavalente suponían entre los años 1979 y 1985 un 76,6% de los casos y aumentaron a un 88,0% entre los años 1998-2000. Tras la comercialización de la vacuna en España en el año 2002 y tomando como referencia dos periodos de tiempo (1997-2001 y 2007-2008), se observó una disminución significativa sólo en cuatro de los siete serotipos vacunales entre los aislados resistentes a penicilina: serotipo 6B (de 16,7% en el primer periodo a 0% en el segundo) 9V (de 15,4% a 9,1%) 19F (de 13,7% a 7,3%) y 23F (de 12,6% a 3,8%). El serotipo 14 se mantuvo constante (29,6% durante el primer periodo y 26,4% durante el segundo). Con respecto a los serotipos no incluidos en PCV7 se observó un aumento de éstos desde un 12,0% en el primer periodo hasta un 49,5% en el segundo especialmente debido a los serotipos 19A y 24F [162].

En nuestra serie, los serotipos que mayoritariamente se encontraron entre los aislados resistentes a los macrólidos y portadores de los genes *mef* (n=45) pertenecientes a la colección prevacunal fueron 14 (22%), 6B (17,7%), 19A (13,0%), 19F (11,0%), con la presencia minoritaria de otros como el 11A, 9V, 15A y 23F (fig 4.4). Cabe destacar que el serotipo 14, mayoritario de la colección prevacunal, no se encontraba entre los serotipos asociados a resistencia, sin embargo es posible la interpretación de un recambio capsular entre el serotipo 9V (generalmente asociado a resistencia) y el serotipo 14 [98]. La mayoría (8 de 10) de los aislados de nuestra colección prevacunal de serotipo 14 pertenecieron al complejo clonal Spain^{9V}-3.

Los serotipos 6A y 6B que tradicionalmente se asociaron con alto nivel de resistencia a los macrólidos y β -lactámicos se encuentran representados entre los aislados de nuestra serie en menor proporción. A su vez, el serotipo 23F, que representó durante las décadas de los ochenta y noventa la resistencia en *S. pneumoniae* a β -lactámicos en España, también aparece representado de forma minoritaria; sin embargo el serotipo 19A es el tercero en frecuencia, lo que podría sugerir *switching* capsular entre los serotipos 23F y 19A [97]. En nuestro estudio el serotipo 19A se encuentra representado mayoritariamente (4 de 6 aislados) por el clon ST276 cuya relevancia se discutirá más adelante. Podría decirse que los aislados portadores de los genes *mef* se encuentran repartidos entre varios serotipos, algunos de ellos como el 6A, 6B, 19F o 23F tradicionalmente asociados a la resistencia a antibióticos aunque otros como el 14 o el 19A se describen de forma

mayoritaria.

En cuanto a los aislados resistentes a eritromicina de la colección de aislamientos invasivos (hemocultivos), recogida en un periodo en el que la vacuna PCV7 estaba implantada en la Comunidad de Madrid, se observa que los aislados también se encuentran repartidos en varios serotipos, entre los que el mayoritario sigue siendo el serotipo 14 (18%), pasando el serotipo 19A a ser el segundo en importancia (15,4%). Estas observaciones han de tenerse en cuenta para evaluar el efecto de la implantación de la vacuna trece-valente (que incluye el serotipo 19A) [253]. La distribución del resto de serotipos es similar a la de la colección prevacunal en cuanto a que siguen estando representados serotipos como el 6A, 6B y 19F. Cabe destacar que los serotipos 23F y 9V aparecen representados de forma minoritaria aunque, como ya se ha expuesto anteriormente, la mayoría de los aislados de serotipo 14 (11 de 14) pertenecieron al complejo clonal Spain^{9V}-3. (fig. 4.9).

Esta colección comprende aislados recogidos entre los años 2000 y 2007 y por tanto existen diferencias en los serotipos encontrados en los primeros años del estudio (en los que el empleo de la vacuna no estaba generalizado) y los finales, sin embargo no se observa la misma tendencia que en otros estudios a disminuir de forma significativa los serotipos incluidos en la vacuna.

Los clones internacionales que se asociaron con la dispersión de los aislados resistentes en los años ochenta y noventa fueron principalmente los clones Spain^{23F}-1, Spain^{6B}-2, Spain^{9V}-3, Poland^{6B}-20, Sweden^{15A}-25 y England¹⁴-9 entre otros, siendo los principales en España durante esos años los clones Spain^{23F}-1 y Spain^{6B}-2 [163, 162]. Mediante la aplicación de la técnica de MLST y análisis por eBURST a los aislados con genes *mef* de la colección prevacunal hemos documentado que la población se distribuye en un patrón policlonal ya que 27 de estos aislados se clasificaron en 19 clones independientes y los 18 restantes en cuatro complejos clonales, con evidente variabilidad genética entre los complejos clonales incluyendo algunas nuevas secuencias tipo, así como diferentes variantes alélicas únicas (*s/v*) y dobles (*d/v*).

Es importante destacar que, en la colección de aislamientos prevacunales, el clon que más aislados agrupó (n=4), todos ellos del serotipo 19A estaba representado por la ST276 que es una *s/v* del clon Denmark¹⁴-32, clon responsable de la dispersión de los aislados de dicho serotipo tras la introducción de la vacuna PCV7 [254, 255] y que suele asociarse a los serotipos 19A, 14 y 24F (<http://spneumoniae.mlst.net>). El segundo clon en frecuencia corresponde al descrito por la ST549 que presenta recambio capsular ya que esta ST se asocia a los serotipos 19F y 19A (<http://spneumoniae.mlst.net>) y entre los aislados de nuestra colección pertenecientes a este clon se aparecen los serotipos 19F y 23F. Estos mismos serotipos (19F y 23F) son los que también se encuentran entre los aislados que forman el clon Spain^{23F}-1, aunque es difícil establecer una relación entre estos dos clones ya que no comparten ningún alelo de sus secuencias tipo. Otro clon que agrupó más de un aislado fue el clon ST62, cuyos aislados pertenecían al serotipo 11A tal y como se describe en <http://spneumoniae.mlst.net>. Entre los *singleton clones* se encontraron clones internacionales de multirresistencia como el Poland^{6B}-20, England¹⁴-9 y Norway^{NT}-42, así como la ST271 que se asocia a la dispersión de elementos de trasposición derivados de Tn916 [199, 225].

Entre los aislados agrupados en complejos clonales el que más aislados agrupó (n=10) de los serotipos 14 y 19A fue el CC Spain^{9V}-3 representado por STs *s/v* y *d/v* de la ST

fundadora ST156. Es importante destacar que la presencia de este clon se ha mantenido estable tras la aplicación de la vacuna PCV7 [163, 256] y que en nuestros aislados prevacunales ya aparece, con recambio o *switching* capsular, ya que ninguno de los aislados que lo formaban pertenecían al serotipo 9V y a su vez presenta gran variabilidad genética ya que la secuencia tipo que describe el clon tampoco se encuentra entre estos aislados. En el resto de los complejos clonales no se observa *switching* capsular y si que aparecen las STs fundadoras aunque también aislados con STs derivadas de éstas, lo que refleja la variabilidad de estos aislados.

Con respecto a los determinantes genéticos de resistencia a los macrólidos, cabe destacar que tanto en el caso de los complejos clonales como en el de los clones cada uno de éstos presentó aislados con el mismo genotipo, sin presentarse diferentes genotipos de resistencia en un mismo complejo clonal o clon y que la presencia del gen *mef(A)* se asoció al clon England¹⁴-9 (ver tab. 4.4 y tab. 4.5).

La distribución poblacional de nuestra población prevacunales es policlonal. Ya aparecen ciertos clones responsables de la dispersión del serotipo 19A, como el clon ST276, y la variabilidad genética en cuanto a los complejos clonales y el fenómeno de *switching* capsular están presentes. Esto implica que la influencia de la vacuna sobre la dinámica poblacional en cuanto a la distribución de serotipos y clones ha constituido tan solo uno de los factores condicionantes del paisaje poblacional. Por otra parte, se observa la presencia de complejos clonales y clones que se han mantenido tras la introducción de PCV7, como el CC Spain^{9V}-3 [163, 256], presentando el gen *mef(E)* como era característico en su descripción original [257], o el CC Sweden^{15A}-25 [163, 231]

En la colección de hemocultivos se observó también una estructura poblacional policlonal entre los 78 aislados resistentes a eritromicina. La mayoría de éstos se agruparon en clones independientes (SC), incluyendo el clon mayoritario Sweden^{15A}-ST63 conocido por vehicular la resistencia en *S. pneumoniae* previo a la introducción de la vacuna PCV7. Cabe destacar que a pesar de tratarse de un clon y no de un complejo clonal (todos los aislados que lo formaron pertenecían a la misma ST) se observa *switching* capsular ya que de los 7 aislados que lo formaban sólo 4 pertenecieron al serotipo 15A, siendo dos de los tres restantes del serotipo 8 (serotipo asociado en la Comunidad de Madrid a la resistencia a quinolonas [233]). Si analizamos la distribución de los determinantes genéticos de resistencia a los macrólidos, en este clon aparecen la mayoría de los aislados con el genotipo *erm(B)* aunque también hay un aislado portador de mecanismos duales *erm(B)+mef(E)*. Respecto a los 5 clones restantes detectados en la colección de cepas invasivas, sólo en uno de ellos (ST30) se observó *switching* capsular. Esta ST se asocia a los serotipos 16F, 19A y 23F (<http://spneumoniae.mlst.net>) y en el caso de nuestros aislados se encuentran los serotipos 16F y 9V. El serotipo descrito para los aislados pertenecientes al clon ST42 fue el 23A, que se corresponde con uno de los serotipos asociados a esta ST, pero cabe tener en cuenta que a esta ST también se asocian los serotipos 1 y 15C y que tanto el serotipo 1 como el serogrupo 15 han aumentado tras la implantación de la vacuna PCV7, de forma que este clon podría agrupar aislados ya seleccionados mediante la vacunación. Además los aislados pertenecientes a este clon (ST42) presentaron variabilidad en los genotipos de resistencia a los macrólidos, ya que se definió la presencia del gen *erm(B)* como único determinante genético de resistencia así como la de los genes *erm(B)+mef(E)*. También aparecen estos genotipos entre los aislados agrupados como clon ST1866, aportando un indicio de diversidad genética dentro de este clon, ya que el único serotipo descrito entre nuestros aislados fue el serotipo

4, que es el que se describe para la ST1866.

Con respecto a los complejos clonales de los aislamientos invasivos, de los 4 descritos el mayoritario (n=16) es (al igual que en la colección prevacunal) el CC Spain^{9V}-3 representado por la ST557 *dlv* de la ST fundadora ST156 y por la ST2246, *slv* de la ST156. En cuanto al *switching* capsular dentro de este complejo clonal el serotipo mayoritario es el 14 (n=11) aunque se observa también el serotipo 9V (inicialmente asociado a la ST156) y los serotipos 19F y 11A. Con respecto a los genes de resistencia a macrólidos, en este complejo clonal se encuentra alta variabilidad de genotipos ya que agrupa aislados portadores de *erm*(B) (n=10), de *erm*(B)+*mef*(E) (n=4) y de *mef*(E) (n=2), dado que en el caso de la colección prevacunal, el mismo CC sólo transporta un genotipo de resistencia. Podría deducirse que tanto la variabilidad genética con respecto a la ST inicial que describe el clon (ST156, que no aparece representada en ninguno de los aislados que forma el CC) como el recambio capsular han sido estrategias para acumular y dispersar diferentes mecanismos de resistencia a los macrólidos.

El segundo clomplejo clonal en número de aislados (n=11) es el CC Denmark¹⁴-32, que en la colección prevacunal aparece como clon y con menor número de aislados. Sólo un aislado de este CC no presenta el serotipo 19A, y corresponde a la ST fundadora de este clon (ST230) con serotipo es el 24. La ST276 del resto de los aislados corresponde al *slv* de la ST fundadora del clon Denmark¹⁴-32. Esta ST se describe en diferentes publicaciones como la responsable del aumento del serotipo 19A en Barcelona y en San Sebastian [254], así como del repunte de la resistencia a macrólidos [255]. Esta variabilidad en cuanto a serotipo y ST no se refleja en cuanto a genotipo de resistencia a los macrólidos, ya que sólo aparece el gen *erm*(B) entre los aislados pertenecientes a este complejo clonal.

Dentro del CC Spain^{6B}-2 (n=9) cabe destacar que el único aislado en el que se detecta una ST *slv* de la ST90 (ST fundadora del clon), la ST1624, que ya aparece en la colección prevacunal en el mismo CC, es a su vez el único aislado portador del mecanismo dual de resistencia.

Por último, el único CC (ST62-ST55) en que se describen aislados con sólo el gen *mef*(E), agrupa dos aislados con *slv* mutuas y de serotipos diferentes (19A y 11A), observación de interés por el posible reemplazamiento capsular promovido por la vacuna conjugada heptavalente. El aislado con serotipo 19A se detectó en el año 2003 (recién comercializada la vacuna PCV7 en España) y el aislado 11A en el año 2006 cuando en la Comunidad de Madrid ya se encontraba la vacuna incluida en el calendario vacunal infantil (tab. 4.8).

Como en el caso de la colección prevacunal, la distribución poblacional de los aislados procedentes de hemocultivos es de carácter policlonal aunque se observa mayor variabilidad a nivel de secuencias tipo, de serotipos y de genes de resistencia a los macrólidos tanto entre los complejos clonales como entre los clones.

5.2. Estudio de la estructura poblacional mediante el sistema semiautomático DiversiLab[®]

El empleo de esta técnica de repPCR para el tipado de *S. pneumoniae* se ha aplicado principalmente para la tipación de aislados con posible relación clonal en situaciones epidémicas concretas [138, 139]; para establecer la clonalidad entre aislados resistentes a la penicilina [140] y para establecer la posible clonalidad entre aislados con diferente serotipo en los que se sospecha *switching* capsular [97]. Se han generalizado técnicas asequibles y reproducibles inter-laboratorios para el establecimiento de relaciones clonales, como son MLST o PFGE, pero no existe, por el momento, apenas experiencia en la aplicación del sistema semiautomático DiversiLab[®].

En este trabajo se analizan mediante el sistema DiversiLab[®] diferentes aislados (tanto de la colección prevacunal, como de la colección de hemocultivos) caracterizados mediante MLST. Los patrones de gel virtual obtenidos se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson (PC) y el coeficiente de correlación Extended Jaccard (XJ). Mediante la aplicación del coeficiente de correlación de Pearson (PC), se le da más importancia en el análisis de las muestras a la intensidad de los picos en la imagen de gel virtual. Está indicado realizar este tipo de análisis cuando hay diferencias importantes en la cantidad y posición de los picos más intensos. Es el método a elegir cuando existen varios patrones de gel virtual diferentes a simple vista y queremos agrupar los aislados. Con la aplicación del coeficiente de correlación Extended Jaccard (XJ) se da más importancia en el análisis a la presencia o ausencia de picos en la imagen de gel virtual. En concreto es más sensible, ya que aprecia más diferencias incluso en picos pequeños, en geles virtuales en los que los patrones son muy parecidos entre sí.

El análisis global de los 43 aislados seleccionados de la colección prevacunal mostró que tanto por el método PC como por el método XJ existen posibilidades de formar agrupamientos en un mismo patrón o de diferentes patrones en un grupo. Dentro de estos patrones se agrupan aislados que pertenecen tanto a un mismo complejo clonal o clon como aislados no relacionados por eBURST. Dada la elevada variabilidad genética que hemos descrito anteriormente cabría pensar que dicha variabilidad puede reflejarse en el sistema semiautomático DiversiLab[®]. Cabe destacar que mediante el método PC se observan más agrupamientos que mediante el XJ (figs. 4.11 y 4.14).

Atendiendo al análisis realizado sobre los aislados que formaban el complejo clonal mayoritario, el complejo clonal Spain^{9V}-3 (n=10), se observa mayor diversidad en la agrupación mediante el método XJ que mediante el método PC. Sin embargo hay un patrón que por ambas metodologías agrupa a los mismos aislados (P2 mediante PC y P1 mediante XJ) que son todos ellos de serotipo 14. Sólo hay una *slv* (ST44) con respecto a la ST mayoritaria dentro del complejo clonal (ST557), con lo que estos seis aislados se interpretarían como indistinguibles mediante este sistema. Entre los cuatro aislados restantes, el método XJ discrimina más al dividir en tres patrones diferentes a los aislados agrupados bajo un mismo patrón por PC. Es importante destacar que en cuanto al *switching* capsular, los dos únicos aislados que no presentaban el serotipo 14, sí no el 19A, se agruparon bajo un mismo patrón por PC y en dos patrones diferentes por XJ, uno de ellos (P2) agrupando también un aislado de serotipo 14. En cuanto a la aparición de *slv* y *dlv* mediante el método XJ también agrupa como un patrón único a un aislado perteneciente a la ST2636 lo que podría indicar que el análisis mediante DiversiLab[®] podría

ser capaz de diferenciar aislados con un mismo origen (pertenecen al mismo complejo clonal) pero con diferencias como puede ser el intercambio capsular (fig. 4.14).

Esta idea se refuerza atendiendo al análisis para el complejo clonal Spain^{6B}-2 para el que por ambos análisis el sistema DiversiLab® agrupa en un mismo patrón los dos aislados del complejo clonal que son *s/v* de la ST fundadora (ST90). Lo mismo sucede con los 2 aislados que componen el CC Sweden^{15A}-25 ya que ambos pertenecen al serotipo 15A y portan los mismos genes de resistencia a los macrólidos, pero pertenecen a dos STs diferentes y se agrupan en dos patrones diferentes por ambos análisis. No pretendemos apoyar la posibilidad de que mediante este sistema se podrían distinguir cambios genéticos que mediante MLST se traducen en *s/v* o *d/v*, sino que la historia evolutiva de los distintos clones internacionales ha dado lugar a diferencias genéticas ocasionalmente detectables por DiversiLab®.

De hecho DiversiLab® no diferencia entre los 3 aislados formadores del CCST135-ST2638, los tres de serotipo 6B y portadores de mecanismos duales de resistencia a los macrólidos, ya que, independientemente de la ST se agruparon los 3 en un mismo patrón de gel virtual por ambos métodos (PC y XJ).

Con respecto a la distinción de clones con aislamientos múltiples, en el caso de los 4 aislados que formaban el clon Denmark¹⁴-32 (de serotipo 19A todos ellos) se agruparon bajo un mismo patrón de gel virtual tanto por análisis PC como por XJ lo que supone que estos aislados son indistinguibles entre sí. Esta observación es compatible con que el clon responsable de la diseminación del serotipo 19A tras la aplicación de la vacuna PCV7 [254] ya circulaba entre nuestros aislados prevacunales. Según el agrupamiento en un mismo patrón por ambos métodos, los dos aislados que formaban el clon Spain^{23F}-1 (de serotipo 23F todos ellos) podrían considerarse también indistinguibles.

En cambio para los aislados agrupados como clon ST549 (n=3) y ST62 (n=3) mediante análisis por PC se agruparon en un mismo patrón (uno para cada clon) y mediante XJ se encontraron diferencias. Con respecto al clon ST549, los 2 aislados pertenecientes al serotipo 23F se agruparon en un patrón diferente al descrito por el único aislado del serotipo 19F, lo que podría apoyar la posibilidad de detectar *switching* capsular mediante este sistema. Los tres aislados pertenecientes a este clon portaban mecanismos duales de resistencia a los macrólidos. Sin embargo, con respecto a los 3 aislados formadores del clon ST62, todos ellos de serotipo 11A y con el gen *mef(E)* como gen de resistencia a macrólidos, se agruparon en dos patrones diferentes de gel virtual mediante análisis por XJ, a pesar de ser aparentemente iguales por serotipo y MLST. Estos aislados no se encuentran entre los que se seleccionaron para el estudio de la presencia de transposones conjugativos, sin embargo, dada la elevada variabilidad de estructuras encontradas en este trabajo, podría proponerse que esta agrupación de un aislado, aparentemente idéntico a los demás, en un patrón diferente (P2) mediante XJ podría deberse a la presencia de estructuras de trasposición ligeramente diferentes (fig. 4.15).

Entre los 13 clones independientes analizados, representados cada uno de ellos por un único aislado, el análisis por XJ mostró más patrones que por PC, por lo tanto se confirmaría la estructura policlonal de la población prevacunal. Esto también se apoyaría en que tras los análisis por ambos métodos no se encontraron relaciones entre los aislados incluidos en cada uno de los patrones con serotipos, clones internacionales de multiresistencia o determinantes genéticos de resistencia para los macrólidos (figs. 4.16 y 4.17).

El análisis global de los 49 aislados seleccionados de la colección de hemocultivos mostró (al igual que en la colección prevacunal) que el método XJ es capaz de discriminar más la variabilidad que el método PC ya que mediante XJ se describieron 41 patrones y dos grupos mientras que por PC se describieron 26 patrones y dos grupos. Es interesante destacar que los aislados que pertenecen a los clones Sweden^{15A}-25, clon ST1866 y complejo clonal ST62-ST55, se agrupan bajo un mismo grupo o patrón mediante el análisis XJ y también mediante el análisis PC en los análisis por complejos clonales y clones, como se describirá a continuación (figs. 4.18 y 4.19).

En el caso del análisis realizado sobre los once aislados pertenecientes al complejo clonal Spain^{9V}-3, se detectan nueve patrones mediante el análisis PC y ocho en el análisis XJ. En ambos análisis se observa una coincidencia entre patrones PC o XJ y serotipos (figs. 4.20 y 4.21). Mediante el análisis por el método PC distinguimos dos grupos formados por diferentes patrones (G2 y G3), cabe mencionar que en el G2 los 3 aislados del P1 (de serotipo 14) se agruparon con el único aislado del P4 (de serotipo 19F) pudiendo indicar un cambio capsular del serotipo 19F al serotipo 14 tras el empleo de la vacunación PCV7, ya que el serotipo 19F se encuentra incluido en dicha vacuna y dicho cambio capsular ya se ha descrito en España para este complejo clonal [257]. En este complejo clonal los tres aislados de serotipo diferente al 14, uno 9V, otro 11A y otro 19F, no formaron grupo ni patrón con otros aislados mediante el método PC. El mismo fenómeno se observó con respecto a los dos aislados que no fueron de ST557, sí no de ST2246, que no formaron ni grupo ni patrón con otros aislados, ni entre ellos mismos tanto por PC como por XJ.

En el análisis del complejo clonal Denmark¹⁴-32, tanto por PC como por XJ, el único aislado del complejo que presentó características diferentes (ST230 y serotipo 24) con respecto a los demás aislados del complejo clonal, formó parte de un mismo patrón con otro aislado de ST276 y serotipo 19A, encontrándose patrones independientes entre el resto de aislados de ST276 y serotipo 19A.

Resultados coincidentes con el análisis mediante eBURST se observan en el complejo clonal Spain^{6B}-2, ya que mediante el método PC los dos aislados pertenecientes a la ST90 (ST fundadora que describe el clon) de serotipo 6B y con el gen *erm*(B) formaron un mismo patrón, mientras que el único aislado de ST1624, también de serotipo 6B y con los genes *erm*(B)+*mef*(E) formó otro patrón. Sin embargo mediante el análisis por XJ, los tres aislados formaron tres patrones independientes. Esto podría sugerir que estos aislados del periodo 2000-2007 presentan una variabilidad mayor que los aislados en el periodo 1999-2003, ya que en la colección prevacunal, en el análisis por el método XJ el agrupamiento fue igual que el descrito por el método PC.

Con respecto al complejo clonal Spain^{23F}-1, mediante el análisis por PC se agrupan todos los aislados en un mismo patrón, aunque mediante XJ sólo se integran en un mismo grupo. Esto reforzaría la idea de mayor variabilidad genética entre los aislados de la colección del periodo 2000-2007, ya que también el caso de este complejo clonal en la colección prevacunal, sólo se describió un patrón. Este fenómeno también se observa al estudiar el complejo clonal ST62-ST55 ya que los dos aislados formadores a pesar de presentar diferente ST y serotipo (11A y 19A) se agrupan bajo un mismo patrón mediante los dos tipos de análisis. En este caso se demostraría acumulación de cambios genéticos con respecto a la colección prevacunal, ya que en ésta sólo se describe el clon ST62 (no se describen otras *slv* como la ST55) pero mediante el análisis XJ se observan

agrupaciones en diferentes patrones a pesar de que los aislados presentaban las mismas características genotípicas y fenotípicas.

En cuanto al análisis de los aislados agrupados en clones con aislamientos múltiples y de los clones *singleton clones* (clones formados por un único aislado) atendiendo a las diferencias encontradas entre los dos tipos de métodos se observaron tres tipos de resultados.

- Se detectan agrupaciones que asocian genotipos de resistencia a macrólidos, en independencia de serotipo y ST. Para el clon ST1866 se observó que a pesar de estar formado por 3 aislados del mismo serotipo (serotipo 4), mediante el análisis PC formaron un mismo patrón mientras que mediante el análisis XJ se describieron dos patrones diferentes, uno de ellos agrupando los aislados con genotipo dual de resistencia a macrólidos y el otro con el gen *erm(B)*. A pesar de ser más discriminativo en describir diferencias genéticas, en este caso en base al genotipo de resistencia a los macrólidos, en el análisis XJ estos dos patrones formaron un grupo, lo que podría interpretarse como modificaciones intraclonales. Ocurre lo mismo en los *singleton clones* (7 clones) con la salvedad de que entre éstos no hay relación por ST ni por serotipo. Mediante el análisis por PC se diferencian dos grupos, ambos formados por dos patrones, en el grupo 1 se podría establecer una relación en cuanto al gen *erm(B)*, mientras que mediante el análisis XJ los 7 clones independientes representan un patrón de gel virtual diferente cada uno de ellos, reforzando que el análisis XJ es más discriminativo (figs. 4.24 y 4.25).
- Se detectan agrupaciones entre aislados mediante el análisis PC que no se corroboran mediante el XJ. Para el clon Sweden^{15A}-25, formado por 5 aislados, mediante el análisis PC se describen 3 patrones diferentes y un grupo, sin poder establecer entre los aislados de un mismo patrón relación en cuanto a serotipo o genotipo de resistencia a macrólidos. Sin embargo mediante el análisis XJ los 5 aislados describieron un patrón diferente de gel virtual cada uno de ellos (figs 4.22 y 4.23). Lo mismo ocurre para los aislados formadores de los clones Engand¹⁴-9 y clon ST42, ambos formados por 2 aislados cada uno. Se describe un único patrón mediante PC y dos patrones mediante XJ. Esto avala que el análisis XJ sería más sensible a detectar cambios dentro un mismo clon, con lo que podrían detectarse modificaciones genéticas entre aislados que estarían considerados como clones puros.
- Se detecta un bajo nivel de agrupaciones incluso entre aislados formadores de un mismo clon, tanto por PC como por XJ. Se observa en los clones ST89 y ST30 pudiendo sugerirse que los aislados formadores de estos clones acumulan más diferencias genéticas a pesar de pertenecer a un clon (figs. 4.24 y 4.25)

5.3. Cálculo de la diversidad genética mediante índices matemáticos

Mediante la aplicación de diferentes índices matemáticos es posible evaluar la diversidad genética y su distribución entre los aislados prevacunales y de la colección de hemocultivos y a su vez entre los aislados portadores de los diferentes genotipos de resistencia a los macrólidos [258].

El índice de diversidad clonal (CD) expresa la proporción de diferentes STs por número de aislados de forma que así es posible determinar la proporción de diversidad, pero no la distribución de ésta entre los aislados. Para poder describir la probabilidad y distribución de la diversidad es necesario aplicar otros índices matemáticos como el índice de Simpson (D) que calcula la probabilidad de la diversidad ya que es independiente del tamaño muestral y aplica probabilidades relativas, y los índices de Selander-Levin (H) y Shannon (H') que muestran la distribución de la diversidad entre los aislados estudiados.

Estos análisis mostraron que tanto la probabilidad de diversidad como su distribución es mayor entre los aislados procedentes de la colección de hemocultivos y dentro de esta colección, atendiendo al genotipo de resistencia a los macrólidos, es superior entre los aislados portadores de los genes *erm(B)+mef(E)* y de los portadores del gen *erm(B)* como único determinante genético de resistencia (figs. 4.26 y 4.27). Si comparamos la distribución de la diversidad entre las dos poblaciones no parece haber grandes diferencias entre los aislados prevacunales y los procedentes de hemocultivos que hemos estudiado, lo que sugiere que la invasividad de *S. pneumoniae* es independiente de clones específicos ya que refleja la misma diversidad que los no-invasivos de la colección prevacunal (figs. 4.26 y 4.27).

La hipótesis de asumir que los mecanismos duales se producen por la adquisición del gen *mef(E)* por parte de un aislado que ya es portador del gen *erm(B)* podría sugerirse, ya que los aislados portadores del gen *erm(B)* muestran una distribución de diversidad ($H' = 3,75$) en la colección de hemocultivos que parece disminuir levemente al observar los aislados con mecanismos duales ($H' = 3,32$) de la misma colección. Además la descripción de aislados con mecanismos duales ha ido incrementando en diferentes estudios tanto en Europa como en los EEUU [199, 246, 96]

En los datos aportados mediante el análisis poblacional con el método Diversilab[®], se muestra una menor capacidad de agrupar aislados en la colección de hemocultivos y por tanto podría sugerirse una mayor diversidad genética en esta población. Aplicando el índice de evento (E) para evaluar la distribución de la diversidad genética, es en la colección de hemocultivos donde se encuentran valores discretamente inferiores, en especial en los aislados portadores de los genes *mef* como único determinante genético de resistencia. A su vez, los valores de E para los aislados tanto con mecanismos duales como únicamente con el gen *erm(B)*, son también inferiores en la población de hemocultivos, pero las diferencias son mucho menores con respecto a los valores obtenidos para la población prevacunal (tab. 4.11).

Por lo tanto podría sugerirse que los perfiles relativamente homogéneos de los clones invasivos con mecanismos duales de nuestra colección son análogos a los de los clones con mecanismos duales que se encuentran colonizando las vías respiratorias, indicando la accesibilidad de estos clones a la infección invasiva.

5.4. Elementos de transposición

En los últimos años se han publicado en la literatura estudios en los que se pone de manifiesto la implicación de diferentes elementos de transposición en la acumulación de varios mecanismos de resistencia tanto a grupos de antibióticos distintos [259] como dentro de los de un mismo grupo. Esto sucede en el caso los macrólidos, en el que se observa la presencia de aislados con genes que codifican para diferentes mecanismos de resistencia, en relación con la presencia de diferentes transposones conjugativos [167, 199]. Muchos de ellos son variantes resultantes de la adquisición de otros elementos en la plataforma básica de Tn916. En este trabajo se han realizado diferentes aproximaciones para la caracterización de elementos implicados en resistencia a macrólidos, mediante la amplificación de marcadores de las secuencias genéticas esperadas, y de las regiones con alta probabilidad de inserción de otros elementos (*hot spots*) o “puntos calientes”. Se han obtenido resultados en ocasiones inesperados, que sugieren en su conjunto la presencia de estructuras polimórficas en los elementos de transposición descritos en la literatura, que podrían haber emergido de la evolución local de los elementos de transposición.

Mediante el análisis de los resultados obtenidos no es posible establecer diferencias en cuanto a la presencia y frecuencia de elementos de transposición en función de la colección de procedencia. De acuerdo con la información obtenida mediante los diferentes estudios aplicados en este trabajo, a pesar de que ambas colecciones son de carácter policlonal y genéticamente diversas, los resultados obtenidos sobre los aislados de la colección más reciente muestran que ésta posee mayor diversidad genómica y que por tanto no se justificaría por diferencias en los elementos de transposición.

No se obtuvieron correlaciones entre los resultados de las amplificaciones relacionadas con la presencia de elementos conjugativos y determinados clones o complejos clonales. Detectamos estructuras más complejas o indicios de múltiples copias del transposón Tn916 entre los aislados que forman parte de complejos clonales, como ya se ha descrito anteriormente [260]. Dichos complejos son frecuentemente estructuras de adaptación a condiciones locales próximas, y que eventualmente formarían conjuntos de intercambio génico entre organismos *kin-related*, esto es, ligados por lazos genealógicos.

Por otra parte, la observación de marcadores de diferentes transposones y elementos conjugativos es más frecuente entre los aislados con mecanismos duales que entre los aislados portadores únicamente de los genes *mef* como determinante genético de resistencia a los macrólidos. En los estudios sobre la frecuencia de elementos de transposición en *S. pneumoniae*, estos se asocian a los aislados con presencia de dobles mecanismos de resistencia a los macrólidos [167, 199]. En el caso de nuestras colecciones, tanto mediante técnicas de tipado molecular como mediante el cálculo de la diversidad y su distribución mediante índices matemáticos, la población con mayor diversidad genética traducida en recambio capsular de serotipos, variedad de STs formadoras de complejos clonales (CC) o valores elevados en los índices, fue la que comprendía los aislados con mecanismos duales [258]. A pesar de esta variabilidad genética (o debido a ella) no se describe en la literatura, siendo posible que este tipo de aislados tenga mayor frecuencia de transformación [261].

Se detecta la aparición de marcadores de estructuras conjugativas derivadas de Tn916 en aislados en los que no es posible mostrar mediante amplificación la presencia del gen

tetM, pudiendo tratarse de estructuras en mosaico [193] en las que pueden existir polimorfismos o diferencias en la secuencia genética que no han sido detectables mediante la aplicación de las técnicas moleculares empleadas en este trabajo, apoyando así la idea de alta diversidad genética en nuestras colecciones.

Si analizamos los resultados obtenidos por colecciones podemos observar que entre los aislados procedentes de la colección prevacunada en todos los aislados con mecanismos duales (n=28) pudo obtenerse una amplificación positiva para el gen *tetM* siendo posible en la mayoría de ellos amplificar los genes marcadores de la presencia de Tn916, pero sin embargo en 7 de ellos sólo se encontró resultado positivo para la escisionasa (*xis*). La ausencia de amplificación para el gen que codifica para la integrasa podría relacionarse con polimorfismos en la secuencia, ya que esta proteína promueve la inserción de Tn916 en el genoma del microorganismo receptor y *S. pneumoniae* y posee alta capacidad de recombinación [259]. En las cepas con mecanismos duales se pudo también inferir la presencia de elementos conjugativos como Tn2009 y Tn3872 así como de derivados de los elementos Tn6002 o Tn6003 [167]. En estas cepas la literatura describe transposones Tn6002 y Tn3872 en los clones Sweden^{15A}-25, Denmark¹⁴-32 y Spain^{6B}-2 [228, 262, 263]. No se detectó en ningún caso la integrasa del transposón Tn917, *tnpA*, que no es amplificada en ninguno de los aislados, mientras que sí se amplifica el gen *tnpR* (que codifica para la excisionasa) en 9 aislados, de los cuales sólo en 5 se puede establecer la presencia del elemento conjugativo Tn3872, ya que se liga Tn917 a Tn916 (tab. 4.12).

La ausencia de las integrasas de Tn916 y de Tn917 en aislados en los que se observa la presencia de elementos conjugativos derivados de Tn916, se produce en tres aislados pertenecientes a un mismo complejo clonal (CC ST135-ST2638) y del mismo serotipo, lo cual podría relacionarse con la dispersión clonal a partir de uno de ellos en los que existieran estructuras recombinantes de dichas integrasas (tab. 4.12).

El estudio de la región de Tn916 en la que se inserta el elemento MAS en los aislados con mecanismo dual de resistencia también cabe resaltar la complejidad de resultados obtenida, ocasionalmente con amplificaciones múltiples de dicho elemento en un mismo aislado. La presencia de más de una copia del transposón Tn916 en estos aislados, con inserciones de MAS en alguna de estas copias, daría lugar a que en un mismo aislado se encontrara Tn916 y, simultáneamente, sus derivados Tn6002 o Tn6003. Algunos aislados presentaron amplificaciones dobles. Este hecho podría explicarse por polimorfismos en la secuencia de hibridación de los cebadores, ya que se trata de un *hot spot* esto es, zona con mayor tendencia a recombinar.

Los resultados obtenidos entre los aislados con genes *mef* son más sencillos de interpretar, ya que tanto en presencia como en ausencia de *tetM* la presencia de Tn916 es escasa. En la mayoría de estos aislados no se observa la presencia del gen que codifica para la resistencia a tetraciclina, y que las escasas amplificaciones que se observan el resto de marcadores genéticos son en mosaico, siendo el gen de la integrasa de Tn916 (*int*) el más fácilmente amplificado en este caso. Sólo en dos de estos aislados podría inferirse la presencia del elemento Tn2009, aunque no se confirma ya que no se observa amplificación alguna que demuestre que MEGA y Tn916 están ligados. Por último, en el único aislado de la colección portador del gen *mef(A)* se observa la presencia de Tn916 y del gen *tetM*, además, en los dos aislados con amplificación para el gen *mef(E)* se obtuvo la amplificación de MEGA degradado, cuyo mapa de restricción con diferentes

enzimas puso de manifiesto la presencia de una posible variante de MEGA (tab. 4.13).

Entre los aislados procedentes de la colección de hemocultivos, se observa mayor complejidad de estructuras entre los portadores de mecanismos duales. En los 14 aislados seleccionados se observa la presencia de Tn916 mayoritariamente entre los aislados portadores del gen *tetM*. No parece que haya inserciones de otros elementos en estos aislados, salvo en el caso de la amplificación que pondría de manifiesto la inserción de MEGA en Tn916 sugiriendo la presencia de Tn2009 [167], para la cual existen amplificaciones dobles en algunos aislados, pudiendo interpretarse como la presencia de más de una copia de Tn916. En tres aislados en los que no se observó la presencia del gen *tetM* si se observó la presencia de Tn916, pudiendo deberse la amplificación negativa a polimorfismos en la secuencia del gen *tetM* [187] o a la presencia de otras estructuras de transposición [193] (tab. 4.14).

Con respecto a los aislados de esta misma colección que poseen genes *mef* como único determinante de resistencia también se observa una menor presencia de elementos conjugativos con respecto a los *S. pneumoniae* con mecanismos duales. En dos aislados se detecta la presencia de excisionasa (*xis*), mientras que sólo en uno de ellos se detectó también la integrasa (*int*) de Tn916. Estos aislados, sin embargo, no mostraron amplificaciones que demostraran la presencia de otros elementos. Por el contrario se detectó la posible presencia de más de una copia de Tn916 y de Tn2009 en un aislado. En contraste con la colección prevacunal, en este caso el único aislado portador del determinante genético de resistencia *mef(A)* no mostró la presencia de ningún transposón conjugativo (tab. 4.14).

Se analizó la presencia de estas estructuras entre los aislados que formaban el complejo clonal mayoritario, CC Spain^{9V}-3, formado por 17 aislados (agrupando los procedentes de ambas colecciones). Como ya se mencionó anteriormente, en este CC sólo se observa la presencia de mecanismos duales entre los aislados procedentes de la colección de hemocultivos. Dicha colección se recogió en el contexto de la implantación de la vacuna conjugada heptavalente y refleja el intenso recambio capsular (ninguno de ellos pertenece al serotipo 9V), tanto entre los aislados prevacunales como en los procedentes de hemocultivos. Dentro de este complejo clonal CC Spain^{9V}-3, los aislados con mecanismos duales presentan mayor variabilidad de marcadores de elementos conjugativos, con la presencia de un posible Tn2009 y de más de una copia de Tn916 (tab. 4.15).

Los serotipos relacionados con estos aislados difieren del serotipo predominante (14), siendo 11A y 19F, pudiendo estar relacionado con un efecto acumulativo de variabilidad genética ya que en el análisis de estos aislados mediante DiversiLab[®], el aislado de serotipo 11A presenta un patrón único y no relacionado con el resto de los aislados del mismo complejo clonal (figs. 4.20 y 4.21).

También se analizaron los resultados obtenidos para los aislados de ambas colecciones pertenecientes al serotipo 19A, dada su importancia en el posible reemplazamiento de serotipos inducido por la vacunación. Entre estos 7 aislados, sólo uno de ellos fue coleccionado en el periodo en el que la vacunación ya estaba vigente en la Comunidad de Madrid, con lo cual inferimos que este serotipo ya se encontraba circulando previamente a la introducción de la vacunación en Madrid. Tampoco el análisis de los elementos conjugativos puede relacionar el efecto de la vacunación con la aparición de elementos de transposición, ya que es en los aislados prevacunales en los que se encuentra la presencia de estructuras Tn916 y de sus derivados Tn6002 o Tn6003, todo ello en aislados

portadores de mecanismos duales y pertenecientes a un mismo clon, Denmark¹⁴⁻³², explicando así el mantenimiento de la resistencia tanto a β -lactámicos como a macrólidos entre los aislados del serotipo 19A [255].

Por último, en dos aislados de la colección prevacunal no relacionados clonalmente, portadores del gen *mef(E)*, en los que no fue posible detectar la presencia del elemento MEGA, tras realizar una digestión enzimática a estos dos aislados y, por comparación con la digestión de los aislados control, se observó que el patrón aparecía degradado, mostrando bandas de diferente tamaño a las esperadas. Esto podría corresponderse con polimorfismos en las secuencias de MEGA, incluso de los propios genes *mef*, como ya se ha descrito en la literatura [180, 176, 177].

En el presente trabajo se ha intentado considerar simultáneamente la prevalencia de mecanismos de resistencia que afectan a los macrólidos en dos colecciones sucesivas de aislamientos clínicos de *S. pneumoniae*, junto con el análisis de asociaciones entre dichos mecanismos, dentro de la investigación de la estructura poblacional de las cepas comparando MLST y DiversiLab[®], y de su contenido en marcadores de elementos de transposición relacionadas con la resistencia a los macrólidos.

Conclusiones

“Todos los objetos de la razón e investigación humana pueden, naturalmente, dividirse en dos grupos, a saber: relaciones de ideas y cuestiones de hecho”

Hume

6 Conclusiones

1. La resistencia a los macrólidos de los aislados de *Streptococcus pneumoniae* en España (1999 y 2003, colección prevacunal) es elevada (34,3%), acompañándose de altas tasas de resistencia a penicilina.
2. Entre los aislados resistentes a macrólidos de la misma colección prevacunal, la resistencia a penicilina (69,6%, con alto nivel de resistencia) y tetraciclina (69,6%) es muy elevada.
3. Los aislados de *S. pneumoniae* con amplificación positiva para los genes *mef* de la colección prevacunal presentan altas tasas de resistencia para penicilina (82,2%), con alta resistencia a la tetraciclina (68,8%).
4. El determinante genético *erm*(B) es el más prevalente (80,7%) entre los aislados de *S. pneumoniae* de la colección prevacunal. Un 11,4% de los aislados prevacunales presenta simultáneamente dos mecanismos genéticos de resistencia a los macrólidos, *erm*(B) y *mef*(E), un porcentaje más alto de lo esperado de acuerdo con la revisión de la literatura. Entre estos aislados con mecanismos duales se encontró amplificación positiva para el gen *tetM* en un 100% de los casos.
5. Los aislados prevacunales con evidencia de genes *mef* pertenecen mayoritariamente a los serotipos 14, 6B y 19A; de forma minoritaria a los serotipos 23F, 19F y 9V. Es de resaltar la presencia significativa del serotipo 19A (13%) entre estos aislados (antes de la introducción de la vacuna PCV7). En esta colección coexisten clones clásicamente asociados a la multiresistencia como el Spain^{23F}-1 o el Spain^{6B}-2 con clones que han persistido tras la introducción de la vacuna (CC Spain^{9V}-3 y CC Sweden^{15A}-25), así como secuencias-tipo asociadas a la posterior dispersión clonal y mantenimiento del serotipo 19A como la ST276.
6. La resistencia a los macrólidos entre los aislados de *S. pneumoniae* procedentes de hemocultivos obtenidos en el Hospital Universitario Ramón y Cajal (2000-2007) se mantiene elevada (18,2%). La resistencia a penicilina es inferior (22,8%) a la del periodo prevacunal con marcada presencia de aislados con criterio de interpretación de CMI "intermedio".
7. Entre los aislados resistentes a macrólidos de la misma colección postvacunal, la resistencia a penicilina (sólo 28,2% con alto nivel de resistencia) y tetraciclina es muy elevada (60,2% y 8,7% respectivamente).
8. El determinante genético *erm*(B) es también el más prevalente entre los aislados de *S. pneumoniae* de la colección postvacunal (92,3%) encontrándose entre estos aislados en un 52,7% el gen *tetM*. Una cifra elevada (17,9%) de los aislados prevacunales presenta simultáneamente dos mecanismos genéticos de resistencia a los macrólidos, *erm*(B) y *mef*(E).
9. Los aislados postvacunales con evidencia de genes *mef* pertenecen mayoritariamente a los serotipos 14 (pese a la introducción de PCV7), 19A y 6B; de forma

minoritaria a los serotipos 23F, 15A y 1. En esta colección coexisten clones internacionales clásicamente asociados a la multirresistencia como el Spain^{6B}-2 o el England¹⁴-9 siendo los complejos clonales Spain^{9V}-3 y Denmark¹⁴-32 los asociados al serotipo 19A.

10. La diversidad genética, expresada en la aparición de *slv*, *dlv* y en *switching* capsular, es superior entre los aislados de *S. pneumoniae* procedentes de la colección postvacunal que en los pertenecientes a la colección prevacunal.
11. El coeficiente de correlación Extended Jacard (XJ) permite detectar mayor diversidad genética que mediante el coeficiente de correlación de Pearson (PC) cuando se aplica a los resultados del sistema semiautomático DiversiLab[®]. Los agrupamientos que se observan mediante el sistema DiversiLab[®] no son coincidentes con los descritos mediante otras técnicas de tipado como MLST.
12. Mediante la aplicación de diferentes índices matemáticos para evaluar la diversidad genética y la distribución de dicha diversidad entre los aislados con amplificación positiva para los genes *mef* (tanto de la colección de prevacunal como de hemocultivos), se observa una mayor diversidad entre los aislados de la colección de hemocultivos y mayor distribución de la diversidad genética entre los aislados de la colección prevacunal, en ambos casos, entre los aislados con mecanismos duales [*erm*(B) y *mef*(E)].
13. La detección de marcadores de diferentes trasposones conjugativos derivados de Tn916 puso de manifiesto la frecuente existencia de dichos elementos tanto en la colección prevacunal como en la colección de hemocultivos. Dichos elementos se asociarían con el mantenimiento y dispersión clonal de los aislados multirresistentes en el marco de la vacunación trece-valente.
14. Se observa mayor heterogeneidad de estructuras derivadas de Tn916 entre los aislados con ambos determinantes genéticos de resistencia, *erm*(B) y *mef*(E), que en aquellos que presentan el gen *mef* como único determinante genético de resistencia a los macrólidos.

Índice de figuras

1.1. Patrón radiológico de neumonía típica	14
1.2. Tinción de Gram de <i>S. pneumoniae</i> en una muestra de esputo con criterio de aceptación valorable para el cultivo	18
1.3. Macrólidos con anillo lactónico de 14 átomos	42
1.4. Azitromicina: macrólido con anillo lactónico de 15 átomos	43
1.5. Macrólidos con anillo lactónico de 16 átomos	44
1.6. Trasposones conjugativos que incluyen Tn916 (modificada de la referencia [167])	49
1.7. Elemento MEGA	52
1.8. Derivados de MEGA (modificada de la referencia [167])	53
3.1. Esquema de PCR multiplex para la detección de los genes <i>mef</i>	73
4.1. Resistencia a antimicrobianos entre los aislados de la colección prevacunal inicial (n=712)	84
4.2. Resistencia a antibióticos de los aislados resistentes a eritromicina de la colección prevacunal (n=244)	85
4.3. Resistencia a antibióticos entre los aislados con amplificación positiva para los genes <i>mef</i> de la colección prevacunal (n=45)	86
4.4. Distribución de serotipos entre los aislados de la colección prevacunal resistentes a eritromicina y con amplificación positiva para los genes <i>mef</i> (n=45)	87
4.5. Relación entre el análisis por eBurst y lods determinantes genéticos de resistencia a macrólidos mediante <i>Minimum Spanning Tree</i> en los aislados de la colección prevacunal	89
4.6. Resistencia a antibióticos de los aislados de la colección general de hemocultivos (n=416)	93
4.7. Tendencia de la resistencia a eritromicina a lo largo de los años en los que se coleccionaron los aislados procedentes de hemocultivos	94
4.8. Resistencia a diferentes antibióticos de los aislados resistentes a eritromicina de la colección de hemocultivos (n=78)	95
4.9. Distribución de serotipos de los aislados de la colección de hemocultivos	96
4.10. Relación entre el análisis por eBurst y lods determinantes genéticos de resistencia a macrólidos mediante <i>Minimum Spanning Tree</i> en los aislados de la colección de hemocultivos	97
4.11. Análisis global de los resultados obtenidos mediante DiversiLab [®] por el método PC de la colección prevacunal	105
4.12. Análisis global de los resultados de DiversiLab [®] por el método XJ de la colección prevacunal	106
4.13. Colección prevacunal CC Spain ^{9V} -3. Análisis por el método PC	107

4.14. Colección prevacunal CC Spain ^{9V} -3. Análisis por el método XJ	107
4.15. Colección prevacunal Clon ST62. Análisis por los métodos PC y XJ	108
4.16. Colección prevacunal <i>singleton clones</i> . Análisis por el método PC	108
4.17. Colección prevacunal <i>singleton clones</i> . Análisis por el método XJ	109
4.18. Análisis global de los resultados de DiversiLab [®] por el método PC de la colección de hemocultivos	111
4.19. Análisis global de los resultados de DiversiLab [®] por el método XJ de la colección de hemocultivos	112
4.20. Colección hemocultivos CC Spain ^{9V} -3. Análisis por el método PC	114
4.21. Colección hemocultivos CC Spain ^{9V} -3. Análisis por el método XJ	114
4.22. Colección hemocultivos Clon Sweden ^{15A} -25. Análisis por el método PC	116
4.23. Colección hemocultivos Clon Sweden ^{15A} -25. Análisis por el método XJ	116
4.24. Colección hemocultivos <i>singleton clones</i> . Análisis por el método PC	117
4.25. Colección hemocultivos <i>singleton clones</i> . Análisis por el método XJ	118
4.26. Diversidad genética y distribución de la diversidad entre los aislados no invasivos	120
4.27. Diversidad genética y distribución de la diversidad entre los aislados inva- sivos	120
4.28. Digestión de los aislados control de <i>mef</i> con las enzimas <i>SpeI</i> y <i>HpaI</i>	133
4.29. Digestión de los aislados problema con las enzimas <i>SpeI</i> y <i>HpaI</i>	133

Índice de tablas

1.1. Factores predisponentes para sufrir enfermedad neumocócica invasiva . . .	11
1.2. Criterios de aceptación de muestras respiratorias (esputo) para cultivo . . .	17
1.3. Identificación de <i>S. pneumoniae</i> en cultivo	18
1.4. Sensibilidad y especificidad de la inmunocromatografía (BINAX Now®) . . .	20
1.5. Evaluación de las técnicas de PCR para diagnóstico de la infección por <i>S. pneumoniae</i>	22
1.6. Clasificación de las proteínas fijadoras de penicilina según su peso molecular	40
1.7. Evolución de los serotipos vacunales (PCV7) que presentaron un descenso significativo tras la comercialización de la vacuna PCV7 en España ([163]).	41
1.8. Ejemplos de transposones conjugativos que portan genes de resistencia a tetraciclinas y a otros antimicrobianos	46
1.9. Elementos genéticos de transferencia relacionados con la resistencia a los macrólidos en <i>S. pneumoniae</i>	54
3.1. Antibióticos y rango de concentraciones empleados en el estudio de sensibilidad mediante microdilución (paneles Wider, Fco. Soria Melguizo, Madrid, España)	63
3.2. Aislados empleados como controles positivos en la detección de diferentes genes y elementos genéticos de resistencia	66
3.3. Esquema seguido para la serotipificación	69
3.4. Genes constitutivos y cebadores de la técnica MLST	70
3.5. Cebadores, temperaturas de hibridación y tamaños de producto diseñados para el estudio de los elementos genéticos asociados a la resistencia a los macrólidos	78
3.6. Características de las enzimas de restricción empleadas para el análisis del elemento MEGA	78
4.1. Determinantes genéticos de resistencia a los macrólidos y fenotipos asociados entre los aislados resistentes a macrólidos de la colección prevacunal (n=244)	86
4.2. Distribución del gen <i>tetM</i> en función de los determinantes genéticos de resistencia a los macrólidos entre los aislados con amplificación positiva para el gen <i>mef</i> de la colección prevacunal (n=45)	87
4.3. Análisis poblacional de los aislados con amplificación positiva para los genes <i>mef</i> de la colección prevacunal (n=45)	90
4.4. Perfiles de resistencia a diferentes antimicrobianos entre los aislados agrupados en complejos clonales de la colección prevacunal	91
4.5. Perfiles de resistencia a diferentes antimicrobianos entre los aislados agrupados en clones independientes de la colección prevacunal	91

4.6. Determinantes genéticos de resistencia a los macrólidos y fenotipos asociados entre los aislados resistentes a macrólidos de la colección de hemocultivos	94
4.7. Distribución del gen <i>tetM</i> en función de los determinantes genéticos de resistencia a los macrólidos entre los aislados de la colección de hemocultivos	95
4.8. Análisis poblacional de los aislados con amplificación positiva para los genes <i>mef</i> de la colección de hemocultivos	98
4.9. Perfiles de resistencia a diferentes antimicrobianos entre los aislados agrupados en clones de la colección de hemocultivos	100
4.10. Perfiles de resistencia a diferentes antimicrobianos entre los aislados agrupados en <i>singleton clones</i> de la colección de hemocultivos	100
4.11. Índices de diversidad y distribución de la diversidad entre los aislados invasivos y no invasivos	121
4.12. Amplificaciones para la descripción de elementos de transposición entre los aislados de la colección prevacunal con genotipo de resistencia a los macrólidos <i>erm(B)+mef(E)</i> . Se muestran resultados positivos únicamente para las reacciones que indican inserciones de elementos en Tn916 con el tamaño de producto de PCR esperado.	125
4.13. Amplificaciones para la descripción de elementos de transposición entre los aislados de la colección prevacunal con genotipo de resistencia a los macrólidos <i>mef(E)</i> . El aislado 6 mostró amplificación positiva para el gen <i>mef(A)</i> . Se muestran resultados positivos únicamente para las reacciones que indican inserciones de elementos en Tn916 con el tamaño de producto de PCR esperado.	127
4.14. Amplificaciones para la descripción de elementos de transposición entre los aislados de la colección de hemocultivos. Se muestran resultados positivos únicamente para las reacciones que indican inserciones de elementos en Tn916 con el tamaño de producto de PCR esperado.	130
4.15. Elementos de transposición entre los aislados pertenecientes al Complejo clonal Spain ^{9V} -3	131
4.16. Elementos de transposición entre los aislados pertenecientes al serotipo 19A	132

Bibliografía

- [1] Austrian R: **Pneumococcus: the first one hundred years.** *Rev Infect Dis* 1981, **3**:183–9.
- [2] Watson DA, Musher DM, Jacobson JW, Verhoef J: **A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery.** *Clin Infect Dis* 1993, **17**:913–24.
- [3] Pasteur L, Chamberland, Roux E: **Sur une maladie nouvelle, provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage.** *C. R. Acad. Sci.* 1881, **92**:159–165.
- [4] Sternberg G: **A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human saliva.** *Bull. Nat. Board Health* 1881, **2**:781–803.
- [5] Jacobson W: **Gram's discovery of his staining technique.** *J Infect* 1983, **7**(2):97–101.
- [6] Fränkel A: **Über die genuine Pneumonie.** *Verb. Kongr. Inn. Med.* 1884, **3**:17–31.
- [7] Weichselbaum A: **Über die Aetiologie der acuten Lungen und Rippenfallentzündungen.** *Med. Jahrb. Ser.* 1883, **1**:485–554.
- [8] Mandell G, Bennett J, Dolin R: *Principles and Practice of Infectious Diseases, Volume I.* Elsevier, 7 edition 2009.
- [9] Neufeld F: **Über die Agglutination den Pneumokokken und über die Theorien der Agglutination.** *Zeitschrift Hygiene Infektkrankheiten* 1902, **34**:454–464.
- [10] Cai P, Moran J, Pavliak V, Deng C, Khoury N, Marcq O, Ruppen ME: **NMR structural analysis of the capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* serotype 6C.** *Carbohydr. Res.* 2012, **351**:98–107.
- [11] Song JH, Baek JY, Ko KS: **Comparison of capsular genes of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6A, 6B, 6C, and 6D isolates.** *J. Clin. Microbiol.* 2011, **49**(5):1758–1764.
- [12] Griffith F: **The significance of pneumococcal types.** *J. Hyg.* 1928, **27**:113–159.
- [13] Austrian R: **Morphologic variation in pneumococcus. I. An analysis of the bases for morphologic variation in pneumococcus and description of a hitherto undefined morphologic variant.** *J Exp Med* 1953, **98**:21–34.
- [14] Prudhomme M, Attaiech L, Sanchez G, Martin B, Claverys JP: **Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*.** *Science* 2006, **313**(5783):89–92.
- [15] Claverys JP, Prudhomme M, Mortier-Barrière I, Martin B: **Adaptation to the environment: *Streptococcus pneumoniae*, a paradigm for recombination-mediated genetic plasticity?** *Mol Microbiol* 2000, **35**(2):251–9.
- [16] Heffron R: *Pneumonia with special reference to Pneumococcus lobar pneumonia.* Harvard University press, 2 edition 1939.
- [17] Austrian R: **Maxwell Finland Lecture. Random gleanings from a life with the pneumococcus.** *J. Infect. Dis.* 1975, **131**(4):474–484.
- [18] Bullowa J: *The management of the pneumonias for physicians and*

- medical students*. Oxford University Press 1937.
- [19] Austrian R: **The quellung reaction, a neglected microbiologic technique**. *Mt Sinai J Med* 1976, **43**(6):699–709.
- [20] Austrian R: **Prevention of pneumococcal infection by immunization with capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*: current status of polyvalent vaccines**. *J Infect Dis* 1977, **136** Suppl:S38–42.
- [21] Moore HF, Chesney A: **A further study of ethylhydrocuprein (optochin) in the treatment of acute lobar pneumonia**. *Archives Internal Medicine* 1918, **21**:659–681.
- [22] Evans GM, Gaisford W: **Treatment of pneumonia with 2-(p-aminobenzenesulphonamido) pyradine**. *Lancet* 1938, **ii**:14–19.
- [23] Abraham EP, Gardner A, Chain E, Heatly CM, Fletcher MA, Jennings MA, Florey HW: *Further observations on penicillin, Volume Lancet* 1941.
- [24] Dawson M, Hobby GL: **The clinical use of penicillin: observations in one hundred cases**. *JAMA* 1944, **124**:611–622.
- [25] Hobby G: *Penicillin: Meeting the challenge*. Yale University Press 1985.
- [26] Reimann H: *Pneumonia*. 2 edition 1954.
- [27] Brugger SD, Hathaway LJ, Mühlemann K: **Detection of *Streptococcus pneumoniae* strain cocolonization in the nasopharynx**. *J Clin Microbiol* 2009, **47**(6):1750–6.
- [28] Simell B, Auranen K, Kayhty H, Goldblatt D, Dagan R, O'Brien KL: **The fundamental link between pneumococcal carriage and disease**. *Expert Rev Vaccines* 2012, **11**(7):841–855.
- [29] Jones P, Leder K, Woolley I, Cameron P, Cheng A, Spelman D: **Postsplenectomy infection - strategies for prevention in general practice**. *Aust Fam Physician* 2010, **39**(6):383–6.
- [30] Musher DM, Ceasar H, Kojic EM, Musher BL, Gathe JC, Romero-Steiner S, White AC: **Administration of protein-conjugate pneumococcal vaccine to patients who have invasive disease after splenectomy despite their having received 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine**. *J Infect Dis* 2005, **191**(7):1063–7.
- [31] Cilloniz C, Ewig S, Menendez R, Ferrer M, Polverino E, Reyes S, Gabarrus A, Marcos MA, Cordoba J, Mensa J, Torres A: **Bacterial coinfection with H1N1 infection in patients admitted with community acquired pneumonia**. *J Infect* 2012.
- [32] Klugman KP, Astley CM, Lipsitch M: **Time from illness onset to death, 1918 influenza and pneumococcal pneumonia**. *Emerg Infect Dis* 2009, **15**(2):346–7.
- [33] Chien YW, Klugman KP, Morens DM: **Bacterial pathogens and death during the 1918 influenza pandemic**. *N Engl J Med* 2009, **361**(26):2582–3.
- [34] Somech I, Dagan R, Givon-Lavi N, Porat N, Raiz S, Leiberman A, Puterman M, Peled N, Greenberg D, Leibovitz E: **Distribution, dynamics and antibiotic resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* serotypes causing acute otitis media in children in southern Israel during the 10 year-period before the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine**. *Vaccine* 2011, **29**(25):4202–9.
- [35] Vergison A: **Microbiology of otitis**

- media: a moving target.** *Vaccine* 2008, **26** Suppl 7:G5–10.
- [36] Benito MB, Gorricho BP: **Acute mastoiditis: increase in the incidence and complications.** *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2007, **71**(7):1007–11.
- [37] Leibovitz E, Broides A, Greenberg D, Newman N: **Current management of pediatric acute otitis media.** *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010, **8**(2):151–61.
- [38] Casado-Flores J, Rodrigo C, Arístegui J, Martín JM, Fenoll A, Méndez C: **Decline in pneumococcal meningitis in Spain after introduction of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine.** *Pediatr Infect Dis J* 2008, **27**(11):1020–2.
- [39] Cabellos C, Verdaguer R, Olmo M, Fernández-Sabé N, Cisnal M, Ariza J, Gudiol F, Viladrich PF: **Community-acquired bacterial meningitis in elderly patients: experience over 30 years.** *Medicine (Baltimore)* 2009, **88**(2):115–9.
- [40] Zakharkina T, Koczulla AR, Mardanova O, Hattesoehl A, Bals R: **Detection of microorganisms in exhaled breath condensate during acute exacerbations of COPD.** *Respirology* 2011, **16**(6):932–8.
- [41] Ko FWS, Ip M, Chan PKS, Ng SSS, Chau SS, Hui DSC: **A one-year prospective study of infectious etiology in patients hospitalized with acute exacerbations of COPD and concomitant pneumonia.** *Respir Med* 2008, **102**(8):1109–16.
- [42] Nseir S, Cavestri B, Di Pompeo C, Diarra M, Brisson H, Lemyze M, Roussel-Delvallez M, Durocher A: **Factors predicting bacterial involvement in severe acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease.** *Respiration* 2008, **76**(3):253–60.
- [43] Cantón R, Gómez G de la Pedrosa E, Fernández Olmos A: *Actualización en bronquiectasias. Microbiología de las bronquiectasias. Aspectos prácticos.* SEPAR, 2 edition 2012.
- [44] Sethi S, Evans N, Grant BJ, Murphy TF: **New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease.** *N. Engl. J. Med.* 2002, **347**(7):465–471.
- [45] Ampofo K, Pavia AT, Stockmann CR, Blaschke AJ, Weng HYC, Korgenski KE, Daly J, Byington CL: **Evolution of the epidemiology of pneumococcal disease among Utah children through the vaccine era.** *Pediatr Infect Dis J* 2011, **30**(12):1100–3.
- [46] Yildirim I, Stevenson A, Hsu KK, Pelton SI: **Evolving Picture of Invasive Pneumococcal Disease in Massachusetts Children: A Comparison of Disease in 2007-2009 with Earlier Periods.** *Pediatr Infect Dis J* 2012.
- [47] Jacobs MR, Good CE, Beall B, Bajaksouzian S, Windau AR, Whitney CG: **Changes in serotypes and antimicrobial susceptibility of invasive *Streptococcus pneumoniae* strains in Cleveland: a quarter century of experience.** *J Clin Microbiol* 2008, **46**(3):982–90.
- [48] Calbo E, Díaz A, Cañadell E, Fàbrega J, Uriz S, Xercavins M, Morera MA, Cuchi E, Rodríguez-Carballeira M, Garau J, Spanish Pneumococcal Infection Study Network: **Invasive pneumococcal disease among children in a health district of Barcelona: early impact of pneumococcal conjugate**

- vaccine.** *Clin Microbiol Infect* 2006, **12**(9):867–72.
- [49] Obando I, Muñoz-Almagro C, Arroyo LA, Tarrago D, Sanchez-Tatay D, Moreno-Perez D, Dhillon SS, Esteva C, Hernandez-Bou S, Garcia-Garcia JJ, Hausdorff WP, Brueggemann AB: **Pediatric parapneumonic empyema, Spain.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**(9):1390–7.
- [50] Fenoll A, Aguilar L, Giménez MJ, Vicioso MD, Robledo O, Granizo JJ, Coronel P: **Variations in serotypes and susceptibility of adult non-invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates between the periods before (May 2000-May 2001) and 10 years after (May 2010-May 2011) introduction of conjugate vaccines for child immunisation in Spain.** *Int J Antimicrob Agents* 2012.
- [51] de Sevilla MF, García-García JJ, Esteva C, Moraga F, Hernández S, Selva L, Coll F, Ciruela P, Planes AM, Codina G, Salleras L, Jordan I, Domínguez A, Muñoz-Almagro C: **Clinical presentation of invasive pneumococcal disease in Spain in the era of heptavalent conjugate vaccine.** *Pediatr Infect Dis J* 2012, **31**(2):124–8.
- [52] Nakagawa C, Kasahara K, Yonekawa S, Ogawa T, Kutsuna S, Maeda K, Konishi M, Kikuchi K, Mikasa K: **Purulent pericarditis due to *Streptococcus pneumoniae* diagnosed by pneumococcal urinary antigen assay and 16S rDNA sequence of the pericardial fluid.** *Intern Med* 2010, **49**(15):1653–6.
- [53] Lim FF, Chang HM, Lue KH, Sheu JN: **Pneumococcal pneumonia complicating purulent pericarditis in a previously healthy girl: a rare yet possible fatal complication in the antibiotic era.** *Pediatr Emerg Care* 2011, **27**(8):751–3.
- [54] Vindas-Cordero JP, Sands M, Sanchez W: **Austrian's triad complicated by suppurative pericarditis and cardiac tamponade: a case report and review of the literature.** *Int J Infect Dis* 2009, **13**:e23–5.
- [55] Vernet G, Saha S, Satzke C, Burgess DH, Alderson M, Maisonneuve JF, Beall BW, Steinhoff MC, Klugman KP: **Laboratory-based diagnosis of pneumococcal pneumonia: state of the art and unmet needs.** *Clin. Microbiol. Infect.* 2011, **17 Suppl 3**:1–13.
- [56] Cercenado E, Cantón R (Eds): *Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior*, SEIMC 2007.
- [57] PR M, JA W: **Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum.** *Clinical procedures* 1975, (50):339–344.
- [58] HS H, JK C, WM L: **Misinformation from sputum cultures without microscopic examination.** *Journal Clinical Microbiology* 1977, (6):518–527.
- [59] HS H, RR R: **Acceptability and cost savings of selective sputum microbiology in a community teaching hospital.** *J Clin Microbiol* 1979, (10):567–573.
- [60] Arbique JC, Poyart C, Trieu-Cuot P, Quesne G, da G Carvalho M, Steigerwalt AG, Morey RE, Jackson D, Davidson RJ, Facklam RR: **Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**(10):4686–4696.
- [61] Feikin DR, Schuchat A, Kolczak M,

- Barrett NL, Harrison LH, Lefkowitz L, McGeer A, Farley MM, Vugia DJ, Lexau C, Stefonek KR, Patterson JE, Jorgensen JH: **Mortality from invasive pneumococcal pneumonia in the era of antibiotic resistance, 1995-1997.** *Am J Public Health* 2000, **90**(2):223–229.
- [62] File TM, Marrie TJ: **Burden of community-acquired pneumonia in North American adults.** *Postgrad Med* 2010, **122**(2):130–141.
- [63] Reimer LG: **Community-acquired bacterial pneumonias.** *Semin Respir Infect* 2000, **15**(2):95–100.
- [64] Cantón R, Lode H, Graninger W, Milkovich G: **Respiratory tract infections: at-risk patients, who are they? Implications for their management with levofloxacin.** *Int. J. Antimicrob. Agents* 2006, **28** Suppl 2:S115–127.
- [65] Charkaluk ML, Kalach N, Mvogo H, Dehecq E, Magentie H, Raymond J, Gendrel D, Kremp O, Decoster A: **Assessment of a rapid urinary antigen detection by an immunochromatographic test for diagnosis of pneumococcal infection in children.** *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2006, **55**(2):89–94.
- [66] Ploton C, Freydiere AM, Benito Y, Bendridi N, Mazzocchi C, Bellon G, Vandenesch F: ***Streptococcus pneumoniae* thoracic empyema in children: rapid diagnosis by using the Binax NOW immunochromatographic membrane test in pleural fluids.** *Pathol. Biol.* 2006, **54**(8-9):498–501.
- [67] Le Monnier A, Carbonnelle E, Zahar JR, Le Bourgeois M, Abachin E, Quesne G, Varon E, Descamps P, De Blic J, Scheinmann P, Berche P, Ferroni A: **Microbiological diagnosis of empyema in children: comparative evaluations by culture, polymerase chain reaction, and pneumococcal antigen detection in pleural fluids.** *Clin. Infect. Dis.* 2006, **42**(8):1135–1140.
- [68] Vuorenoja K, Jalava J, Lindholm L, Tahtinen PA, Laine MK, Thorn K, Ruohola A: **Detection of *Streptococcus pneumoniae* carriage by the Binax NOW test with nasal and nasopharyngeal swabs in young children.** *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012, **31**(5):703–706.
- [69] Palmu AA, Kaijalainen T, Saukkoripi A, Leinonen M, Kilpi TM: **Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and pneumococcal urine antigen test in healthy elderly subjects.** *Scand. J. Infect. Dis.* 2012, **44**(6):433–438.
- [70] Diederer BM, Peeters MF: **Rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia in adults using the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test.** *Int. J. Infect. Dis.* 2007, **11**(3):284–285.
- [71] Madeddu G, Laura Fiori M, Stella Mura M: **Bacterial community-acquired pneumonia in HIV-infected patients.** *Curr Opin Pulm Med* 2010, **16**(3):201–207.
- [72] Falguera M, Lopez A, Nogues A, Porcel JM, Rubio-Caballero M: **Evaluation of the polymerase chain reaction method for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in pleural fluid samples.** *Chest* 2002, **122**(6):2212–2216.
- [73] Andreo F, Ruiz-Manzano J, Prat C, Lores L, Blanco S, Malet A, Gallardo X, Dominguez J: **Utility of pneumococcal urinary antigen detection in diagnosing exacerbations in COPD patients.** *Respir Med* 2010, **104**(3):397–403.

- [74] Baggett HC, Rhodes J, Dejsirilert S, Salika P, Wansom T, Jorakate P, Kaewpan A, Olsen SJ, Maloney SA, Peruski LF: **Pneumococcal antigen testing of blood culture broth to enhance the detection of *Streptococcus pneumoniae* bacteremia.** *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012, **31**(5):753–756.
- [75] Izumikawa K, Akamatsu S, Kageyama A, Okada K, Kazuyama Y, Takayanagi N, Nakamura S, Inoue Y, Higashiyama Y, Fukushima K, Ishida T, Sawai T, Yoshimura K, Nakahama C, Ohmichi M, Kakugawa T, Nishiooka Y, Aoki N, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kohno S: **Evaluation of a rapid immunochromatographic ODK0501 assay for detecting *Streptococcus pneumoniae* antigen in sputum samples from patients with lower respiratory tract infection.** *Clin. Vaccine Immunol.* 2009, **16**(5):672–678.
- [76] Oosterheert JJ, Bonten MJ, Buskens E, Schneider MM, Hoepelman IM: **Algorithm to determine cost savings of targeting antimicrobial therapy based on results of rapid diagnostic testing.** *J. Clin. Microbiol.* 2003, **41**(10):4708–4713.
- [77] Scholz CF, Poulsen K, Kilian M: **Novel Molecular Method for Identification of *Streptococcus pneumoniae* Applicable to Clinical Microbiology and 16S rRNA Sequence-Based Microbiome Studies.** *J. Clin. Microbiol.* 2012, **50**(6):1968–1973.
- [78] Munoz-Almagro C, Gala S, Selva L, Jordan I, Tarrago D, Pallares R: **DNA bacterial load in children and adolescents with pneumococcal pneumonia and empyema.** *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011, **30**(3):327–335.
- [79] da G Carvalho M, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee L, Mayer LW, Steigerwalt A, Whaley M, Facklam RR, Fields B, Carlone G, Ades EW, Dagan R, Sampson JS: **Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA.** *J. Clin. Microbiol.* 2007, **45**(8):2460–2466.
- [80] Tarrago D, Fenoll A, Sanchez-Tatay D, Arroyo LA, Munoz-Almagro C, Esteva C, Hausdorff WP, Casal J, Obando I: **Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR.** *Clin. Microbiol. Infect.* 2008, **14**(9):828–834.
- [81] Lal D, Verma M, Lal R: **Exploring internal features of 16S rRNA gene for identification of clinically relevant species of the genus *Streptococcus*.** *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2011, **10**:28.
- [82] Arosio M, Nozza F, Rizzi M, Ruggeri M, Casella P, Beretta G, Raglio A, Goglio A: **Evaluation of the MicroSeq 500 16S rDNA-based gene sequencing for the diagnosis of culture-negative bacterial meningitis.** *New Microbiol.* 2008, **31**(3):343–349.
- [83] Abdeldaim GM, Stralin K, Korsgaard J, Blomberg J, Welinder-Olsson C, Herrmann B: **Multiplex quantitative PCR for detection of lower respiratory tract infection and meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis*.** *BMC Microbiol.* 2010, **10**:310.
- [84] Seki M, Yamashita Y, Torigoe H, Tsuda H, Sato S, Maeno M: **Loop-mediated isothermal amplification method targeting the *lytA* gene for detection of *Streptococcus pneu-***

- moniae*. *J. Clin. Microbiol.* 2005, **43**(4):1581–1586.
- [85] Suzuki N, Yuyama M, Maeda S, Oga-
wa H, Mashiko K, Kiyoura Y: **Ge-
notypic identification of presum-
ptive *Streptococcus pneumoniae*
by PCR using four genes highly
specific for *S. pneumoniae***. *J. Med.
Microbiol.* 2006, **55**(Pt 6):709–714.
- [86] Josefson P, Stralin K, Ohlin A, En-
nefors T, Dragsten B, Andersson L,
Fredlund H, Molling P, Olcen P: **Eva-
luation of a commercial multiplex
PCR test (SeptiFast) in the etio-
logical diagnosis of community-
onset bloodstream infections**. *Eur.
J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011,
30(9):1127–1134.
- [87] Tissari P, Zumla A, Tarkka E, Me-
ro S, Savolainen L, Vaara M, Aitta-
korpi A, Laakso S, Lindfors M, Pii-
parinen H, Maki M, Carder C, Hug-
gett J, Gant V: **Accurate and ra-
pid identification of bacterial spe-
cies from positive blood cultures
with a DNA-based microarray plat-
form: an observational study**. *Lan-
cet* 2010, **375**(9710):224–230.
- [88] Tomita Y, Okamoto A, Yamada K,
Yagi T, Hasegawa Y, Ohta M: **A
new microarray system to de-
tect *Streptococcus pneumoniae*
serotypes**. *J. Biomed. Biotechnol.*
2011, **2011**:352736.
- [89] Gescher DM, Kovacevic D, Schmiedel
D, Siemoneit S, Mallmann C, Halle
E, Gobel UB, Moter A: **Fluores-
cence in situ hybridisation (FISH)
accelerates identification of Gram-
positive cocci in positive blood
cultures**. *Int. J. Antimicrob. Agents*
2008, **32 Suppl 1**:S51–59.
- [90] Risch M, Radjenovic D, Han JN,
Wydler M, Nydegger U, Risch L:
**Comparison of MALDI TOF with
conventional identification of clini-
cally relevant bacteria**. *Swiss Med
Wkly* 2010, **140**:w13095.
- [91] Ikryannikova LN, Lapin KN, Malakho-
va MV, Filimonova AV, Ilina EN, Du-
bovickaya VA, Sidorenko SV, Govo-
run VM: **Misidentification of alpha-
hemolytic streptococci by routine
tests in clinical practice**. *Infect. Ge-
net. Evol.* 2011, **11**(7):1709–1715.
- [92] Dunne EM, Ong EK, Moser RJ, Si-
ba PM, Phuanukoonnon S, Greenhill
AR, Robins-Browne RM, Mulholland
EK, Satzke C: **Multilocus sequence
typing of *Streptococcus pneumo-
niae* by use of mass spectrometry**.
J. Clin. Microbiol. 2011, **49**(11):3756–
3760.
- [93] Massire C, Gertz RE, Svoboda P,
Levert K, Reed MS, Pohl J, Kreft
R, Li F, White N, Ranken R, Blyn
LB, Ecker DJ, Sampath R, Beall
B: **Concurrent serotyping and ge-
notyping of pneumococci by use
of PCR and electrospray ionization
mass spectrometry**. *J. Clin. Micro-
biol.* 2012, **50**(6):2018–2025.
- [94] Savinova TA, Il'ina EN, Sidorenko SV:
**[A mass-spectrometric analysis of
genetic markers of *S. pneumoniae*
resistance to beta-lactam antibio-
tics]**. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.*
2010, (3):16–25.
- [95] Karmeling J, Caimano M, James
C, García E, et al.: *Streptococcus
pneumoniae. Molecular Biology and
Mechanisms of Disease, Volume 1*.
Mary Ann Liebert, 1 edition 2000.
- [96] Cross AS: **The biologic signifi-
cance of bacterial encapsulation**.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1990,
150:87–95.
- [97] Coffey TJ, Enright MC, Daniels M,
Wilkinson P, Berron S, Fenoll A,
Spratt BG: **Serotype 19A variants**

- of the Spanish serotype 23F multiresistant clone of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Drug Resist.* 1998, **4**:51–55.
- [98] Coffey TJ, Daniels M, Enright MC, Spratt BG: **Serotype 14 variants of the Spanish penicillin-resistant serotype 9V clone of *Streptococcus pneumoniae* arose by large recombinational replacements of the *cpsA-pbp1a* region.** *Microbiology (Reading, Engl.)* 1999, **145** (Pt 8):2023–2031.
- [99] Morona JK, Morona R, Paton JC: **Characterization of the locus encoding the *Streptococcus pneumoniae* type 19F capsular polysaccharide biosynthetic pathway.** *Mol. Microbiol.* 1997, **23**(4):751–763.
- [100] Behr T, Fischer W, Peter-Katalini J, Egge H: **The structure of pneumococcal lipoteichoic acid. Improved preparation, chemical and mass spectrometric studies.** *Eur. J. Biochem.* 1992, **207**(3):1063–1075.
- [101] Fischer W, Behr T, Hartmann R, Peter-Katalini J, Egge H: **Teichoic acid and lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae* possess identical chain structures. A reinvestigation of teichoic acid (C polysaccharide).** *Eur. J. Biochem.* 1993, **215**(3):851–857.
- [102] Zhang JR, Idanpaan-Heikkila I, Fischer W, Tuomanen EI: **Pneumococcal *licD2* gene is involved in phosphorylcholine metabolism.** *Mol. Microbiol.* 1999, **31**(5):1477–1488.
- [103] Gehre F, Leib SL, Grandgirard D, Kummer J, Buhlmann A, Simon F, Gaumann R, Kharat AS, Tauber MG, Tomasz A: **Essential role of choline for pneumococcal virulence in an experimental model of meningitis.** *J. Intern. Med.* 2008, **264**(2):143–154.
- [104] García J, Weiser J, Paton JC, et al.: *Streptococcus pneumoniae. Molecular Biology & Mechanisms of Disease, Volume 1.* 1 edition 2000.
- [105] Romero P, Lopez R, Garcia E: **Characterization of LytA-like N-acetylmuramoyl-L-alanine amidases from two new *Streptococcus mitis* bacteriophages provides insights into the properties of the major pneumococcal autolysin.** *J. Bacteriol.* 2004, **186**(24):8229–8239.
- [106] Wood WB: **Studies on the mechanism of recovery in pneumococcal pneumonia : I. The action of type specific antibody upon the pulmonary lesion of experimental pneumonia.** *J. Exp. Med.* 1941, **73**(2):201–222.
- [107] Hirst RA, Gosai B, Rutman A, Guerin CJ, Nicotera P, Andrew PW, O'Callaghan C: ***Streptococcus pneumoniae* deficient in pneumolysin or autolysin has reduced virulence in meningitis.** *J. Infect. Dis.* 2008, **197**(5):744–751.
- [108] Lux T, Nuhn M, Hakenbeck R, Reichmann P: **Diversity of bacteriocins and activity spectrum in *Streptococcus pneumoniae*.** *J. Bacteriol.* 2007, **189**(21):7741–7751.
- [109] Sjostrom K, Blomberg C, Fernebro J, Dagerhamn J, Morfeldt E, Barocchi MA, Browall S, Moschioni M, Andersson M, Henriques F, Albiger B, Rappuoli R, Normark S, Henriques-Normark B: **Clonal success of piliated penicillin nonsusceptible pneumococci.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007, **104**(31):12907–12912.
- [110] Regev-Yochay G, Lipsitch M, Basset A, Rubinstein E, Dagan R, Raz M, Malley R: **The pneumococcal pilus**

- predicts the absence of *Staphylococcus aureus* co-colonization in pneumococcal carriers. *Clin. Infect. Dis.* 2009, **48**(6):760–763.
- [111] Basset A, Trzcinski K, Hermos C, O'Brien KL, Reid R, Santosham M, McAdam AJ, Lipsitch M, Malley R: **Association of the pneumococcal pilus with certain capsular serotypes but not with increased virulence.** *J. Clin. Microbiol.* 2007, **45**(6):1684–1689.
- [112] O'Toole RD, Stahl WL: **Experimental pneumococcal meningitis. Effects of neuraminidase and other pneumococcal constituents on cerebrospinal fluid in the intact dog.** *J. Neurol. Sci.* 1975, **26**(2):167–178.
- [113] Coles CL, Sherchand JB, Khatri SK, Katz J, Leclercq SC, Mullany LC, Tielsch JM: **Zinc modifies the association between nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* carriage and risk of acute lower respiratory infection among young children in rural Nepal.** *J Nutr* 2008, **138**(12):2462–7.
- [114] Regev-Yochay G, Trzcinski K, Thompson CM, Lipsitch M, Malley R: **SpxB is a suicide gene of *Streptococcus pneumoniae* and confers a selective advantage in an in vivo competitive colonization model.** *J Bacteriol* 2007, **189**(18):6532–9.
- [115] Garcia-Castillo M, Morosini MI, Valverde A, Almaraz F, Baquero F, Cantón R, del Campo R: **Differences in biofilm development and antibiotic susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* isolates from cystic fibrosis samples and blood cultures.** *J. Antimicrob. Chemother.* 2007, **59**(2):301–304.
- [116] Reis JN, Palma T, Ribeiro GS, Pinheiro RM, Ribeiro CT, Cordeiro SM, da Silva Filho HP, Moschioni M, Thompson TA, Spratt B, Riley LW, Barocchi MA, Reis MG, Ko AI: **Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in an urban slum community.** *J. Infect.* 2008, **57**(3):204–213.
- [117] del Campo R, Morosini MI, de la Pedrosa EGG, Fenoll A, Muñoz-Almagro C, Máiz L, Baquero F, Cantón R, Spanish Pneumococcal Infection Study Network: **Population structure, antimicrobial resistance, and mutation frequencies of *Streptococcus pneumoniae* isolates from cystic fibrosis patients.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**(5):2207–14.
- [118] Moscoso M, García E, López R: **Pneumococcal biofilms.** *Int Microbiol* 2009, **12**(2):77–85.
- [119] Hall-Stoodley L, Nistico L, Sambanthamoorthy K, Dice B, Nguyen D, Mershon WJ, Johnson C, Hu FZ, Stoodley P, Ehrlich GD, Post JC: **Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates.** *BMC Microbiol* 2008, **8**:173.
- [120] Allegrucci M, Sauer K: **Characterization of colony morphology variants isolated from *Streptococcus pneumoniae* biofilms.** *J Bacteriol* 2007, **189**(5):2030–8.
- [121] Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG: **How clonal are bacteria?** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993, **90**(10):4384–4388.
- [122] Klugman KP, Coffey TJ, Smith A, Wasas A, Meyers M, Spratt BG: **Cluster of an erythromycin-resistant variant of the Spanish multiply resistant 23F clone of *Streptococcus pneumoniae* in South Africa.** *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1994, **13**(2):171–174.

- [123] Smith AM, Klugman KP, Coffey TJ, Spratt BG: **Genetic diversity of penicillin-binding protein 2B and 2X genes from *Streptococcus pneumoniae* in South Africa.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993, **37**(9):1938–1944.
- [124] Ding JJ, Su X, Guo FM, Shi Y, Shao HF, Meng XZ: **Comparison of three different PCR-based methods to predict the penicillin nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates from China.** *Lett. Appl. Microbiol.* 2009, **48**:105–111.
- [125] Harris KA, Turner P, Green EA, Hartley JC: **Duplex real-time PCR assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in clinical samples and determination of penicillin susceptibility.** *J. Clin. Microbiol.* 2008, **46**(8):2751–2758.
- [126] Seward RJ, Ehrenstein B, Grundmann HJ, Towner KJ: **Direct comparison of two commercially available computer programs for analysing DNA fingerprinting gels.** *J. Med. Microbiol.* 1997, **46**(4):314–320.
- [127] Welsh J, McClelland M: **Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers.** *Nucleic Acids Res.* 1990, **18**(24):7213–7218.
- [128] Stull TL, LiPuma JJ, Edlind TD: **A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA.** *J. Infect. Dis.* 1988, **157**(2):280–286.
- [129] Bingen EH, Denamur E, Elion J: **Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks.** *Clin. Microbiol. Rev.* 1994, **7**(3):311–327.
- [130] Gardiner K: **Pulsed field gel electrophoresis.** *Anal. Chem.* 1991, **63**(7):658–665.
- [131] Soares S, Kristinsson KG, Musser JM, Tomasz A: **Evidence for the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980s.** *J. Infect. Dis.* 1993, **168**:158–163.
- [132] Silva-Costa C, Ramirez M, Melo-Cristino J: **Identification of macrolide-resistant clones of *Streptococcus pyogenes* in Portugal.** *Clin. Microbiol. Infect.* 2006, **12**(6):513–518.
- [133] Silva-Costa C, Pinto FR, Ramirez M, Melo-Cristino J: **Decrease in macrolide resistance and clonal instability among *Streptococcus pyogenes* in Portugal.** *Clin. Microbiol. Infect.* 2008, **14**(12):1152–1159.
- [134] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B: **Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.** *J. Clin. Microbiol.* 1995, **33**(9):2233–2239.
- [135] van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fussing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens M: **Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology.** *Clin. Microbiol. Infect.* 2007, **13** Suppl 3:1–46.
- [136] Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR: **Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes.** *Nucleic Acids Res.* 1991, **19**(24):6823–6831.
- [137] Coffey TJ, Enright MC, Daniels M, Morona JK, Morona R, Hryniewicz W, Paton JC, Spratt BG: **Recombinational exchanges at the capsular**

- polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 1998, **27**:73–83.
- [138] Harrington SM, Stock F, Kominski AL, Campbell JD, Hormazabal JC, Livio S, Rao L, Kotloff KL, Sow SO, Murray PR: **Genotypic analysis of invasive *Streptococcus pneumoniae* from Mali, Africa, by semiautomated repetitive-element PCR and pulsed-field gel electrophoresis.** *J. Clin. Microbiol.* 2007, **45**(3):707–714.
- [139] Gonzalez BE, Hulten KG, Kaplan SL, Mason EO: **Clonality of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 isolates from pediatric patients in the United States.** *J. Clin. Microbiol.* 2004, **42**(6):2810–2812.
- [140] Ahmed K, Martinez G, Wilson S, Yoshida R, Dhar R, Mokaddas E, Kohno S, Rotimi VO, Nagatake T: **The prevalence and clonal diversity of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Kuwait.** *Epidemiol. Infect.* 2000, **125**(3):573–581.
- [141] Enright MC, Spratt BG: **A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease.** *Microbiology (Reading, Engl.)* 1998, **144** (Pt 11):3049–3060.
- [142] McGee L, McDougal L, Zhou J, Spratt BG, Tenover FC, George R, Hakenbeck R, Hryniewicz W, Lefevre JC, Tomasz A, Klugman KP: **Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network.** *J. Clin. Microbiol.* 2001, **39**(7):2565–2571.
- [143] Tomasz A, Mosser JL: **On the nature of the pneumococcal activator substance.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1966, **55**:58–66.
- [144] Havarstein LS, Coomaraswamy G, Morrison DA: **An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995, **92**(24):11140–11144.
- [145] Pozzi G, Masala L, Iannelli F, Manganello R, Havarstein LS, Piccoli L, Simon D, Morrison DA: **Competence for genetic transformation in encapsulated strains of *Streptococcus pneumoniae*: two allelic variants of the peptide pheromone.** *J. Bacteriol.* 1996, **178**(20):6087–6090.
- [146] Humbert O, Prudhomme M, Hakenbeck R, Dowson CG, Claverys JP: **Homeologous recombination and mismatch repair during transformation in *Streptococcus pneumoniae*: saturation of the Hex mismatch repair system.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995, **92**(20):9052–9056.
- [147] Fenoll A, Munoz R, Garcia E, de la Campa AG: **Molecular basis of the optochin-sensitive phenotype of pneumococcus: characterization of the genes encoding the F0 complex of the *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis* H(+)-ATPases.** *Mol. Microbiol.* 1994, **12**(4):587–598.
- [148] Hakenbeck R, Bruckner R, Denapante D, Maurer P: **Molecular mechanisms of β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*.** *Future Microbiol* 2012, **7**(3):395–410.
- [149] Dillard JP, Yother J: **Genetic and molecular characterization of capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type**

3. *Mol. Microbiol.* 1994, **12**(6):959–972.
- [150] Muñoz R, García E, De la Campa AG: **Quinine specifically inhibits the proteolipid subunit of the F0F1 H⁺-ATPase of *Streptococcus pneumoniae*.** *J Bacteriol* 1996, **178**(8):2455–8.
- [151] Cortes PR, Orió AG, Regueira M, Pinas GE, Echenique J: **Characterization of in vitro-generated and clinical optochin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated from Argentina.** *J. Clin. Microbiol.* 2008, **46**(6):1930–1934.
- [152] Nunes S, Sa-Leao R, de Lencastre H: **Optochin resistance among *Streptococcus pneumoniae* strains colonizing healthy children in Portugal.** *J. Clin. Microbiol.* 2008, **46**:321–324.
- [153] ERIKSEN KR: **Studies on induced resistance to penicillin in a pneumococcus type I.** *Acta Pathol Microbiol Scand* 1945, **22**(4):398–405.
- [154] Klugman KP: **Pneumococcal resistance to antibiotics.** *Clin. Microbiol. Rev.* 1990, **3**(2):171–196.
- [155] Jacobs MR, Koornhof HJ, Robins-Browne RM, Stevenson CM, Vermaak ZA, Freiman I, Miller GB, Witcomb MA, Isaacson M, Ward JI, Austrian R: **Emergence of multiply resistant pneumococci.** *N. Engl. J. Med.* 1978, **299**(14):735–740.
- [156] Baquero F, Loza E: *Pneumococcus with particular reference to penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae, Volume I.* 1 edition 1995.
- [157] Butler JC, Breiman RF, Lipman HB, Hofmann J, Facklam RR: **Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in the United States, 1978-1994: implications for development of a conjugate vaccine.** *J. Infect. Dis.* 1995, **171**(4):885–889.
- [158] de la Pedrosa EGG, Morosini MI, van der Linden M, Ruiz-Garbajosa P, Galán JC, Baquero F, Reinert RR, Cantón R: **Polyclonal population structure of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Spain carrying *mef* and *mef* plus *erm*(B).** *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52**(6):1964–9.
- [159] Hakenbeck R, et al.: *Streptococcus pneumoniae. Molecular Biology and Mechanisms of Disease, Volume 1.* Elsevier, 1 edition 2000.
- [160] Lambertsen L, Brendstrup M, Friis H, Christensen JJ: **Molecular characterization of invasive penicillin non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* from Denmark, 2001 to 2005.** *Scand J Infect Dis* 2010, **42**(5):333–40.
- [161] **European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)**<http://www.rivm.nl/earss/>.
- [162] Fenoll A, Granizo JJ, Aguilar L, Gimenez MJ, Aragonese-Fenoll L, Hanquet G, Casal J, Tarrago D: **Temporal trends of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antimicrobial resistance patterns in Spain from 1979 to 2007.** *J. Clin. Microbiol.* 2009, **47**(4):1012–1020.
- [163] Liñares J, Ardanuy C, Pallares R, Fenoll A: **Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period.** *Clin Microbiol Infect* 2010, **16**(5):402–10.
- [164] Gertz RE, Li Z, Pimenta FC, Jackson D, Juni BA, Lynfield R, Jorgensen JH, da G Carvalho M, Beall BW, Rothrock G, Daily P, Brooks S, Nadle J, Apostol M, Petit S, Fraser MZ, Barrett

- N, Malpiedi P, Baughman W, Arnold KE, Holmes KD, Vaeth EA, Lexau C, Leshner L, Triden L, Anderson B, Zansky S, Smith G, Long C, Schmidt M, Stefonek K, Barnes B, McMinin T, Van Beneden C, Skoff TH, Wright C: **Increased penicillin nonsusceptibility of nonvaccine-serotype invasive pneumococci other than serotypes 19A and 6A in post-7-valent conjugate vaccine era.** *J. Infect. Dis.* 2010, **201**(5):770–775.
- [165] Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, Dowell SF, File TM, Musher DM, Niederman MS, Torres A, Whitney CG: **Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults.** *Clin. Infect. Dis.* 2007, **44** Suppl 2:27–72.
- [166] Sevillano D, Alou L, Prieto J: *Antimicrobianos en medicina, Volume 1* 2006.
- [167] Varaldo PE, Montanari MP, Giovannetti E: **Genetic elements responsible for erythromycin resistance in streptococci.** *Antimicrob Agents Chemother* 2009, **53**(2):343–53.
- [168] Cattoir V, Merabet L, Legrand P, Soussy CJ, Leclercq R: **Emergence of a *Streptococcus pneumoniae* isolate resistant to streptogramins by mutation in ribosomal protein L22 during pristinamycin therapy of pneumococcal pneumonia.** *J. Antimicrob. Chemother.* 2007, **59**(5):1010–1012.
- [169] Wolter N, Smith AM, Low DE, Klugman KP: **High-level telithromycin resistance in a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, **51**(3):1092–1095.
- [170] Daly MM, Doktor S, Flamm R, Shortridge D: **Characterization and prevalence of *mef(A)*, *mef(E)*, and the associated *msr(D)* gene in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates.** *J. Clin. Microbiol.* 2004, **42**(8):3570–3574.
- [171] Lonks JR, Garau J, Gomez L, Xercavins M, Ochoa de Echaguen A, Gareen IF, Reiss PT, Medeiros AA: **Failure of macrolide antibiotic treatment in patients with bacteremia due to erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae*.** *Clin. Infect. Dis.* 2002, **35**(5):556–564.
- [172] Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Sepala H: **Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants.** *Antimicrob Agents Chemother* 1999, **43**(12):2823–30.
- [173] Roberts MC: **Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes.** *FEMS Microbiol Lett* 2008, **282**(2):147–59.
- [174] Klaassen CHW, Mouton JW: **Molecular detection of the macrolide efflux gene: to discriminate or not to discriminate between *mef(A)* and *mef(E)*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**(4):1271–8.
- [175] Cochetti I, Vecchi M, Mingoia M, Tili E, Catania MR, Manzin A, Varaldo PE, Montanari MP: **Molecular characterization of pneumococci with efflux-mediated erythromycin resistance and identification of a novel *mef* gene subclass, *mef(I)*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**(12):4999–5006.
- [176] Sangvik M, Littauer P, Simonsen GS, Sundsfjord A, Dahl KH: ***mef(A)*, *mef(E)* and a new *mef* allele in**

- macrolide-resistant *Streptococcus spp.* isolates from Norway. *J Antimicrob Chemother* 2005, **56**(5):841–6.
- [177] Amezaga MR, McKenzie H: **Molecular epidemiology of macrolide resistance in beta-haemolytic streptococci of Lancefield groups A, B, C and G and evidence for a new *mef* element in group G streptococci that carries allelic variants of *mef* and *msr(D)*.** *J Antimicrob Chemother* 2006, **57**(3):443–9.
- [178] Cai Y, Kong F, Gilbert GL: **Three new macrolide efflux (*mef*) gene variants in *Streptococcus agalactiae*.** *J Clin Microbiol* 2007, **45**(8):2754–5.
- [179] Chancey ST, Zhou X, Zähler D, Stephens DS: **Induction of efflux-mediated macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2011, **55**(7):3413–22.
- [180] Gay K, Stephens DS: **Structure and dissemination of a chromosomal insertion element encoding macrolide efflux in *Streptococcus pneumoniae*.** *J Infect Dis* 2001, **184**:56–65.
- [181] Ambrose KD, Nisbet R, Stephens DS: **Macrolide efflux in *Streptococcus pneumoniae* is mediated by a dual efflux pump (*mel* and *mef*) and is erythromycin inducible.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, **49**(10):4203–4209.
- [182] Achard A, Guérin-Faubleé V, Pichereau V, Villers C, Leclercq R: **Emergence of macrolide resistance gene *mph(B)* in *Streptococcus uberis* and cooperative effects with *rdmC*-like gene.** *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52**(8):2767–70.
- [183] Wierzbowski AK, Nichol K, Laing N, Hisanaga T, Nikulin A, Karlowsky JA, Hoban DJ, Zhanel GG: **Macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* isolated over 6 years of Canadian Respiratory Organism Susceptibility Study (CROSS) (1998–2004).** *J. Antimicrob. Chemother.* 2007, **60**(4):733–740.
- [184] Widdowson CA, Klugman KP: **The molecular mechanisms of tetracycline resistance in the pneumococcus.** *Microb Drug Resist* 1998, **4**:79–84.
- [185] Widdowson CA, Klugman KP, Hanslo D: **Identification of the tetracycline resistance gene, *tet(O)*, in *Streptococcus pneumoniae*.** *Antimicrob Agents Chemother* 1996, **40**(12):2891–3.
- [186] Izdebski R, Sadowy E, Fiett J, Grzesiowski P, Gniadkowski M, Hryniewicz W: **Clonal diversity and resistance mechanisms in tetracycline-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates in Poland.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**(4):1155–63.
- [187] Marimón JM, Pérez-Trallero E, Er-cibengoa M, Gonzalez A, Fenoll A, Spanish Pneumococcal Infection Study Network (G03/103): **Molecular epidemiology and variants of the multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* Spain14-5 international clone among Spanish clinical isolates.** *J Antimicrob Chemother* 2006, **57**(4):654–60.
- [188] Tanaseanu C, Milutinovic S, Calistru PI, Strausz J, Zolubas M, Chernyak V, Dartois N, Castaing N, Gandjini H, Cooper CA, 313 Study Group: **Efficacy and safety of tigecycline versus levofloxacin for community-acquired pneumonia.** *BMC Pulm Med* 2009, **9**:44.
- [189] Sadowy E, Kuch A, Gniadkowski

- ki M, Hryniewicz W: **Expansion and evolution of the *Streptococcus pneumoniae* Spain9V-ST156 clonal complex in Poland.** *Antimicrob Agents Chemother* 2010, **54**(5):1720–7.
- [190] Tomich PK, An FY, Clewell DB: **Properties of erythromycin-inducible transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*.** *J Bacteriol* 1980, **141**(3):1366–74.
- [191] McDougal LK, Tenover FC, Lee LN, Rasheed JK, Patterson JE, Jorgensen JH, LeBlanc DJ: **Detection of Tn917-like sequences within a Tn916-like conjugative transposon (Tn3872) in erythromycin-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae*.** *Antimicrob Agents Chemother* 1998, **42**(9):2312–8.
- [192] Okitsu N, Kaieda S, Yano H, Nakano R, Hosaka Y, Okamoto R, Kobayashi T, Inoue M: **Characterization of *ermB* gene transposition by Tn1545 and Tn917 in macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**:168–73.
- [193] Cochetti I, Tili E, Vecchi M, Manzin A, Mingoia M, Varaldo PE, Montanari MP: **New Tn916-related elements causing *erm(B)*-mediated erythromycin resistance in tetracycline-susceptible pneumococci.** *J Antimicrob Chemother* 2007, **60**:127–31.
- [194] Palmieri C, Mingoia M, Massidda O, Giovanetti E, Varaldo PE: ***Streptococcus pneumoniae* transposon Tn1545/Tn6003 changes to Tn6002 due to spontaneous excision in circular form of the *erm(B)*- and *aphA3*-containing MAS element.** *Antimicrob. Agents Chemother*. 2012.
- [195] Courvalin P, Carlier C: **Transposable multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*.** *Mol Gen Genet* 1986, **205**(2):291–7.
- [196] Courvalin P, Carlier C: **Tn1545 : a conjugative shuttle transposon.** *Mol Gen Genet* 1987, **206**(2):259–64.
- [197] Cochetti I, Tili E, Mingoia M, Varaldo PE, Montanari MP: ***erm(B)*-carrying elements in tetracycline-resistant pneumococci and correspondence between Tn1545 and Tn6003 .** *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52**(4):1285–90.
- [198] Del Grosso M, Camilli R, Ianneli F, Pozzi G, Pantosti A: **The *mef(E)*-carrying genetic element (MEGA) of *Streptococcus pneumoniae*: insertion sites and association with other genetic elements.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**(10):3361–6.
- [199] Del Grosso M, Northwood JGE, Farrell DJ, Pantosti A: **The macrolide resistance genes *erm(B)* and *mef(E)* are carried by Tn2010 in dual-gene *Streptococcus pneumoniae* isolates belonging to clonal complex CC271.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**(11):4184–6.
- [200] Calatayud L, Ardanuy C, Cercenado E, Fenoll A, Bouza E, Pallares R, Martín R, Liñares J: **Serotypes, Clones, and Mechanisms of Resistance of Erythromycin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates Collected in Spain.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**(9):3240–6.
- [201] Giovanetti E, Brenciani A, Bacciaglia A, Montanari MP, Varaldo PE: **Expressed and unexpressed *tet(M)* genes and the *erm(B)*-carrying Tn1116 transposon in *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae*.** *Antimicrob Agents*

- Chemother* 2007, **51**(12):4535; author reply 4535–6.
- [202] Del Grosso M, Iannelli F, Messina C, Santagati M, Petrosillo N, Stefani S, Pozzi G, Pantosti A: **Macrolide efflux genes *mef*(A) and *mef*(E) are carried by different genetic elements in *Streptococcus pneumoniae***. *J Clin Microbiol* 2002, **40**(3):774–8.
- [203] Stadler C, Teuber M: **The macrolide efflux genetic assembly of *Streptococcus pneumoniae* is present in erythromycin-resistant *Streptococcus salivarius***. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, **46**(11):3690–1.
- [204] Del Grosso M, Scotto d'Abusco A, Iannelli F, Pozzi G, Pantosti A: **Tn2009, a Tn916-like element containing *mef*(E) in *Streptococcus pneumoniae***. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2004, **48**(6):2037–2042.
- [205] Mingoia M, Vecchi M, Cochetti I, Tili E, Vitali LA, Manzin A, Varaldo PE, Montanari MP: **Composite structure of *Streptococcus pneumoniae* containing the erythromycin efflux resistance gene *mefI* and the chloramphenicol resistance gene *catQ***. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**(11):3983–7.
- [206] Morosini MI, Canton R, Loza E, Negri MC, Galan JC, Almaraz F, Baquero F: **In vitro activity of telithromycin against Spanish *Streptococcus pneumoniae* isolates with characterized macrolide resistance mechanisms**. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2001, **45**(9):2427–2431.
- [207] for Clinical Laboratory Standards NC: *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. NCCLS document M2-A5*. 5 edition 1993.
- [208] Institute C: **Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Document ISO 20776-1**. Wayne, PA. 2007.
- [209] Spratt BG, Hanage WP, Li B, Aanensen DM, Feil EJ: **Displaying the relatedness among isolates of bacterial species – the eBURST approach**. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004, **241**(2):129–134.
- [210] Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG: **eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data**. *J. Bacteriol.* 2004, **186**(5):1518–1530.
- [211] Francisco AP, Vaz C, Monteiro PT, Melo-Cristino J, Ramirez M, Carriço JA: **PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods**. *BMC Bioinformatics* 2012, **13**:87.
- [212] Doherty N, Trzcinski K, Pickerill P, Zawadzki P, Dowson CG: **Genetic diversity of the *tet*(M) gene in tetracycline-resistant clonal lineages of *Streptococcus pneumoniae***. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2000, **44**(11):2979–2984.
- [213] Ellstrand N, Roose M: **Patterns of genotypic diversity in clonal plant species**. *Am. J. Bot.* 1987, **74**:123–31.
- [214] Simpson E: **Measurement of diversity**. *Nature* 1949, **163**:688.
- [215] Selander RK, Levin BR: **Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations**. *Science* 1980, **210**(4469):545–547.
- [216] Shannon C: **A mathematical theory**

- of communication. *Bell. Syst. Tech. J.* 1948, **27**:379–423.
- [217] for disease control C: **Geographic variation in penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*—selected sites, United States, 1997.** *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 1999, **48**(30):656–661.
- [218] Dixon J: **Pneumococcus resistant to erythromycin and lincomycin.** *Lancet* 1967, **i**:573.
- [219] Linares J, Pallares R, Alonso T, Perez JL, Ayats J, Gudiol F, Viladrich PF, Martin R: **Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Bellvitge Hospital, Barcelona, Spain (1979-1990).** *Clin. Infect. Dis.* 1992, **15**:99–105.
- [220] MacFarlane JT, Prewitt J, Gard P, Guion A: **Comparison of amoxicillin and clarithromycin as initial treatment of community-acquired lower respiratory tract infections.** *Br J Gen Pract* 1996, **46**(407):357–360.
- [221] Felmingham D, White AR, Jacobs MR, Appelbaum PC, Poupard J, Miller LA, Gruneberg RN: **The Alexander Project: the benefits from a decade of surveillance.** *J. Antimicrob. Chemother.* 2005, **56 Suppl 2**:ii3–ii21.
- [222] 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.
- [223] Lynch JP, Zhanel GG: ***Streptococcus pneumoniae*: does antimicrobial resistance matter?** *Semin Respir Crit Care Med* 2009, **30**(2):210–238.
- [224] Klugman KP: **Clinical impact of antibiotic resistance in respiratory tract infections.** *Int. J. Antimicrob. Agents* 2007, **29 Suppl 1**:6–10.
- [225] Bowers JR, Driebe EM, Nibecker JL, Wojack BR, Sarovich DS, Wong AH, Brzoska PM, Hubert N, Knadler A, Watson LM, Wagner DM, Furtado MR, Saubolle M, Engelthaler DM, Keim PS: **Dominance of multidrug resistant CC271 clones in macrolide-resistant *streptococcus pneumoniae* in Arizona.** *BMC Microbiol.* 2012, **12**:12.
- [226] 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):956–964.
- [227] Perez Trallero E, Garcia Arenzana JM, Urbietta Egana M: **Erythromycin resistance in streptococci.** *Lancet* 1989, **2**(8660):444–445.
- [228] Ardanuy C, Rolo D, Fenoll A, Tarrago D, Calatayud L, Linares J: **Emergence of a multidrug-resistant clone (ST320) among invasive serotype 19A pneumococci in Spain.** *J. Antimicrob. Chemother.* 2009, **64**(3):507–510.
- [229] Fenoll A, Aguilar L, Vicioso MD, Gimenez MJ, Robledo O, Graniizo JJ: **Increase in serotype 19A prevalence and amoxicillin non-susceptibility among paediatric *Streptococcus pneumoniae* isolates from middle ear fluid in a passive laboratory-based surveillance in Spain, 1997-2009.** *BMC Infect. Dis.* 2011, **11**:239.
- [230] Adam HJ, Hoban DJ, Gin AS, Zhanel GG: **Association between fluoroquinolone usage and a dramatic rise in ciprofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Canada,**

- 1997-2006.** *Int. J. Antimicrob. Agents* 2009, **34**:82–85.
- [231] de la Campa AG, Ardanuy C, Balsalobre L, Perez-Trallero E, Marimon JM, Fenoll A, Linares J: **Changes in fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* after 7-valent conjugate vaccination, Spain.** *Emerging Infect. Dis.* 2009, **15**(6):905–911.
- [232] Fuller JD, Low DE: **A review of *Streptococcus pneumoniae* infection treatment failures associated with fluoroquinolone resistance.** *Clin. Infect. Dis.* 2005, **41**:118–121.
- [233] Rodriguez-Avial I, Ramos B, Rios E, Cercenado E, Ordobas M, Sanz JC, Marin M, Sanz F, Chaves F, Gomez E, Loza E, Antonia Mesequer M, Gonzalez-Romo F, Betriu C, Sanchez-Concheiro M, Cacho J, Orden B, Mendaza P, Sanchez I, Wilhelm I, Pilar Romero M, Delgado A, Ferna R, Salso S, Garcia-Penuela E, Martin D, Monclus D, Jose Uria M, Gonzalez Prieto A, Alambra A, Sanchez-Garcia A, Saez E, Ruiz Velasco L, Molina L, Garcia-Arata I, Martinez-Arroyo M, Aznar E, Enriquez A, Caton A, Jimenez I, Navas L, Gutie A, Arce A, Orellana MA, del Carmen de las Cuevas M, Valverde J, Gomez-Herruz P, Fernandez Roblas R, Carolina Isea Pena M, Hernandez-Milan B, Gomez Garcés JL, Garcia-Picaz L, Campello C, Sanchez de la Blanca P, Gutierrez A, Arce A: **Clonal spread of levofloxacin-resistant *streptococcus pneumoniae* invasive isolates in Madrid, Spain, 2007 to 2009.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011, **55**(5):2469–2471.
- [234] Rozen DE, McGee L, Levin BR, Klugman KP: **Fitness costs of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, **51**(2):412–416.
- [235] Garcia-Rey C, Martin-Herrero JE, Baquero F: **Antibiotic consumption and generation of resistance in *Streptococcus pneumoniae*: the paradoxical impact of quinolones in a complex selective landscape.** *Clin. Microbiol. Infect.* 2006, **12** Suppl 3:55–66.
- [236] Butler LO, Nicholas G: **Mapping of the pneumococcus chromosome. Linkage between the genes conferring resistances to erythromycin and tetracycline and its implication to the replication of the chromosome.** *J. Gen. Microbiol.* 1973, **79**:31–44.
- [237] Buu-Hoi A, Horodniceanu T: **Conjugative transfer of multiple antibiotic resistance markers in *Streptococcus pneumoniae*.** *J. Bacteriol.* 1980, **143**:313–320.
- [238] Vijayakumar MN, Priebe SD, Guild WR: **Structure of a conjugative element in *Streptococcus pneumoniae*.** *J. Bacteriol.* 1986, **166**(3):978–984.
- [239] Leclercq R, Courvalin P: **Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002, **46**(9):2727–2734.
- [240] Littauer P, Sangvik M, Caugant DA, Hiby EA, Simonsen GS, Sundsfjord A: **Molecular epidemiology of macrolide-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae* collected from blood and respiratory specimens in Norway.** *J. Clin. Microbiol.* 2005, **43**(5):2125–2132.
- [241] Reinert RR, Lutticken R, Reinert S, Al-Lahham A, Lemmen S: **Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae*.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, **51**(2):412–416.

- cus pneumoniae* isolates of outpatients in Germany, 1999-2000.** *Chemotherapy* 2004, **50**(4):184–189.
- [242] Bley C, van der Linden M, Reinert RR: ***mef(A)* is the predominant macrolide resistance determinant in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* in Germany.** *Int. J. Antimicrob. Agents* 2011, **37**(5):425–431.
- [243] Reinert RR, Reinert S, van der Linden M, Cil MY, Al-Lahham A, Appelbaum P: **Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in eight European countries from 2001 to 2003.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, **49**(7):2903–2913.
- [244] Farrell DJ, Jenkins SG, Brown SD, Patel M, Lavin BS, Klugman KP: **Emergence and spread of *Streptococcus pneumoniae* with *erm(B)* and *mef(A)* resistance.** *Emerging Infect. Dis.* 2005, **11**(6):851–858.
- [245] Isozumi R, Ito Y, Ishida T, Osawa M, Hirai T, Ito I, Maniwa K, Hayashi M, Kagioka H, Hirabayashi M, Onari K, Tomioka H, Tomii K, Gohma I, Imai S, Takakura S, Iinuma Y, Ichiyama S, Mishima M: **Genotypes and related factors reflecting macrolide resistance in pneumococcal pneumonia infections in Japan.** *J. Clin. Microbiol.* 2007, **45**(5):1440–1446.
- [246] Reinert RR, Filimonova OY, Al-Lahham A, Grudinina SA, Iliina EN, Weigel LM, Sidorenko SV: **Mechanisms of macrolide resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates from Russia.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, **52**(6):2260–2262.
- [247] Setchanova LP, Alexandrova A, Mitov I, Nashev D, Kantardjiev T: **Serotype distribution and antimicrobial resistance of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Bulgaria before the introduction of pneumococcal conjugate vaccine.** *J Chemother* 2012, **24**:12–17.
- [248] Cornick JE, Bentley SD: ***Streptococcus pneumoniae*: the evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides.** *Microbes Infect.* 2012, **14**(7-8):573–583.
- [249] Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Lexau C, Reingold A, Lefkowitz L, Cieslak PR, Cetron M, Zell ER, Jorgensen JH, Schuchat A: **Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States.** *N. Engl. J. Med.* 2000, **343**(26):1917–1924.
- [250] Tan TQ: **Pediatric invasive pneumococcal disease in the United States in the era of pneumococcal conjugate vaccines.** *Clin. Microbiol. Rev.* 2012, **25**(3):409–419.
- [251] DiNubile MJ: **Serotype replacement after pneumococcal vaccination.** *Lancet* 2012, **379**(9824):1388–1389.
- [252] Scott JR, Hanage WP, Lipsitch M, Miller EV, Moulton LH, Hinds J, Reid R, Santosham M, O'Brien KL: **Pneumococcal sequence type replacement among American Indian children: a comparison of pre- and routine-PCV7 eras.** *Vaccine* 2012, **30**(13):2376–2381.
- [253] Wroe PC, Lee GM, Finkelstein JA, Pelton SI, Hanage WP, Lipsitch M, Stevenson AE, Rifas-Shiman SL, Kleinman K, Dutta-Linn MM, Hinrichsen VL, Lakoma M, Huang SS: **Pneumococcal Carriage and Antibiotic Resistance in Young Children before 13-Valent Conjugate Vaccine.** *Pediatr Infect Dis J* 2011.
- [254] Marimon JM, Alonso M, Rolo D, Ardanuy C, Linares J, Perez-Trallero

- E: **Molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* invasive serotype 19A isolates from adults in two Spanish regions (1994-2009)**. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012, **31**(6):1009–1013.
- [255] Perez-Trallero E, Marimon JM, Alonso M, Ercibengoa M, Garcia-Arenzana JM: **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):3989–3991.
- [256] Corso A, Faccione D, Gagetti P, Pace J, Regueira M, Pace J, Vescina C, Von Specht M, Gomez D, Monzani V, Mayoral C, Nepote A, Badano A, Garcia B, Hernandez C, Perez C, Flores S, Littvik A, Rial MJ, Carvajal L, Cano H, Pace J, Procopio A: **Prevalence of *mef* and *ermB* genes in invasive pediatric erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Argentina**. *Rev. Argent. Microbiol.* 2009, **41**:29–33.
- [257] Ardanuy C, Fenoll A, Berron S, Calatayud L, Linares J: **Increase of the M phenotype among erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Spain related to the serotype 14 variant of the Spain9V-3 clone**. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, **50**(9):3162–3165.
- [258] G de la Pedrosa E, Baquero F, Loza E, Nadal-Serrano JM, Fenoll A, Del Campo R, Canton R: **High clonal diversity in erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* invasive isolates in Madrid, Spain (2000-07)**. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009, **64**(6):1165–1169.
- [259] Roberts AP, Mullany P: **Tn916-like genetic elements: a diverse group of modular mobile elements conferring antibiotic resistance**. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011, **35**(5):856–871.
- [260] Quintero B, Araque M, van der Gaast-de Jongh C, Hermans PW: **Genetic diversity of Tn916-related transposons among drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates colonizing healthy children in Venezuela**. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011, **55**(10):4930–4932.
- [261] Joloba ML, Kidenya BR, Kateete DP, Katabazi FA, Muwanguzi JK, Asiimwe BB, Alarakol SP, Nakavuma JL, Bajaksouzian S, Windau A, Jacobs MR: **Comparison of transformation frequencies among selected *Streptococcus pneumoniae* serotypes**. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2010, **36**(2):124–128.
- [262] Xu X, Cai L, Xiao M, Kong F, Oftadeh S, Zhou F, Gilbert GL: **Distribution of serotypes, genotypes, and resistance determinants among macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates**. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, **54**(3):1152–1159.
- [263] Calatayud L, Ardanuy C, Tubau F, Rolo D, Grau I, Pallares R, Martin R, Linares J: **Serotype and genotype replacement among macrolide-resistant invasive Pneumococci in adults: mechanisms of resistance and association with different transposons**. *J. Clin. Microbiol.* 2010, **48**(4):1310–1316.

Anexos

High clonal diversity in erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* invasive isolates in Madrid, Spain (2000–07)

Elia Gómez G. de la Pedrosa^{1,2}, Fernando Baquero^{1,2}, Elena Loza¹, José-María Nadal-Serrano¹,
Asunción Fenoll³, Rosa del Campo^{1,2} and Rafael Cantón^{1,2*}

¹Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal y CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain; ²Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana asociada al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain; ³Spanish Reference Laboratory for Pneumococci, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Received 23 May 2009; returned 24 June 2009; revised 12 September 2009; accepted 18 September 2009

Objectives: Erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* is still increasing worldwide. All 78 erythromycin-resistant *S. pneumoniae* isolates collected from blood cultures in our hospital (2000–07) were studied and the population structure was analysed by using different mathematical diversity indexes.

Methods: Erythromycin resistance determinants were screened by PCR. The population structure, including multilocus sequence typing, was analysed by using quantitative clonal diversity (diversity ratio, Simpson, Selander–Levin and Shannon mathematical indexes).

Results: The leading resistance gene was *erm(B)* (74.3% of the isolates), followed by the *erm(B)* plus *mef(A)* combination (17.9%) and *mef(A)* alone (7.7%). The most frequent serotypes were 14 (18%), 19A (15.4%) and 6B (11.5%). A polyclonal structure was detected in resistant strains, including the Spain^{9V}-3, Spain^{6B}-2 and Denmark¹⁴-32 international clones. Both genetic diversity and genetic distribution were high, particularly among clones containing *erm(B)* and *erm(B)* plus *mef(A)* determinants.

Conclusions: The resistance determinants *erm(B)* and the combination of *erm(B)* plus *mef(A)* were observed within multiple *S. pneumoniae* bacteraemic clones. The preservation of a polyclonal structure might provide a suitable background for further evolution of antibiotic resistance.

Keywords: pneumococcal blood isolates, macrolide resistance, clonal diversity indexes

Introduction

Macrolide resistance among invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Europe currently ranges from 11% to 34.7%.¹ High rates of macrolide resistance have also been detected in the USA and China, reaching 29.3% and 94.3%, respectively.^{2,3} These high rates have been explained as being due to the local spread of specific *S. pneumoniae* clones.⁴ The linkage of resistance to particular clones suggests that eventual changes in local clonality might modify the local resistance rates. On the contrary, maintenance of high clonal diversity indicates high efficiency in the lateral transfer of resistance mechanisms, particularly if different mechanisms, such as *erm(B)* or *mef(A)* genes, spread simultaneously. In this study, the presence of macrolide resistance determinants in all *S. pneumoniae* clones collected from

blood cultures (2000–07) in a single university hospital in Spain was studied. A polyclonal structure was observed, suggesting an efficient transfer of *erm(B)* and *mef(A)* genes among *S. pneumoniae* strains, which might contribute to the maintenance of high rates of macrolide resistance.

Material and methods

Bacterial isolates

Four-hundred and sixteen *S. pneumoniae* isolates (one per patient) were recovered from blood cultures between 2000 and 2007 in our institution. The 78 erythromycin-resistant isolates detected within this population (93.6% from adults) were selected for further study.

*Corresponding author. Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain. Tel: +34-913368832; Fax: +34-913368809; E-mail: rcanton.hrc@salud.madrid.org

Susceptibility testing and erythromycin resistance phenotypes

MICs were determined and interpreted according to CLSI methods. *S. pneumoniae* ATCC 49619 was used as a quality control strain. The detection of *erm* induction was performed using the disc diffusion approximation test.⁵

Detection of erythromycin resistance genes

PCRs were performed to detect erythromycin resistance determinants. Genomic DNA from *Streptococcus pyogenes* AC1 and *S. pyogenes* 02C1064 were used as positive controls.⁵

Population structure

Serotyping, PFGE and multilocus sequence typing (MLST) were performed.⁵ PFGE patterns were compared with those of clones established by the Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN).⁶ Clusters of related MLST sequence types (STs) were grouped using eBURST (<http://spneumoniae.mlst.net>).

Quantitative genetic diversity analysis

Genetic diversity was quantitatively assessed by applying the following diversity indexes to all STs obtained by MLST: (i) the clonal diversity index (*CD*),⁷ expressed as the ratio of the number of distinguishable STs over the total number of isolates (*N*), $CD = \sum ST_i / N$; (ii) the Simpson dominance diversity index (*D*), which refers to the probability that two isolates extracted at random belonged to different STs and is expressed as $D = 1 - \sum n_i(n_i - 1) / N(N - 1)$, where *N* is the total number of isolates studied and *n_i* the number of isolates with a particular ST;⁸ (iii) the Selander and Levin index (*H*),⁹ expressed as $H = 1 - \sum f_i^2$, where *f_i* is the relative frequency of each particular ST; and (iv) the Shannon index (*H'*), $H' = -\sum f_i \log_2 f_i$, where *f_i* is also the relative frequency of each particular ST.¹⁰ Unlike the previous indexes, this last index measures how uniformly the different STs within the population are distributed. Indexes were also applied to the erythromycin-resistant non-invasive *S. pneumoniae* isolates previously published.⁵

Statistical analysis

For categorical values the χ^2 test was used and for continuous variables the Mantel–Haenszel test was used. Results were considered as being statistically significant when the two-tailed *P* value was <0.05.

Results*Erythromycin susceptibility pattern and resistance trends*

The overall rate of erythromycin resistance among the 416 *S. pneumoniae* isolates was 18.7%, with a significant decreasing trend over time (*P*=0.025). Among erythromycin-resistant isolates, overall resistance rates for penicillin, cefotaxime, tetracycline and clindamycin were 60.2%, 29.5%, 80.7% and 98.7%, respectively. A significant association was found between resistance to tetracycline and resistance to erythromycin (*P*<0.001).

Macrolide resistance genes and phenotypes

The most common resistance gene was *erm*(B) (74.3%, *n*=58), followed by the *erm*(B) plus *mef*(A) combination

(17.9%, *n*=14) and *mef*(A) alone (7.7%, *n*=6). Inducible (iMLS_B) and constitutive (cMLS_B) MLS_B phenotypes were found among the *erm*(B)-positive isolates (*n*=46, 79.4% and *n*=12, 20.6%, respectively), and among those harbouring both *erm*(B) and *mef*(A) genes (*n*=12, 85.7% and *n*=2, 14.3%, respectively). The M phenotype was found in all six *mef*(A)-positive isolates.

Population structure among the erythromycin-resistant isolates

The most common serotypes were 14 (18%), 19A (15.4%), 6B (11.5%), 19F (7.7%), 6A (5.1%) and 4 (5.1%) (Table 1). A decreasing trend, close to statistical significance (*P*=0.052), in the frequency of serotypes (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) included in the heptavalent conjugate vaccine (PCV-7) was seen within the study period. By using the PMEN classification, six international resistant clones, including 27 different STs, were identified. Population analysis detected four clonal groups and 19 independent clones. The most frequent group (16 isolates) was related to the Spain^{9V}-3 international clone: 62.5% (10/16) harboured the *erm*(B) gene; 12.5% (2/16) the *mef*(A) gene; and 25% (4/16) *erm*(B) plus *mef*(A) genes. The second most frequent group was represented by the Denmark¹⁴-32 international clone (*n*=12 isolates), all of which carried only the *erm*(B) determinant. The third most frequent group, which comprised the Spain^{6B}-2 international clone, was formed by nine isolates, eight of which (88.9%) had only the *erm*(B) gene, while one isolate (11.1%) harboured both *erm*(B) and *mef*(A). Additional international resistant clones found included Sweden^{15A}-25 (*n*=7), England¹⁴-9 (*n*=2) and Tennessee¹⁴-18 (*n*=1) (Table 1).

Quantitative genetic diversity in the erythromycin-resistant isolates

By applying the simple *CD* index (proportion of STs found among isolates harbouring a particular mechanism of resistance), the blood isolates only carrying *erm*(B) appeared to be less diverse (*CD*=0.32) than those with only *mef*(A) (0.66) or *erm*(B) plus *mef*(A) (0.78). The Shannon index (*H'*) provides a complementary view to such an analysis, showing that the diversity (relative frequencies of each ST) within the population containing *mef*(A) was not as highly distributed (*H'*=1.92) as in the *erm*(B)-containing populations, either with *erm*(B) alone (3.75) or with *erm*(B) plus *mef*(A) (3.32). It can be suggested that the diversity of *S. pneumoniae* among blood isolates was similarly high among isolates containing *erm*(B) and *erm*(B) plus *mef*(A). Only a relatively low number of different STs were present among *mef*(A)-positive invasive isolates. This conclusion was also supported by the Simpson (*D*) and related Selander–Levin (*H*) indexes, with lower probability of diversity for an invasive population with *mef*(A) alone (0.87 and 0.72, respectively) than for those with *erm*(B) alone (0.92 and 0.90, respectively) and *erm*(B) plus *mef*(A) (0.96 and 0.89, respectively), but the scarcity of *mef*(A)-alone strains is to be noted. When the quantitative assessment of genetic diversity of this population was compared with the non-invasive population, the diversity was consistently lower among invasive clones (Table 2).

Clonal diversity in erythromycin-resistant invasive *S. pneumoniae*

Table 1. Population structure, genetic determinants and year of isolation of the erythromycin-resistant isolates by eBURST analysis

No. of isolates	MLST		Serotype(s) (n)	PFGE	Gene(s) (n)	Year(s) (n)
	ST	group/clone				
12	557	Spain ^{9V} -3	14 (11), 19F (1)	Spain ^{9V} -3	<i>erm</i> (B) (7), <i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A) (3), <i>mef</i> (A) (2)	2000 (1), 2001 (3), 2002 (4), 2003 (4)
4	2246	Spain ^{9V} -3	11A (3), 9V (1)	Spain ^{9V} -3	<i>erm</i> (B) (3), <i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A) (1)	2003 (1), 2004 (1), 2007 (2)
11	276	Denmark ¹⁴ -32	19A	Denmark ¹⁴ -32	<i>erm</i> (B)	2000 (3), 2001 (1), 2002 (1), 2004 (1), 2005 (2), 2007 (3)
1	230	Denmark ¹⁴ -32	24	Denmark ¹⁴ -32	<i>erm</i> (B)	2005
8	90	Spain ^{6B} -2	6B	Spain ^{6B}	<i>erm</i> (B)	2000 (3), 2001 (2), 2002 (3)
1	1624	Spain ^{6B} -2	6B	Spain ^{6B}	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A)	2003
1	62	group 4	19A	19A-11A-ST62	<i>mef</i> (A)	2003
1	55	group 4	11A	19A-11A-ST55	<i>mef</i> (A)	2006
7	63	Sweden ^{15A} -25	8 (4), 15A (2), NT (1)	Sweden ^{15A} -25	<i>erm</i> (B) (6), <i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A) (1)	2001 (1), 2005 (4), 2007 (2)
4	1866	ST1866	4	4-ST1866	<i>erm</i> (B) (2), <i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A) (2)	2001 (1), 2002 (1), 2006 (2)
3	3427	ST3427	6A	6A-ST3427	<i>erm</i> (B)	2001 (1), 2004 (1), 2006 (1)
3	30	ST30	16 (2), 19A (1)	16-19A-ST30	<i>erm</i> (B)	2000 (1), 2002 (1), 2005 (1)
3	89	ST89	19F	19F-ST89	<i>erm</i> (B)	2002 (2), 2005 (1)
3	42	ST42	23A	23A-ST42	<i>erm</i> (B) (2), <i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A) (1)	2002 (2), 2007 (1)
2	179	ST179	19F	19F-ST179	<i>erm</i> (B)	2005 (1), 2007 (1)
2	932	ST932	23F	23F-ST932	<i>erm</i> (B) (1), <i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A) (1)	2006 (1), 2007 (1)
2	9	England ¹⁴ -9	14	England ¹⁴ -9	<i>mef</i> (A)	2006
1	193	ST193	15B	15B-ST193	<i>erm</i> (B)	2006
1	227	ST227	1	1-ST227	<i>erm</i> (B)	2005
1	386	ST386	3	3-ST386	<i>erm</i> (B)	2006
1	461	ST461	10A	10A-ST461	<i>erm</i> (B)	2000
1	1706	ST1706	15B	15B-ST1706	<i>erm</i> (B)	2005
1	3428	ST3428	NT	ST3428	<i>erm</i> (B)	2002
1	67	Tennessee ¹⁴ -18	14	Tennessee ¹⁴ -18	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A)	2003
1	285	ST285	18C	18C-ST285	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A)	2006
1	473	ST473	6A	6A-ST473	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A)	2005
1	717	ST-717	33	33-ST717	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A)	2003

NT, non-typeable.

Table 2. Diversity indexes according to macrolide resistance determinants among invasive and non-invasive *S. pneumoniae* populations

Index	Invasive population				Non-invasive population		
	<i>mef(A)</i>	<i>erm(B)+mef(A)</i>	<i>erm(B)</i>	<i>erm(B)+mef(A)</i> and <i>mef(A)</i>	<i>mef(A)</i>	<i>erm(B)+mef(A)</i>	<i>erm(B)+mef(A)</i> and <i>mef(A)</i>
Clonal diversity (<i>CD</i>)	0.66	0.78	0.32	0.70	0.52	0.75	0.66
Simpson (<i>D</i>)	0.87	0.96	0.92	0.94	0.83	0.97	0.97
Selander–Levin (<i>H</i>)	0.72	0.89	0.90	0.89	0.78	0.94	0.94
Shannon (<i>H'</i>)	1.92	3.32	3.75	3.54	2.65	4.21	4.58

Discussion

In a previous publication studying a non-invasive *mef(A)* plus *erm(B)* *S. pneumoniae* population and including pre-vaccination isolates, we observed that this population was polyclonal.⁵ It is commonly accepted that invasive isolates correspond to a particular subset of *S. pneumoniae* strains and potentially a lesser diversity could be expected when compared with non-invasive ones. In the current study with invasive erythromycin-resistant isolates, the maintenance of a highly polyclonal structure is of note. Polyclonality should also be theoretically reduced by the PCV-7 vaccination. We observed a decreasing but not statistically significant trend among isolates belonging to serotypes included in the PCV-7.^{2,3} The maintenance of high rates of macrolide resistance in a polyclonal local landscape can be explained by horizontal gene transfer of *erm(B)* and *mef(A)* genes, and by capsular switching. In our series, switching was observed within the Spain^{9V}-3 and the Denmark¹⁴-32 clonal complexes. This is compatible with a potential process of frequency-dependent selection, in which the less frequent clones might have the advantage of eliciting weaker immune responses in the host population.

Our work indicates that even if we are scanning a reduced geographical area (which should favour a more clonal population structure), the presence of both *erm(B)* and *mef(A)* determinants occurred in a polyclonal *S. pneumoniae* landscape, unlike other studies in which it was associated with a specific clone (Taiwan^{19F}-14).⁴ The converse trend was also observed in our series: *erm(B)* alone, *mef(A)* alone or the *erm(B)* plus *mef(A)* genes were found in the same Spain^{9V}-3 international resistant clone, suggesting the existence of a transclonal and intracolonial exchange of resistance determinants.

Different diversity indexes were applied to quantitatively evaluate the clonal diversity associated with different macrolide resistance determinants. The mere calculation of the proportion of different STs per number of isolates (*CD* index) described the diversity, but was insufficient to appropriately assess its distribution. Indeed, the *CD* index could wrongly suggest a slightly higher diversity in invasive *erm(B)* plus *mef(A)* clones than in non-invasive isolates. Applying Simpson, Selander–Levin and Shannon indexes, we showed that the diversity distribution was (as it could be expected) higher among non-invasive organisms than among invasive ones. This suggests that the diversity of non-invasive clones is not entirely represented in invasive isolates, but this difference, particularly for *erm(B)*-plus-*mef(A)*-containing genotypes, is relatively small. If we assume the hypothetical acquisition of *mef(A)* genes by *erm(B)*-containing clones, this

process does not appear to influence its potential invasive behaviour, as the clonal diversity distribution is almost identical in both groups. It could be suggested that clonal diversity and its distribution was created in *erm(B)*-containing genotypes, and then the same population structure was enriched in *mef(A)* genes.

In conclusion, a polyclonal structure involving international resistant clones was found in *S. pneumoniae* invasive isolates collected between 2000 and 2007. High clonal diversity was maintained, particularly among isolates containing *erm(B)* or *erm(B)* plus *mef(A)* genes. The preservation of this complex polyclonal population structure should be attributed to the efficient lateral spread of macrolide resistance determinants among multiple *S. pneumoniae* clones, and might provide a suitable background for further dissemination of antibiotic resistance. This conclusion is even stronger, considering that the work was carried out in a small geographical location, therefore in non-favourable conditions for polyclonality.

Acknowledgements

We are grateful to the Biostatistics Department of Ramón y Cajal University Hospital and especially to Alfonso Muriel for assistance in the statistical analysis.

Funding

E. Gómez G. de la Pedrosa is a recipient of a Post-MIR contract (CM07/147) from the Instituto Carlos III, Ministry of Research and Innovation, Spain. Part of this study was funded by CIBERESP (Network Center for Biomedical Research in Epidemiology and Public Health), the Microbial Sciences Foundation and from DeReMicrobiana Project (CAM-S-SAL-0246-2006) of the Madrid Autonomous Community, Spain.

Transparency declarations

None to declare.

References

1. The European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). <http://www.rivm.nl/earss> (12 July 2009, date last accessed).

Clonal diversity in erythromycin-resistant invasive *S. pneumoniae*

2. 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.
3. Yang F, Xu XG, Yang MJ *et al.* Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* isolated from Shanghai, China. *Int J Antimicrob Agents* 2008; **32**: 386–91.
4. Farrell DJ, Jenkins SG, Brown SD *et al.* Emergence and spread of *Streptococcus pneumoniae* with *erm*(B) and *mef*(A) resistance. *Emerg Infect Dis* 2005; **11**: 851–8.
5. de la Pedrosa EG, Morosini MI, van der Linden M *et al.* Polyclonal population structure of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Spain carrying *mef* and *mef* plus *erm*(B). *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 1964–9.
6. McGee L, McDougal L, Zhou J *et al.* Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the Pneumococcal Molecular Epidemiology Network. *Clin Microbiol* 2001; **39**: 2565–71.
7. Ellstrand NC, Roose ML. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *Am J Bot* 1987; **74**: 123–31.
8. Simpson EH. Measurement of diversity. *Nature* 1949; **163**: 688.
9. Selander RK, Levin BR. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. *Science* 1989; **210**: 545–7.
10. Shannon CE. A mathematical theory of communication. *Bell Syst Tech J* 1948; **27**: 379–423.

Polyclonal Population Structure of *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Spain Carrying *mef* and *mef* plus *erm(B)*[∇]

Elia Gómez G. de la Pedrosa,¹ María-Isabel Morosini,¹ Mark van der Linden,²
Patricia Ruiz-Garbajosa,¹ Juan Carlos Galán,¹ Fernando Baquero,¹
Ralf René Reinert,² and Rafael Cantón^{1*}

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, and CIBER-ESP, Madrid, Spain,¹ and Institute for Medical Microbiology, National Reference Center for Streptococci, University Hospital (RWTH), Aachen, Germany²

Received 15 November 2007/Returned for modification 4 February 2008/Accepted 15 March 2008

The population structure (serotypes, pulsed-field gel electrophoresis [PFGE] types, and multilocus sequencing types) of 45 *mef*-positive *Streptococcus pneumoniae* isolates [carrying *mef* alone ($n = 17$) or with the *erm(B)* gene $n = 28$] were studied. They were selected from among all erythromycin-resistant isolates ($n = 244$) obtained from a collection of 712 isolates recovered from different Spanish geographic locations in the prevaccination period from 1999 to 2003. The overall rates of resistance (according to the criteria of the CLSI) among the 45 *mef*-positive isolates were as follows: penicillin G, 82.2%; cefotaxime, 22.2%; clindamycin, 62.2%; and tetracycline, 68.8% [mainly in isolates carrying *erm(B)* plus *mef(E)*; $P < 0.001$]. No levofloxacin or telithromycin resistance was found. Macrolide resistance phenotypes (as determined by the disk diffusion approximation test) were 37.7% for macrolide resistance [with all but one due to *mef(E)*] and 62.2% for constitutive macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance [cMLS_B; with all due to *mef(E)* plus *erm(B)*]. Serotypes 14 (22.2%), 6B (17.7%), 19A (13.3%), and 19F (11.1%) were predominant. Twenty-five different DNA patterns (PFGE types) were observed. Our *mef*-positive isolates were grouped (by eBURST analysis) into four clonal complexes ($n = 18$) and 19 singleton clones ($n = 27$). With the exception of clone Spain^{9V}-3, all clonal complexes (clonal complexes 6B, Spain^{6B}-2, and Sweden^{15A}-25) and 73.6% of singleton clones carried both the *erm(B)* and the *mef(E)* genes. The international multiresistant clones Spain^{23F}-1 and Poland^{6B}-20 were represented as singleton clones. A high proportion of *mef*-positive *S. pneumoniae* isolates presented the *erm(B)* gene, with all isolates expressing the cMLS_B phenotype. A polyclonal population structure was demonstrated within our Spanish *mef*-positive *S. pneumoniae* isolates, with few clonal complexes overrepresented within this collection.

Macrolide resistance among *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates has risen to prominence. The rate of resistance to macrolides is even higher than that to penicillin, particularly in Spain and some other European countries, such as France, Poland, Greece, and Portugal (17, 23). In most European countries, erythromycin resistance is mainly due to the presence of the *erm(B)* gene. This gene encodes an rRNA methylase responsible for the macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance (MLS_B) phenotype and is associated with conjugative transposons. The clonal dispersion of *erm(B)*-positive *S. pneumoniae* isolates and the horizontal transfer of transposable elements carrying this determinant have been associated with the increase in the rate of erythromycin resistance in this organism (4, 12). Erythromycin resistance may also be associated with the expression of efflux pumps encoded by *mef* genes that endow the macrolide resistance (M) phenotype (7). This phenotype has traditionally been more prevalent in North America than in Europe (7, 12).

In recent years, the presence of both the *erm(B)* and the *mef(E)* genes in *S. pneumoniae* clinical isolates has been increasingly recognized, but they are more prevalent in Asian

countries than in Europe and the United States (10, 11). Despite the interest in this association on the evolution of macrolide and ketolide resistance, very few studies have investigated the population biology of a collection of isolates recovered during different time periods and/or from different geographic origins (13, 26). In Spain, population structure studies have shown that resistance in *S. pneumoniae* international clones, such as clones Spain^{9V}-3 and England¹⁴-9, are mainly associated with those endowed with the M phenotype (1, 2), whereas clones Spain^{23F}-1 and Spain^{6B}-2 are associated with isolates endowed with the MLS_B phenotype (14). This type of analysis with *S. pneumoniae* isolates with both the *erm(B)* and the *mef* genes has not been reported. In the present study, the population structure and clonal relatedness of 45 *mef*-positive isolates [62.2% of which had both the *erm(B)* and the *mef* genes] identified within a collection of 712 *S. pneumoniae* isolates recovered from different Spanish hospitals from 1999 to 2003 were fully investigated. Moreover, the corresponding resistance phenotypes and antibiotic susceptibility patterns were also studied.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates. Seven hundred twelve *S. pneumoniae* clinical isolates (244 isolates nonsusceptible to erythromycin) recovered during the prevaccination period (in Spain, the conjugate heptavalent vaccine was accepted for use in 2002, but it was rarely used until 2004) were studied. Isolates were prospectively collected from 14 Spanish hospitals representing 14 different geographic areas

* Corresponding author. Mailing address: Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, and CIBER-ESP, Madrid 28034, Spain. Phone: 34-91-3368330. Fax: 34-91-3368809. E-mail: rcanton.hrc@salud.madrid.org.

[∇] Published ahead of print on 24 March 2008.

during the fall and winter seasons of 1999 through 2003. Among these strains, a total of 45 *mef*-positive isolates were detected, and all of them were selected for further studies. The origins of these 45 isolates are included in Table 1. A total of 26.6% (12 of 45) of these isolates were of pediatric origin.

Susceptibility testing and erythromycin resistance phenotypes. The MICs of penicillin G, cefotaxime, erythromycin, clindamycin, telithromycin, tetracycline, and levofloxacin were determined by the broth microdilution method, according to Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (3). Incubation was performed at 35°C in ambient air. *S. pneumoniae* ATCC 49619 was used as the reference strain in each run. The breakpoints were those established by the CLSI guidelines (3). The phenotypic detection of *erm* induction was performed by using the macrolide (erythromycin)-clindamycin disk diffusion approximation test, as described previously (17).

Detection of erythromycin resistance genes. A real-time PCR approach was carried out for detection of the *erm* and *mef* genes among erythromycin-resistant isolates by using the conditions described previously (20). A subsequent scheme of multiplex PCR was followed to differentiate between the *mef*(A) and the *mef*(E) genes. Specific primers designed for this purpose were forward primer *mef*AF (5'-AATACAACAATTGGAACTT-3'), forward primer *mef*EF (5'-AAGGAGTTGTGGTCTGA-3'), and a reverse primer for both the *mef*(A) and the *mef*(E) genes, primer *mef*R (5'-AATCGTGTAATCATTGG-3'). The expected sizes of the PCR products were 1,080 kb for *mef*(A) and 480 kb for *mef*(E). The PCR amplification mixture of 25 µl contained 15 mM Tris-HCl, 50 mM KCl (pH 8.0), 25 mM MgCl₂, 100 µM of each nucleotide, 0.15 pmol of the two forward primers *mef*AF and *mef*EF, 0.3 pmol of reverse primer *mef*R, 1.5 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA), and 1 µl of genomic DNA. The PCR conditions (PTC-100 thermocycler; MJ Research Inc., Watertown, MA) comprised an initial denaturation step at 94°C for 12 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 52°C for 1 min, and elongation at 72°C for 1 min. After the amplification cycles, a final elongation step of 10 min at 72°C was included.

Population structure. Serotyping was performed with the Neufeld Quellung reaction by using antisera provided by the Statens Serum Institut (Copenhagen, Denmark). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was performed as previously described by del Campo et al. (6). Briefly, chromosomal DNA was prepared by following the standard protocol for gram-positive bacteria, with some modifications (6). The DNA was restricted with the *Sma*I endonuclease (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany). Electrophoresis was performed with CHEF DR-III equipment (Bio-Rad, Birmingham, United Kingdom) for 23 h at 14°C, and the following settings were applied: 6 V/cm and 1 to 30 s. The PFGE patterns obtained were compared with those for clones established by the Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (16).

Multilocus sequence typing (MLST) scheme for *S. pneumoniae* was carried out as described previously (9). Clusters of related sequence types (STs) were grouped into clonal complexes (CCs) by use of the eBURST program (<http://www.mlst.net>). STs were clustered with BioNumerics software (version 4.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) by using a categorical coefficient and a graphing method called the minimum-spanning tree, as described previously (24).

Statistical analysis. Statistical associations were analyzed by the chi-square test. Differences were considered statistically significant when the two-tailed *P* value was less than 0.05.

RESULTS

Macrolide resistance genes, phenotypes, and susceptibility patterns. Within the entire *S. pneumoniae* population (*n* = 712), 244 isolates were nonsusceptible to erythromycin. Among those isolates, 80.7% carried the *erm*(B) gene as the sole genetic determinant and showed the MLS_B phenotype. In addition, 45 (18.4%) of the erythromycin-resistant isolates carried a *mef*-type gene, and of these, 44 isolates had the *mef*(E) gene and the remaining one had the *mef*(A) gene. It is of note that 28 of 45 *mef*-positive isolates also carried the *erm*(B) gene (62.2%). In two isolates displaying erythromycin and clindamycin MICs of 0.5 mg/liter, neither the *erm*(B) gene nor the *mef* gene was detected. The constitutive MLS_B phenotype was observed in all 28 isolates carrying both the *mef* and the *erm*(B) genes, whereas the M phenotype was detected in the remaining

17 isolates that carried only one of the *mef* genes alone. No temporal or local geographic association among the *mef*-positive or the *mef*- plus *erm*(B)-positive isolates was observed (data not shown).

The overall rates of resistance to penicillin G, cefotaxime, tetracycline, and clindamycin among all 45 *mef*-positive isolates were 82.2% [35.5% for *mef*-positive isolates plus 46.7% for the *mef*- plus *erm*(B)-positive isolates], 22.2% [17.7% for the *mef*-positive isolates plus 4.4% for the *mef*- plus *erm*(B)-positive isolates], 68.8% [13.3% for the *mef*-positive isolates plus 55.5% for the *mef*- plus *erm*(B)-positive isolates], and 62.2% [0% for the *mef*-positive isolates plus 62.2% for the *mef*- plus *erm*(B)-positive isolates], respectively. Neither telithromycin resistance nor levofloxacin resistance was found (MIC ranges, 0.03 to 1 mg/liter and 0.25 to 2 mg/liter, respectively).

Population structure in *mef*-positive *S. pneumoniae* isolates. The serotype distribution among the 45 *mef*-positive isolates was as follows: serotype 14, 22.2%; serotype 6B, 17.7%; serotype 19A, 13.3%; serotype 19F, 11.1%; serotype 11A, 6.6%; serotype 9V, 6.6%; serotype 15A, 6.6%; serotype 23F, 4.4%; and other serotypes, 11.1%. With a single exception, all isolates belonging to serotype 14 (*n* = 10) harbored the *mef* gene alone. Six different PFGE patterns were found among the *mef*(E)-positive isolates, with 58.8% of them belonging to the Spain^{9V}-3 clone. Among the *erm*(B)- plus *mef*(E)-positive isolates, 19 different PFGE patterns were found, with the Sweden^{15A}-25, Spain^{6B}-2, Spain^{23F}-1, Poland^{6B}-20, and Norway^{NT}-42 clones represented. Analysis of the MLST results by use of the eBURST program showed that our *mef*-positive isolates were grouped into 4 CCs and 19 singleton clones (Fig. 1). The serotypes, the PFGE type distribution according to analysis with the eBURST program, and the corresponding STs are shown in Table 1.

The CCs grouped 18 of the *mef*-positive isolates; 10 of them carried the *mef*(E) gene as the sole resistance determinant and belonged to the Spain^{9V}-3 international clone, and 8 isolates carried both the *erm*(B) and the *mef*(E) genes. The latter isolates were grouped into the Spain^{6B}-2 international clone (*n* = 3); the Sweden^{15A}-25 clone (*n* = 2); and CC-6B, which includes two different STs (ST135 and ST1638, which is a double-locus variant of ST135) (*n* = 3).

Twenty-seven isolates were grouped into singleton clones which included some international resistant clones, such as Spain^{23F}-1 [two isolates harbored both the *erm*(B) and the *mef*(E) genes], Poland^{6B}-20 and Norway^{NT}-42 [one isolate each carried both the *erm*(B) and the *mef*(E) genes], and England¹⁴-9 [represented by the only isolate that carried the *mef*(A) gene detected in this study]. With the exception of tetracycline (MIC, 4 mg/liter), this isolate was susceptible to all antibiotics tested. ST276 (a single-locus variant of the Denmark¹⁴-32 clone), ST549, and ST62 grouped more than one isolate each (four, three, and three isolates, respectively), while the other STs were each represented by a single isolate. The relationship between the STs and the macrolide resistance genes is shown in Table 1.

Serotype distribution according to analysis with the eBURST program showed that even though strains of some serotypes belonged to specific international clones, such as serotypes 6B, 14, 19A, and 15A, these serotypes were also found among the isolates grouped as singleton clones. The

TABLE 1. Typing characteristics of 45 *mef*-positive *Streptococcus pneumoniae* isolates recovered in Spain

Gene	MLST type		PFGE type or subtype	Serotype(s) (no. of isolates)	Yr of isolation	Origin (no. of isolates)
	ST (no. of isolates)	CC or singleton clone				
<i>mef</i> (E)	ST557 (7)	CC-Spain ^{9V} -3	Spain ^{9V} -3	14 (6), 19A (1)	1999-2003	Sputum (5), ear (1), blood (1)
<i>mef</i> (E)	ST44 (1)	CC-Spain ^{9V} -3	Spain ^{9V} -3	14	1999-2003	Nasal cavity (1)
<i>mef</i> (E)	ST2636 (1)	CC-Spain ^{9V} -3	Spain ^{9V} -3	19A	1999-2003	Sputum (1)
<i>mef</i> (E)	ST2637 (1)	CC-Spain ^{9V} -3	Spain ^{9V} -3	14	1999-2003	BAL ^a fluid (1)
<i>mef</i> (E)	ST62 (3)	S ^b	11A-ST62	11A	1999-2003	BAL fluid(1), alveolar brush (1), conjunctiva (1)
<i>mef</i> (E)	ST2819 (1)	S	9V-ST2819	9V	2000-2001	Nasal cavity (1)
<i>mef</i> (E)	ST2708 (1)	S	31-ST2708	31	2000-2001	Conjunctiva (1)
<i>mef</i> (E)	ST2822 (1)	S	9V-ST2822	9V	2002-2003	Sputum (1)
<i>mef</i> (A)	ST9 (1)	S	England ¹⁴ -9	14	2000-2001	Ear (1)
<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	ST 90 (1)	CC-Spain ^{6B} -2	Spain ^{6B} -2	6B	1999-2000	Sputum (1)
<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	ST 1542 (1)	CC-Spain ^{6B} -2	Spain ^{6B} -2	6B	1999-2000	Sputum (1)
<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	ST 1624 (1)	CC-Spain ^{6B} -2	Spain ^{6B} -2	6B	1999-2000	Sputum (1)
<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	ST 135 (2)	CC-6B	Clone ^{6B} -ST135	6B	1999-2000	Sputum (2)
<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	ST 2638 (1)	CC-Sweden ^{15A} -25	Clone ^{6B} -ST2638	6B	1999-2000	Nasal cavity (1)
<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	ST 63 (1)	CC-Sweden ^{15A} -25	Sweden ^{15A} -25	15A	2000-2001	Blood (1)
<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	ST 1149 (1)	CC-Sweden ^{15A} -25	Sweden ^{15A} -25	15A	2000-2001	Conjunctiva
<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	ST 276 (4)	S	Clone ^{19A} -ST276	19A	2000-2001	Conjunctiva (1)
<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	ST 549 (3)	S	Unrelated	19F (2), 23F (1)	1999-2000	Ear (2), catheter (1)
<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	ST 81 (2)	S	Spain ^{23F} -1	23F, 19F	1999-2000	Bronchial aspirate (1), sputum (1)
<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	ST 17 (1)	S	14-CC17	14	1999-2000	Sputum (1)
<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	ST 73 (1)	S	15A-CC73	15A	1999-2000	Sputum (1)
<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	ST 87 (1)	S	19F-CC87	19F	2000-2001	Nasal cavity (1)
<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	ST 260 (1)	S	3-ST260	3	1999-2000	Pleural fluid (1)
<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	ST 271 (1)	S	19F-ST271	19F	2002-2003	Sputum (1)
<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	ST 315 (1)	S	Poland ^{6B} -20	6B	2000-2001	Sputum (1)
<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	ST 344 (1)	S	Norway ^{NT} -42	9V	2000-2001	Sputum (1)
<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	ST 1486 (1)	S	6B-ST1486	6B	1999-2000	Sputum (1)
<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	ST 1577 (1)	S	15C-ST1577	15C	2002-2003	Sputum (1)
<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	ST 2639 (1)	S	10A-ST2639	10A	2002-2003	Bronchial aspirate (1)
<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E)	ST 2820 (1)	S	12F-ST2820	12F	2002-2003	Sputum (1)

^a BAL, bronchoalveolar lavage.^b S, singleton clone.

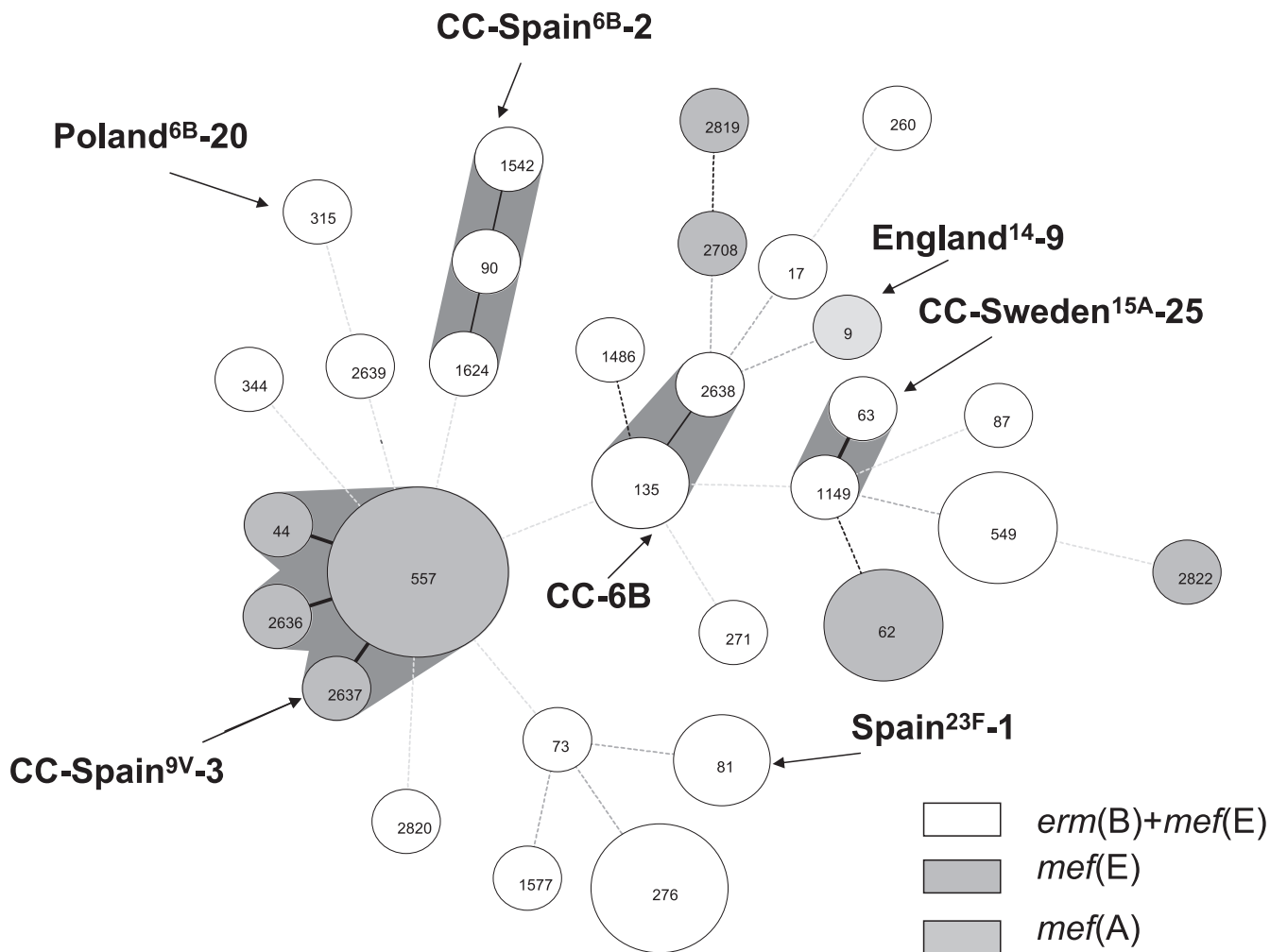


FIG. 1. Clustering of 30 STs identified among 45 *mef*-positive *Streptococcus pneumoniae* isolates by use of the minimum-spanning tree. Each circle represents an ST, and the type number is indicated in the circle. The area of each circle corresponds to the number of isolates. Thick, short, solid lines connect single-locus variants; thin, longer, solid lines connect double-locus variants; black dotted lines connect STs which differ at three loci; and gray dotted lines connect STs that differ in more than three loci. CCs and international resistant clones (Pneumococcal Molecular Epidemiology Network) are indicated.

serotype distribution according to analysis with the eBURST program is shown in Table 1.

Coresistance to penicillin (MIC range, 0.12 to 4 mg/liter) was found among the isolates grouped into CCs. The only isolate intermediate for cefotaxime (MIC, 4 mg/liter) belonged to CC-Spain^{9V}-3. This isolate also showed increased MICs for levofloxacin (2 mg/liter). This was also found among the CC-Spain^{6B}-2 and CC-6B isolates. Only eight isolates (all of them belonging to CC-Spain^{9V}-3) were susceptible to tetracycline. The susceptibility patterns among the CCs is shown in Table 2. Some differences in susceptibilities among the isolates grouped as singleton clones were observed between the *mef*-positive isolates and the isolates containing both *erm*(B) and *mef*(E).

Coresistance to penicillin G was more prevalent among the isolates carrying *erm*(B) plus *mef*(E) (89.2%) than among the *mef*(E)/*mef*(A)-positive (70.5%) isolates. The same trend, but with a high degree of statistical significance ($P < 0.001$), was observed for the rate of tetracycline resistance among the isolates positive for both *erm*(B) plus *mef*(E) (92.8%) compared with that among the *mef*(E)/*mef*(A)-positive (29.4%)

isolates. The rates of cefotaxime resistance were similar between the two groups. The susceptibility patterns of the singleton clones according to the macrolide resistance genotype are shown in Table 3.

TABLE 2. Susceptibility patterns of isolates belonging to different clonal complexes

Antimicrobial agent	MIC range (mg/liter)			
	Spain ^{9V} -3 <i>mef</i> (E) (n = 10)	Sweden ^{15A} -25 <i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E) (n = 2)	Spain ^{6B} <i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E) (n = 3)	CC-6B <i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E) (n = 3)
Erythromycin	0.5–16	≥64	≥64	32–>64
Clindamycin	0.03–0.25	≥64	≥64	32–>64
Telithromycin	0.05–0.1	0.008–0.03	0.08–0.5	<0.01–0.06
Tetracycline	0.5–4	≥64	≥64	4–>64
Penicillin	0.12–4	0.12–0.5	4	0.12–0.5
Cefotaxime	0.06–4	0.06–0.12	1–2	0.12
Levofloxacin	0.25–2	1	1–2	0.5–2

TABLE 3. Susceptibility patterns of singleton clones

Antimicrobial agent	<i>mef(E)/mef(A)</i> (n = 17)				<i>erm(B) + mef(E)</i> (n = 20)			
	MIC (mg/liter)			% of overall resistance	MIC (mg/liter)			% of overall resistance
	Range	50%	90%		Range	50%	90%	
Erythromycin	2–16	4	16	100	32–>64	64	>64	100
Clindamycin	≤0.03–0.25	0.03	0.25	0	16–>64	64	>64	100
Telithromycin	≤0.03–0.5	0.12	0.5	0	<0.03–1	0.06	0.25	0
Tetracycline	0.12–4	1	4	42.8	2–>32	16	>32	95
Penicillin	0.01–1	0.03	1	14.2	≤0.015–4	1	4	85
Cefotaxime	0.008–0.25	0.01	0.25	0	≤0.015–4	0.5	2	25
Levofloxacin	0.5–1	1	1	0	0.5–1	1	1	0

DISCUSSION

Typing studies are useful for providing an understanding of the epidemiology and spread of resistant bacteria as well as establishing control protocols against epidemics (9). For *S. pneumoniae*, capsular typing is commonly used in clinical laboratories and has demonstrated that particular serotypes, such as serotypes 23F and 6B, are related to the worldwide spread of penicillin G-resistant isolates (5, 21). PFGE is useful as a means of observing recent changes, and MLST is valuable for discriminating the variations that slowly accumulate among the bacterial population (9). These techniques have been used in our study with all 45 erythromycin-resistant *S. pneumoniae* isolates carrying *mef* genes recovered during a prospective study in different Spanish geographic areas. With the aid of the MLST technique, the *mef*-positive isolates among our Spanish *S. pneumoniae* isolates were demonstrated to be polyclonal, with few CCs overrepresented within the collection studied.

Resistance to macrolides in *S. pneumoniae* dramatically increased in Spain during the prevaccination period from 1999 to 2003 (17, 23). In our collection, 34.3% of the isolates were resistant to erythromycin, mainly due to the presence of the *erm(B)* gene. In recent years, an increase in the prevalence of efflux mechanisms (M phenotype) has been observed (13, 20). Among the macrolide-resistant isolates in our collection, the M phenotype was found in 6.9% of the isolates, and all of them carried a *mef* gene. However, the presence of this gene was even higher, since 11.5% (28 of 244 isolates) of the isolates with a constitutive MLS_B phenotype concomitantly presented the *erm(B)* gene. This value is higher than that previously reported from other studies in Spain, in which *mef* isolates did not have the *erm(B)* gene (2). Such an increasing association between the *mef(E)* and the *erm(B)* genes was unexpected in a country with a high incidence of *S. pneumoniae* isolates harboring the *erm(B)* gene. It is indeed difficult to understand the possible selective advantage of these isolates harboring both determinants, as *erm(B)* alone provides higher MICs than those apparently needed to resist the actions of macrolides. In other countries, the increased prevalence of isolates carrying both determinants has been related to the spread of specific clones, such as the Taiwan^{19F}-14 clone, and members of a specific CC, CC-271, which includes ST271, ST236, and ST320 (8, 10). It is of note that ST271 was also found in our collection, but it was found as a singleton clone not related to the other STs (Fig. 1). In our study, the presence of isolates with both the *erm(B)* and the *mef(E)* genes was associated with three differ-

ent CCs and 14 singleton clones (Table 1). These results demonstrated the nonclonal nature of the population studied and that horizontal gene transfer processes might have occurred, as may have the selection of resistant *S. pneumoniae* isolates harboring the *mef(E)* and the *erm(B)* genes.

In addition, most of the *erm(B)* plus *mef(E)* isolates were also resistant to penicillin, a fact that has also been found among isolates in geographic areas where isolates with this dual genotype are prevalent (10). On the other hand, tetracycline resistance was significant among the isolates positive for both *erm(B)* and *mef(E)*. This fact could be related to the presence of conjugative transposons, like Tn2010, recently described in these isolates (4, 8). The participation of this trait in the maintenance of these isolates should be investigated.

Within the population with both the *erm(B)* and the *mef* determinants that we studied, we were able to identify multiresistant international clones (www.sph.emory.edu/PMEN) circulating in Spain (2, 14, 18), including clones Spain^{6B}-2 and Sweden^{15A}-25 among the CCs and clones Spain^{23F}-1, Poland^{6B}-20 and Norway^{NT}-42 as singletons. Both the Spain^{6B}-2 and Sweden^{15A}-25 clones have been shown to be overrepresented among *S. pneumoniae* isolates that are highly resistant to penicillin or that have an MLS_B phenotype (2, 14). Among the singleton clones, the Spain^{23F}-1 clone was scarcely represented in our collection (two isolates of serotypes 19A and 23F), as were the Poland^{6B}-20 and Norway^{NT}-42 clones, compared with their representations in other studies (2, 14). Moreover, we did not find the Spain¹⁴-5 clone, which also carries both genes and which has been found in some specific geographic areas of Spain over a 22-year period (15, 19). Among the isolates with the *mef* gene as the sole resistance determinant, only one isolate had the *mef(A)* subclass. This isolate belonged to the international resistant clone England¹⁴-9, also described in other European countries (1). The population of *mef(E)*-positive isolates was structured into four singleton clones and a CC belonging to the Spain^{9V}-3 international resistant clone with capsular switching into serotype 14, as previously described by Ardanuy et al. (1), and also into serotype 19A, as has been observed in other studies (25). A rate of penicillin resistance of only 14.2% was found among the *mef(E)*-positive singleton clones, and the penicillin MIC range for isolates of the CC-Spain^{9V}-3 clone was 0.12 to 4 mg/liter, in agreement with the findings of other Spanish studies (1).

In conclusion, the rate of macrolide resistance in our Spanish *S. pneumoniae* collection was high (34.3%). An increase in

the presence of the *mef* gene compared with that in other studies was detected, but this was not associated with the M phenotype. Most of the *mef*-positive isolates also harbored the *erm*(B) gene (62.2% of the *mef*-positive isolates), with all of them showing the constitutive MLS_B phenotype. Among the isolates showing the M phenotype only, one carried the *mef*(A) subclass and belonged to the England¹⁴⁻⁹ clone, as previously described in Europe (1). Population structure analysis showed that the *mef*-positive isolates are grouped in different clones and CCs and not in only a few clones, as previously described in other geographic areas (1, 14).

ACKNOWLEDGMENTS

E. Gómez G. de la Pedrosa is a recipient of a post-MIR contract from the Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Health, Spain (ref. CM07/00147). Part of this study was funded by an unrestricted grant from Sanofi-Aventis and by CIBER-ESP (the Network Center for Biomedical Research in Epidemiology and Public Health) and the Microbial Sciences Foundation.

REFERENCES

- Ardanuy, C., A. Fenoll, S. Berron, L. Calatayud, and J. Liñares. 2006. Increase of the M phenotype among erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Spain related to the serotype 14 variant of the Spain^{9V-3} clone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:3162–3165.
- Calatayud, L., C. Ardanuy, E. Cercenado, A. Fenoll, E. Bouza, R. Pallares, R. Martín, and J. Liñares. 2007. Serotypes, clones, and mechanisms of resistance of erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates collected in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:3240–3246.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance and standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth informational supplement. Document M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Cochetti, I., E. Tili, M. Vecchi, A. Manzini, M. Mingoia, P. E. Valardo, and M. P. Montanari. 2007. New Tn⁹¹⁶-related elements causing *erm*(B)-mediated erythromycin resistance in tetracycline-susceptible pneumococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**:127–131.
- del Campo, R., F. Cafini, M. I. Morosini, A. Fenoll, J. Liñares, L. Alou, D. Sevilano, R. Cantón, J. Prieto, F. Baquero, and the Spanish Pneumococcal Network (G3/103). 2006. Combinations of PBPs and *murM* protein variants in early and contemporary high-level penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**:983–986.
- del Campo, R., M. I. Morosini, E. G. de la Pedrosa, A. Fenoll, C. Muñoz-Almagro, L. Maiz, F. Baquero, R. Canton, and the Spanish Pneumococcal Infection Study Network. 2005. Population structure, antimicrobial resistance, and mutation frequencies of *Streptococcus pneumoniae* isolates from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* **43**:2207–2214.
- Del Grosso, M., F. Iannelli, C. Messina, M. Santagati, N. Petrosillo, S. Stefani, G. Pozzi, and A. Pantosti. 2002. Macrolide efflux genes *mef*(A) and *mef*(E) are carried by different genetic elements in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **40**:774–778.
- Del Grosso, M., J. G. Northwood, D. J. Farrell, and A. Pantosti. 2007. The macrolide resistance genes *erm*(B) and *mef*(E) are carried by Tn²⁰¹⁰ in dual-gene *Streptococcus pneumoniae* isolates belonging to clonal complex CC271. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:4184–4186.
- Enright, M. C., and B. G. Spratt. 1998. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae* identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* **144**:3049–3060.
- Farrell, D. J., S. G. Jenkins, S. D. Brown, M. Patel, B. S. Lavin, and K. P. Klugman. 2005. Emergence and spread of *Streptococcus pneumoniae* with *erm*(B) and *mef*(A) resistance. *Emerg. Infect. Dis.* **11**:851–858.
- Isozumi, R., Y. Ito, T. Ishida, M. Osawa, T. Hirai, I. Ito, K. Maniwa, M. Hayashi, H. Kagioka, M. Hirabayashi, K. Onari, H. Tomioka, K. Tomii, I. Gohma, S. Imai, S. Takakura, Y. Inuma, S. Ichiyama, M. Mishima, and the Kansai Community Acquired Pneumococcal Pneumonia Study Group. 2007. Genotypes and related factors reflecting macrolide resistance in pneumococcal pneumonia infections in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **45**:1440–1446.
- Leclercq, R., and P. Courvalin. 2002. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2727–2734.
- Littauer, P., M. Sangvik, D. A. Caugant, E. A. Hoiby, G. S. Simonsen, A. Sundsfjord, and the Norwegian Macrolide Study Group. 2005. Molecular epidemiology of macrolide-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae* collected from blood and respiratory specimens in Norway. *J. Clin. Microbiol.* **43**:2125–2132.
- Marimón, J. M., L. Iglesias, D. Vicente, and E. Pérez-Trallero. 2003. Molecular characterization of erythromycin-resistant clinical isolates of the four major antimicrobial-resistant Spanish clones of *Streptococcus pneumoniae* (Spain^{23F-1}, Spain^{6B-2}, Spain^{9V-3}, and Spain¹⁴⁻⁵). *Microb. Drug Resist.* **9**:133–137.
- Marimón, J. M., E. Pérez-Trallero, M. Ercibengoa, A. Gonzalez, A. Fenoll, and the Spanish Pneumococcal Infection Study Network (G03/103). 2006. Molecular epidemiology and variants of the multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* Spain¹⁴⁻⁵ international clone among Spanish clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**:654–660.
- McGee, L., L. McDougal, J. Zhou, B. G. Spratt, F. C. Tenover, R. George, R. Hakenbeck, W. Hryniewicz, J. C. Lefevre, A. Tomasz, and K. P. Klugman. 2001. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. *J. Clin. Microbiol.* **39**:2565–2571.
- Morosini, M. I., R. Cantón, E. Loza, M. C. Negri, J. C. Galán, F. Almaraz, and F. Baquero. 2001. In vitro activity of telithromycin against Spanish *Streptococcus pneumoniae* isolates with characterized macrolide resistance mechanisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2427–2431.
- Pérez-Trallero, E., C. García-Rey, A. M. Martín-Sánchez, L. Aguilar, J. García-de-Lomas, J. Ruiz, and the Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens (SAUCE Program). 2002. Activities of six different quinolones against clinical respiratory isolates of *Streptococcus pneumoniae* with reduced susceptibility to ciprofloxacin in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2665–2667.
- Pérez-Trallero, E., J. M. Marimón, A. Gonzalez, D. Vicente, and J. M. García-Arenzana. 2004. Spectrum of antibiotic resistance of the Spain¹⁴⁻⁵ *Streptococcus pneumoniae* clone over a 22 year period. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**:620–625.
- Reinert, R. R., C. Franken, M. van der Linden, R. Luttkick, M. Cil, and A. Al-Lahham. 2004. Molecular characterisation of macrolide resistance mechanisms of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolated in Germany, 2002–2003. *Int. J. Antimicrob. Agents* **24**:43–47.
- Reinert, R. R., S. Muckel, A. Al-Lahham, B. G. Spratt, A. B. Brueggemann, R. Hakenbeck, and R. Luttkick. 2003. Characterization of German penicillin non-susceptible serotype 23F pneumococci using multilocus sequence typing. *J. Med. Microbiol.* **52**:981–987.
- Reinert, R. R., A. Ringelstein, M. van der Linden, M. Y. Cil, A. Al-Lahham, and F. J. Schmitz. 2005. Molecular epidemiology of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Europe. *J. Clin. Microbiol.* **43**:1294–1300.
- Schito, G. C., and D. Felmingham. 2005. Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin, azithromycin and telithromycin (PROTEKT 1999–2003). *Int. J. Antimicrob. Agents* **26**:479–485.
- Schouls, L., M. van der Heide, H. G. Vauterin, L. Vauterin, and P. Mooi. 2004. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Dutch *Bordetella pertussis* strains reveals rapid genetic changes with clonal expansion during the late 1990s. *J. Bacteriol.* **186**:5496–5505.
- Singleton, R. J., T. W. Hennessy, L. R. Bulkow, L. L. Hammitt, T. Zulz, D. A. Hurlburt, J. C. Butler, A. Rudolph, and A. Parkinson. 2007. Invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes among Alaska native children with high levels of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine coverage. *JAMA* **297**:1784–1792.
- van der Linden, M., A. Al-Lahham, S. Haupts, and R. R. Reinert. 2007. Clonal spread of *mef*-positive macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates causing invasive disease in adults in Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1830–1834.